

ГЕНЫ Wx И РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШРОТА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

**Т.А. Рыжкова^{1,2},
М.Ю.Третьяков^{1,2},
В.П. Нецветаев^{1,2},
О.А. Сорокопудова²
О.В. Акиншина^{1,2}
Л.С. Бондаренко^{1,2}
А.В. Аркадьева¹**

¹ Белгородский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Россия, 308001 г. Белгород, ул. Октябрьская, 58
E-mail: netsvetaev@bsu.edu.ru

² Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

Исследование реологических свойств шрота сортов нормальной (*Корочанка*), частично-*wx* (*Коротышка*) и *wx*-пшеницы (*Софийка*), показало, что шрот полного рецессива по *wx*-генам имеет высокое влагопоглощение, низкую вязкость теста и устойчивость к черствлению готовой продукции. Генетический анализ пыльцевых зерен с растений F₁ № 991JD529 X *Коротышка* подтвердил наличие у сорта *Коротышка* одного рецессивного гена *wx*. Технологический анализ показал, что одного *wx*-гена в геноме пшеницы не достаточно для существенного улучшения качества хлебопекарной продукции. Изучено влияние среды на формирование физических свойств теста из зерна урожая 2010 и 2011 гг. Анализировались образцы мягкой озимой пшеницы *Везёлка*, *Безенчукская 380*, *Фея* и *Уни 1*. Установлено, что «стекание зерна» приводит к существенному изменению физических показателей теста, отражающих углеводный комплекс зерновки при анализе шрота на приборе Миксолаб. Так, по сравнению с 2010 г. ретроградация уменьшилась на 55,4%, активность амилазы увеличилась на 21,8%, вязкость уменьшилась на 43,5%. В целом вклад средового фактора в вариацию этих показателей составлял 36-71%. Тесто из такого шрота по физическим свойствам углеводного комплекса приближалось к типичной миксограмме, характерной для образца с рецессивными аллелями *wx*.

Ключевые слова: мягкая пшеница, *wx*-гены, миксолаб, стекание зерна, физические свойства теста.

Введение

Крахмальные гранулы состоят из двух типов молекул – амилозы и амилопектина. В пределах амилопластов синтез амилозы достигается благодаря ферменту GBSS (granule-bound starch synthase), также известного как *waхy*-протеин. *Wx*-протеины кодируются генами под названиями *вакси* (*Wx*). Аллогексаплоиды (AABBDD), т.е. мягкие пшеницы, несут три гомеологичных гена: *Wx-A1* (хромосома 7AS-короткое плечо), *Wx-B1* (7BL - длинное плечо) и *Wx-D1* (7DS-короткое плечо) [1, 2].

Сорт пшеницы называется *waхy*, если объединяются три неактивных нуль-аллеля, что приводит к полному блокированию синтеза фермента GBSS и амилозы. В этом случае крахмал состоит только из амилопектина. Пшеница с одним или двумя нуль-аллелями имеет частично блокированный синтез амилозы и называется частично-*вакси* (partial-*waхy*) [3, 4, 5].

Каждый неактивный *wx* – рецессивный аллель вызывает снижение до определенного уровня содержания амилозы в крахмале и меняет соотношение амилоза/амилопектин в зерне, что влияет на технологические свойства муки пшеницы и вкусовые качества конечной продукции.

Цель исследования – повышение эффективности селекции продовольственной пшеницы. Для решения её необходимо было оценить эффект генов *wx* на изменение технологических свойств шрота сортов озимой мягкой пшеницы. Другой задачей являлось выявление средового фактора на вариацию этих свойств. Для решения поставленных вопросов использовали прибор Миксолаб (Франция), позволяющий тестировать шесть показателей качества этой культуры.

