

УДК 535.651:[633.111+664.64.016.8]

МЕТРОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДУ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АМІЛОЗИ В КРОХМАЛІ ЗЕРНА СЕЛЕКЦІЙНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ

І.В. ПЕТРОВА,¹ О.М. ХОХЛОВ,² С.В. ЧЕБОТАР,¹ Ю.М. СИВОЛАП¹

¹Південний біотехнологічний центр у рослинництві Української академії аграрних наук
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

²Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та
сортотвчення Української академії аграрних наук
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

У системі трифакторного дисперсійного аналізу дано метрологічну характеристику методу спектрофотометричного визначення вмісту амілози в крохмалі зерна пшениці (оцінено повторюваність, відтворюваність, диференційну здатність). Для характеристики відмінностей, обумовлених генотипами, показано переваги застосування довших хвиль (700—750 нм). Визначено ефекти впливу алельного стану Wx-локусів (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) на вміст амілози в крохмалі генотипів гібридної популяції. Середні ефекти впливу функціональних алелів Wx-A1a, Wx-B1a, Wx-D1a становили відповідно 0,050, 0,054, 0,082 одиниці оптичної густини. Відмічено відхилення від адитивності, обумовлені компенсаторним ефектом. Показано неповне відтворення Wx-фенотипу за наявності нуль-алелів за локусами Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1 у селекційних форм.

Ключові слова: пшениця, селекція, Wx-гени, амілоза, спектрофотометрія.

Одним з основних напрямів розвитку харчової та інших галузей промисловості є пошук нових джерел поліпшення технологічних властивостей зернових культур, які б забезпечили розширення асортименту продукції, підвищення її якості, інтенсифікацію традиційних технологічних процесів. Новим актуальним напрямом селекції є створення сортів м'якої пшениці з низьким або нульовим вмістом амілози в крохмалі зерна. Дослідженням якісних характеристик крохмалю зерна пшениці з частково чи повністю блокованим синтезом амілози доведено перспективність використання сировини з такими параметрами для виробництва харчових згущувачів, продуктів із листового тіста та для отримання біоетанолу [2].

Низький або нульовий вміст амілози зумовлений мутаціями Wx-генів, які кодує фермент, що контролює синтез цього полімеру.

Відомі різноманітні методичні підходи до оцінювання вмісту амілози у крохмалі. Одним із них є спектрофотометрія у видимому й інфрачервоному діапазонах довжин хвиль [3—5]. За цим методом можна проводити кількісний аналіз, оцінювати ефект впливу дози Wx-генів на вміст амілози у пшеничному крохмалі, що важливо в разі його використання для генетичного аналізу.

Відправною точкою досліджень обрано процедуру, що ґрунтується на реакції між крохмалем і сполуками йоду [5]. Внаслідок їх взаємодії ут-

ворюється комплекс блакитного кольору — клатрат, кількість якого вимірюють фотометрично в діапазоні довжин хвиль 450—650 нм з подальшим визначенням довжини хвилі, за якої абсорбція максимальна.

Метою наших досліджень була метрологічна характеристика методу спектрофотометричного оцінювання вмісту амілози (оцінювання його повторюваності, відтворюваності та диференційної здатності), визначення ефектів впливу алельного стану Wx-локусів (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) на вміст амілози в крохмалі зерна генотипів пшениці гібридної популяції.

Методика

Матеріал — генотипи, дібрані з гібридної популяції F₅ (Куяльник × лінія Wx-12) із визначеним за допомогою ПЛР алельним станом за Wx-генами. У табл. 1 наведено генотипи восьми теоретично можливих класів розщеплення. Матеріал для дослідження люб'язно надав завідувач відділу генетичних основ селекції СГП—НЦНС, д-р біол. наук О.І. Рибалка. Як контроль використовували батьківські форми: сорт Куяльник (Wx-A1a, Wx-B1a, Wx-D1a) та лінію Wx-12 (Wx-A1b, Wx-B1b, Wx-D1b). Зразки крохмалю для спектрофотометричного оцінювання вмісту амілози підготовлені за методом, описаним Фуджіта [5] (див. табл. 1).

Спектральні дані отримували на спектрофотометрі Cary Win UV фірми «Varian» (Австрія) в режимі повного сканування в діапазоні 350—750 нм. На цьому матеріалі проведено три серії вимірювань оптичних параметрів у 2007 і 2008 рр. У межах кожної серії аналіз повторювали тричі. Метрологічні характеристики оцінювали в системі трифакторного дисперсійного аналізу (генотип:блок:серія) з використанням процедури АСВ зі спеціалізованого програмного пакета Agrobases 21 «Agronomix» (Канада).

Критеріями повторюваності й відтворюваності були середні квадрати (MS) та їхні корені (\sqrt{MS}) — відповідно за блоками й серіями. Диференційну здатність оцінювали за часткою від ділення різниці між значеннями максимального і мінімального варіантів на найменшу істотну різницю (NIP = 0,05).

Для оптимізації методу всі параметри визначали для кожної з чотирьох рівновіддалених довжин хвиль робочого діапазону, а саме: 600, 650, 700, 750 нм.

ТАБЛИЦЯ 1. Генотипи пшениці, дібрані для дослідження з гібридної популяції F₅ (Куяльник × лінія Wx-12)

Дослідний генотип	Алельний стан за Wx-локусами			Тип класу розщеплення
	Wx-A1	Wx-B1	Wx-D1	
170, 234, 65	b	b	b	1
240	a	b	b	2
172, 183, 149	b	b	a	3
165, 208	a	b	a	4
150	b	a	b	5
166, 201, 217	a	a	b	6
164, 242, 182	b	a	a	7
147, 204, 186	a	a	a	8

П р и м і т к а: а — функціональні алелі Wx-локусів; b — нуль-алелі Wx-локусів.

Ефекти впливу алельного стану Wx-локусів (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) на вміст амілози в крохмалі генотипів гібридної популяції знаходили порівнянням середніх величин, отриманих у ході дисперсійного аналізу, а також графічно, для оцінювання особливостей прояву ефектів алелів.

Результати та обговорення

Середні значення абсорбції (табл. 2) підтверджують відповідну різницю між генотипами (дані усереднені за блоками і серіями) на кожній із досліджених чотирьох хвиль. Оптичні дані з абсорбції за абсолютною величиною були помітно меншими за довжини хвилі 700 і 750 нм, відповідно меншими були й різниці. Кореляція з очікуваним вмістом амілози була не нижчою за $r = 0,94$.

Вірогідна різниця абсорбції зафіксована також між серіями дослідів (табл. 3). Порівняно із середніми значеннями першої та другої серій результати третьої були помітно вищими. При цьому різниця між серіями нівелювалась до рівня неістотної за довжини хвилі 750 нм. Варіація за серіями, що характеризує відтворюваність, значно вища, ніж за блоками (повторюваність), особливо за довжин хвиль 600 і 650 нм. Зі зростанням довжини хвилі ця варіація згасає і за 750 нм не відрізняється від варіації за блоками (табл. 4).

Згідно з даними табл. 5, диференційна здатність за оцінювання генотипів мало залежала від довжини хвилі вимірювання. В разі оцінюван-

ТАБЛИЦЯ 2. Середні значення абсорбції — підсумки за генотипами

Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1	600 нм	650 нм	700 нм	750 нм	Амілоза**
Wx-12 (bbb)	0,0032 ^{e*}	0,0019 ^e	0,0007 ^d	-0,0002 ^d	0,9
bbb	0,0699 ^d	0,0637 ^d	0,0520 ^c	0,0339 ^c	0,9
abb	0,1877 ^c	0,1886 ^c	0,1672 ^b	0,1145 ^b	19,8
bba	0,2421 ^{abc}	0,2378 ^{bc}	0,2074 ^b	0,1399 ^b	22,9
aba	0,2316 ^{bc}	0,2311 ^c	0,2027 ^b	0,1368 ^b	25,8
bab	0,1955 ^c	0,1978 ^c	0,1755 ^b	0,1194 ^b	27,1
aab	0,2212 ^c	0,2265 ^c	0,2017 ^b	0,1374 ^b	28,0
baa	0,2312 ^{bc}	0,2325 ^c	0,2057 ^b	0,1408 ^b	28,5
aaa	0,2981 ^a	0,3003 ^a	0,2659 ^a	0,1804 ^a	28,7
Куяльник (aaa)	0,2834 ^{ab}	0,2922 ^{ab}	0,2631 ^a	0,1816 ^a	28,7
НІР _{0,5}	0,0678	0,0647	0,0558	0,0380	

*Тут і в табл. 3 літерами позначено групи, що вірогідно різняться між собою.