Материал и методика исследований

Исследовались сорта озимой мягкой пшеницы урожая 2010 и 2011 годов. Погодные условия вегетационного периода 2010 г. были похожи на предыдущий год (2009), особенности которого на полях института отражены ранее [6]. Повышенные температуры и недостаточная влагообеспеченность в период созревания растений пшеницы способствовали формированию высококачественного зерна. В 2011 г. в период налива и созревания зерна две недели подряд шли небольшие дожди, что привело к «стеканию зерна». В связи с этим, созревшее зерно, в частности, характеризовалось повышенной щуплостью.

В качестве образцов использовали следующие сорта: *Софийка* – сорт *wx*-пшеницы, имеющий три нуль-аллеля, полученный из Селекционно-генетического института от А.И. Ры-

балка (Одесса) в 2011 г. (урожай 2010 г.); *Коротышка* – сорт частично-*wx* пшеницы, содержащий рецессив *Wx-B1* [1], селекции ГНУ Белгородского НИИСХ Россельхозакадемии (урожай 2010 г.); *Корочанка* – сорт нормальной пшеницы, несущий доминантные аллели *Wx*, селекции ГНУ Белгородского НИИСХ Россельхозакадемии (урожая 2011 г.), *991JD529* рецессивная гомозигота по генам *wx* яровой мягкой пшеницы из коллекции Института растениеводства УААН (Харьков).

Для исследования влияния такого средового фактора как «стекание зерна» на физические свойства теста анализировались сорта *Везёлка*, *Безенчукская 380*, *Фея* и *Уни 1* урожая 2010 и 2011 гг.

Хлебопекарные качества шрота определяли на приборе Миксолаб по ранее описанной методике [7] в протоколе Chorin wheat+, предназначенного для анализа шрота.

Результаты и исследования.

Зерна *waxu*-пшениц могут быть легко обнаружены с помощью йодной пробы: их отличает красно-коричневая окраска пыльцевых зёрен и эндосперма семени, в отличие от темной синечерной окраски зерна дикого типа. Так, в таблице 1 представлены результаты расщепления пыльцевых зёрен с растений F_1 № *991JD529* X *Коротышка* по реакции на окраску йодом.

Таблица 1

Расщепление пыльцевых зёрен по генам *Wx/wx* на растениях F_1 № *991JD529* X *Коротышка*

Фенотипические классы		$\chi^2_{1:1}$	P	$\chi^2_{3:1}$	P	$\chi^2_{7:1}$	P
<i>Wx</i>	<i>wx</i>						
116	30	50.66	<0.01	1.55	>0.10	8.65	<0.01

При моногенном наследовании ожидаемое расщепление пыльцевых зёрен на растениях F_1 должно соответствовать соотношению 1 : 1. В табл. 1 приведена оценка соответствия наблюдаемого расщепления пыльцевых зёрен ожидаемому на растениях F_1 в зависимости от числа генов, определяющих реакцию на окраску йодом. Как видно, наблюдаемое расщепление не соответствует расщеплению 1 : 1. В то же время, при дигенном наследовании ожидаемое расщепление должно быть близко отношению 3 : 1. Полученное расщепление подтверждает дигенность наследования данного признака (табл. 1). В случае наследования, обусловленного тремя генами ожидаемое расщепление должно быть 7 : 1. Это вариант статистически не подтверждается (табл. 1). Следовательно, *Коротышка* несет рецессивный аллель по одному из генов *wx* и доминантные по двум другим факторам, что подтверждают результаты изложенные ранее [1].

Следует отметить, что окраска крахмальных зёрен и пыльцы частично – *waxu* пшениц может быть от фиолетовой до сине-черной. Поэтому визуально их нельзя отличить от образцов дикого типа.

Установлено, что в смесях муки обычной и пшеницы-*wx* водопоглощение тем больше, чем выше процент добавки муки *wx*-пшеницы. Повышение ВПС% муки дает «припек» хлеба. То есть увеличивает весовой выход продукта, а более активный амилолиз увеличивает объем испеченного хлеба [5, 8, 9].

Следует отметить, что такой довольно важный для качества хлеба показатель, как «число падения» или индекс Хагберга, у пшеницы вакси колеблется в пределах 67–80 с. Такое низкое число падения бывает в муке хлебопекарных пшениц только из проросшего зерна в колосе. В нормальных условиях «число падения» для хлебопекарной пшеницы находится в пределах 350–400 с. [1, 2]. Мука, полученная из *wx* сортов пшеницы в чистом виде, не подходит для выпечки хлебобулочных изделий. Хлеб из *wx*-пшеницы, имеет низкий удельный объем, липкую структуру мякиша (рис. 1). Максимальное содержание муки *wx*-пшеницы, без существенных отрицательных изменений качества хлебобулочного изделия, составляет 30%. В то же время мука *wx*-пшеницы обладает потенциалом улучшителя, который способствует меньшему черствлению готовой продукции [9].

Анализ реологических и ферментативных свойств позволил выявить следующее (табл. 2). Влагопоглотительная способность (ВПС%) исследуемых образцов имела высокие числовые значения, что объясняется в частности наличием оболочек в шроте. Чем выше влагопоглощение образца, тем меньше требуется навеска шрота для достижения заданной консистенции теста. Сорт *waxu* пшеницы *Софийка* обладал наиболее высоким значением ВПС, что также подтверждает литературные данные [9].

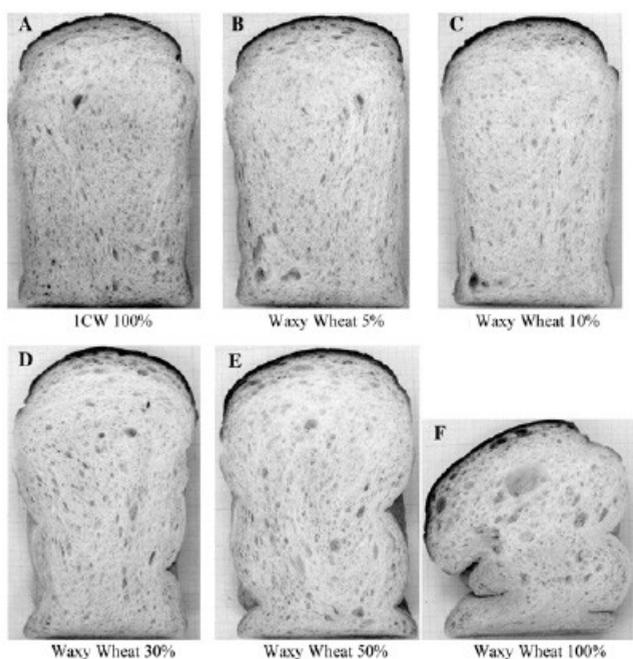


Рис. 1. Внешний вид хлеба, выпеченного из смеси муки (0, 5, 10, 30, 50 и 100% муки *wx*-пшеницы) [9]

Наиболее стабильным в процессе замешивания теста был образец *Софийка*, о чем свидетельствует высокий показатель индекса Замес. Данный индекс описывает поведение теста и его силу во время этой фазы при 30°C. Образец *Корочанка* имел самый низкий показатель Замес, что нашло отражение и на миксограмме (рис. 2). Пик в течение 0-8 мин, высота и ширина которого обуславливают значения индексов ВПС и Замес, был более узким и раньше других образцов пошел на снижение. Данные различия можно объяснить особенностями белковой части комплекса изученных образцов шрота.

Наиболее высоким индекс Глютен + (5 баллов) был у образца *Корочанка*, а у образцов *wx* (*Софийка*) и частично-*wx* (*Коротышка*) пшеницы составлял 2 балла. Низкий индекс Глютен + указывает на большее снижение консистенции теста в фазе II (рис. 3).

Таблица 2

Показатели качества шрота мягкой пшеницы на приборе Миксолаб

Образец	ВПС 1	ВПС	Замес	Глютен+	Вязкость	Амилаза	Ретроградация
Софийка (Wx-A1, B1, D1)	73.2	9	5	2	0	5	3
Коротышка (Wx-B1)	67.3	9	4	2	5	8	8
Корочанка	64.9	8	2	5	2	4	5
среднее	68.47	8.67	3.67	3.00	2.33	5.67	5.33

Интересные данные были получены по индексу вязкости (III фаза). Считается, что на этой стадии, т.е. в процессе нагревания, роль протеинов переходит на второй план путём передачи воды крахмалу. Соответственно, вязкость теста увеличивается.

Так как в качестве исследуемых были выбраны образцы полностью и частично-*wx* пшениц (*Софийка* и *Коротышка* соответственно), то они характеризовались полным или частичным отсутствием амилозы в крахмальном комплексе. Отсутствие амилозы в образце *wx*-пшеницы *Софийка* вызвало снижение значения индекса Вязкость до нуля и, следовательно, значительное снижение консистенции теста (табл. 2, рис. 2).

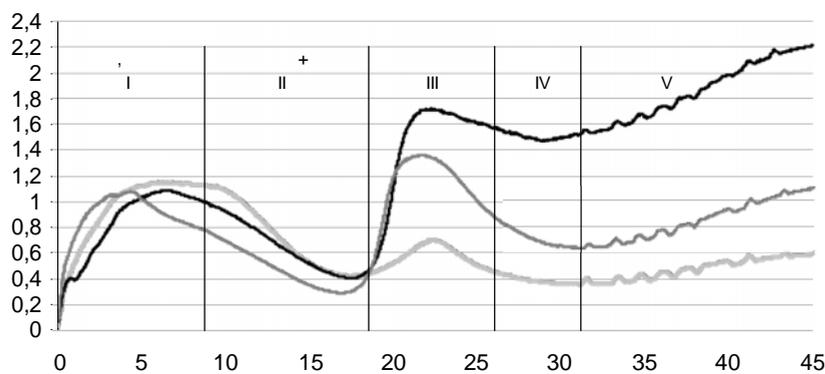


Рис. 2. Миксограммы исследуемых образцов: *Софийка* и *Коротышка* урожай 2010 г.; *Корочанка* урожай 2011 г.



Образец *Ко-*

ротышка обладал достаточно высокой степенью вязкости теста со значением 5 баллов, т.е. действие одного гена *wx* на данный показатель не проявилось. Образец шрота *Корочанка* при отсутствии *wx*-генов продемонстрировал более низкую, чем у *Коротышки* вязкость, которая оценена в 2 балла. Такое поведение шрота *Корочанки* можно объяснить тем, что в 2011 г. на посевах зерновых наблюдалось «стекание зерна» и это могло отразиться на этом показателе, а также индексе - Амилаза. Подтверждением этому являются сравнительные результаты оценки индексов качества сортов озимой мягкой пшеницы, полученных при анализе зерна урожая 2010 и 2011 годов (табл. 3).

Таблица 3

Показатели качества шрота сортов мягкой пшеницы на приборе Миксолаб по годам

Название сорта	Годы	ВПС	Замес	Глютен+	Вязкость	Амилаза	Ретроградация
Везёлка	2010	8	1	5	1	5	5
	2011	8	1	5	1	5	2
Безенчукская 380	2010	9	2	5	3	6	7
	2011	9	3	2	2	4	5
Фея	2010	8	1	6	2	5	6
	2011	8	1	5	1	4	2
Уни1 (1Do)	2010	8	1	5	3	6	7
	2011	8	2	4	1	4	3
Среднее	2010	8.3	1.3	5.3	2.3	5.5	6.3
	2011	8.3	1.8	4.0	1.3	4.3	3.0
<i>HCP_{0,05}</i>	<i>X</i>	-	0.9	2.0	1.3	1.5	1.5
Доля влияния, %: годы сорта случайные отклонения			12.5	31.7	36.4	64.1	70.7
			75.0	44.3	45.5	7.7	24.7
			12.5	24.0	18.2	28.2	4.6

Как видно, «стекание зерна» несущественно сказалось на показателе замес, что свидетельствует о том, что клейковинный комплекс эндосперма под действием этого фактора слабо изменился. Основной вклад в его вариацию вносили наследственные особенности образца. В то же время, доля влияния среды достаточно велика в формировании следующего показателя – глютен. Он отражает число водородных связей между пептидами белкового комплекса. В то же время, здесь также лидирующее место остается за генетическими особенностями сортов. Как и следовало ожидать, «стекание зерна» прежде всего, затрагивает углеводный комплекс зерновки (табл. 3). Соответственно, уменьшился индекс вязкости и амилазы, что свидетельствует о повышении активности амилолитических ферментов зрелого зерна пшеницы в 2011 г. по сравнению с 2010 г. Интересно, что доля влияния среды и генотипа на показатель вязкости была близка. Вероятно, это связано с наследственными особенностями крахмального комплекса изученных сортов. Напротив, изменение индексов амилазы и, в значительной степени, ретроградации было обусловлено в эти годы влиянием средовых факторов.

Таким образом, кривая миксограммы *Корочанки* (рис. 2) отражает действие «стекания зерна» в 2011 г. В данном случае, «стекание зерна» приводило к изменению физических свойств теста шрота из такого зерна, подобное введению рецессивных генов *wx* в обычный по погодным условиям вегетационный период.

Индексы Вязкости и Амилазы связаны друг с другом. Считается, что низкое значение вязкости указывает на высокую активность амилолитических ферментов. Соответственно, сорта *Софийка* и *Корочанка* имели достаточно высокую активность амилаз (4-5 баллов), а *Коротышка* - наименьшую (8 баллов) (табл. 2). Характерно, что если у *Софийки* ферментативная активность связана с особенностями крахмального комплекса, обусловленного генами *wx*, то у *Корочанки* на формирование этого показателя повлияли факторы среды, описанные выше (дождливая погода в период налива зерна).

По индексу Ретроградации, характеризующему степень кристаллизации крахмала, выделился образец *Софийка*, отличающийся низкими показателями кристаллизации углеводов, а, следовательно, и более медленным черствлением конечной продукции, что отмечено зарубежными исследователями в отношении *wx*-пшениц [9]. Характерно, что шрот из зерна *Корочанки*, подвергнувшегося «стеканию» также обладал более низким индексом черствления – ретроградации (рис. 2).

Таким образом, были исследованы хлебопекарные показатели шрота вакци пшеницы в сравнении со шротом частично-вакци и нормальной пшеницы. Полный рецессив по *wx* генам (безамилозный сорт) определяет высокое влагопоглощение, низкую вязкость теста и хорошую устойчивость к черствлению конечной продукции. Введение одного рецессивного гена *wx* недостаточно для существенного улучшения качества хлебопекарной продукции.

Тесто из зерна подвергнуто «стеканию» по физическим свойствам углеводного комплекса приближается к образцам, несущим рецессивные аллели генов *wx*.

Использование прибора Миксолаб для выявления действия генов *wx* целесообразно проводить в годы нормальные для формирования полноценного зерна. Если погодные условия приводят к «стеканию зерна» данный прибор для выявления генов *wx* мало эффективен.

Работа выполнена при поддержке ФУП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, Соглашение №14.А18.21.0200.

Список литературы

1. Климушина М.В. Молекулярно-генетическая характеристика коллекции мягкой озимой пшеницы по генам, отвечающим за хлебопекарные и технологические качества муки // М.В. Климушина, М.Г. Дивашук, Г.И. Карлов // Известия ТСХА. – 2009. – выпуск 3. – С. 80-88.
2. Гладких Н.И. Скрининг коллекции мягкой озимой пшеницы КНИИСХ имени П.П. Лукьяненко на наличие аллельных вариантов *waxy*-генов / Н.И. Гладких, М.В. Климушина, М.Г. Дивашук, Л.А. Беспалова, А.В. Васильев, Г.И. Карлов // XI Молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». – Москва, 2011. – С. 20-21.
3. Graybosch R.A. Waxy wheats: origin, properties, and prospects // Food science & technology. – 1998. – No. 9. – P. 135-142.
4. Рыбалка А.И. Современные направления улучшения качества зерна ячменя / А.И. Рыбалка, М.М. Копусь, Д.П. Донцов // Аграрный Вестник Юго-Востока. – 2009. - №3. – С. 18-21.
5. Обухова Л. В. Анализ запасных белков (проламинов, пуриноидинов и *Waxy*) у линий мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. × (*Triticum timopheevii* Zhuk. × *Triticum tauschii*) с комплексной устойчивостью к грибным инфекциям / Л.В. Обухова, Л.И. Лайкова, В.К. Шумный // Генетика. – 2010. - № 6 (46). – С. 764–768
6. Нецветаев В.П. Новые подходы к оценке качества зерна озимой мягкой пшеницы / Нецветаев В.П., Лютенко О.В., Пашенко Л.С., Попкова И.И. // Белгородский Агромир. - 2010. -№1(54). - С. 27-29.
7. Нецветаев В.П. Использование прибора Миксолаб при исследовании муки высшего сорта / В.П. Нецветаев, М.Ю. Третьяков, Т.А. Рыжкова // Судебная экспертиза. – 2011. – № 1. – С. 91-99.
8. Hayakawa K. Quality characteristics of waxy hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): properties of starch gelatinization and retrogradation / K. Hayakawa, K. Tanaka, T. Nakamura, S. Endo, T. Hoshino // Cereal Chemistry. – 1997. - Vol. 74, No.5. - P. 576-580.
9. Hayakawa K. End use quality of waxy wheat flour in various grain-based foods / K. Hayakawa, K. Tanaka, T. Nakamura, S. Endo, T. Hoshino // Cereal Chemistry. – 2004. - Vol. 81, No. 5. – P. 666-672.

WX GENES AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF COMMON WHEAT FLOUR

T.A. Ryzhkova^{1,2}, M.Yu. Tretyakov

^{1,2}, V.P. Netsvetaev^{1,2}, O.A. Sorokopudova², O.V. Akinshina^{1,2},

L.S. Bondarenko^{1,2},

A.V. Arkadjeva¹

¹Belgorod State Research Institute of Agriculture Russian Academy of Agricultural, Octyabrskaya St., 58, Belgorod, 308001, Russia
E-mail: netsvetaev@bsu.edu.ru

² Belgorod State National Research University, Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia

The study of rheological properties of flour in normal varieties (*Koro-chanka*), partially-wx (*Korotyshka*) and wx-wheat (*Sophiyka*), showed that the full meal for wx-recessive genes has a high water absorption, low viscosity of dough and resistance of finished product to getting stale. Genetic analysis of pollen grains from plants F₁ № 991J529 X *Korotyshka* confirmed in cv. *Korotyshka* one recessive gene *wx*. Wx-one recessive gene in the genome of wheat is not enough to significantly improve the quality of bakery products. The influence of environment on the formation of the physical properties of dough from grain harvested in 2010 and 2011 was studied. We analyzed samples of common winter wheat *Veyselka*, *Bezen-chukskaya 380*, *Feya* and *Uni 1*. It was established that the "run-off grain" leads to a significant change in physical indicators of dough reflecting a complex carbohydrate meal in the analysis of grains by the instrument Mix-solab. Thus, compared to 2010 retrogradation decreased 55.4%, amylase activity increased by 21.8%, the viscosity decreased by 43.5%. In general, the contribution of environmental factors in the variation of these parameters was 36-71%. Dough from this meal by the physical properties of the complex carbohydrate was close to typical mixogram characteristic of the sample with the recessive allele's *wx*-loci.

Key words: common wheat, wx-genes, mixolab, run-off grain, physical properties of dough.