**Очікуваний вміст амілози в крохмалі (%) згідно з Ямаморі [8].

ТАБЛИЦЯ 3. Середні значення абсорбції — підсумки за серіями

Серія	600 нм	650 нм	700 нм	750 нм
1	0,1865 ^b	0,1895 ^b	0,1681 ^b	0,1148 ^a
2	0,1691 ^b	0,1743 ^b	0,1580 ^b	0,1118 ^a
3	0,2336 ^a	0,2280 ^a	0,1965 ^a	0,1288 ^a
НІР _{0,5}	0,0372	0,0355	0,0306	0,0208

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

ТАБЛИЦА 4. Параметры повторяемости и воспроизводимости результатов исследований

Массив данных	Чинник	MS				\sqrt{MS}			
		600 нм	650 нм	700 нм	750 нм	600 нм	650 нм	700 нм	750 нм
Загалом	Блок	0,006	0,004	0,004	0,003	0,078	0,063	0,063	0,055
	Серія	0,033	0,023	0,012	0,002	0,182	0,152	0,101	0,045
Стандарти	Блок	0,001	0,001	0,001	—	0,032	0,032	0,032	—
	Серія	0,005	0,004	0,002	—	0,071	0,063	0,045	—
Гібриди	Блок	0,007	0,005	0,004	0,003	0,084	0,071	0,063	0,055
	Серія	0,038	0,026	0,013	0,003	0,195	0,161	0,114	0,055

ТАБЛИЦА 5. Дифференційна здатність методу за визначення ефектів генотипів та ефектів, обумовлених серіями дослідів

Об'єкт	600 нм	650 нм	700 нм	750 нм
Ефекти генотипів				
Весь дослід	4,4	4,6	4,8	4,8
Гібриди	6,4	6,9	7,2	7,2
з них — не ваху	3,1	3,2	3,3	3,2
Батьківські сорти (контролі)	9,0	8,8	8,7	—
Ефекти серій				
Весь дослід	1,7	1,5	0,6	0,8
Гібриди	1,7	1,5	1,2	0,8
Батьківські сорти (контролі)	1,4	1,2	1,0	—

ня лише гібридів цей параметр був кращим за 700 і 750 нм. Стосовно ефектів, обумовлених серіями, диференційна здатність знижувалась від майже двох градацій за 600 нм до однієї за 700 і 750 нм. Причину різниці між серіями за коротших хвиль та її зникнення за довших ще належить з'ясувати.

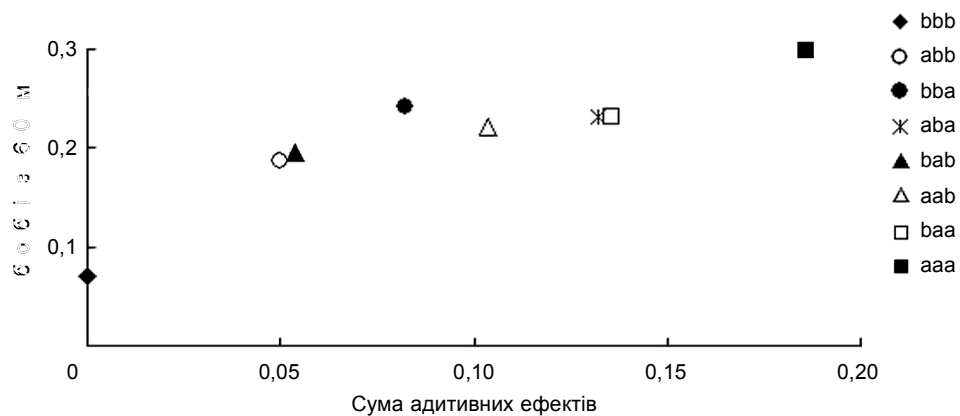
Для генетичного аналізу найбільше практичне значення має встановлення різниці між генотипами. Слід зазначити, що в цьому разі показано переваги отримання оптичних даних із використанням довших хвиль, які доволі інформативні щодо генотипів і на які менше впливають побічні чинники.

Цей висновок узгоджується з результатами нашої попередньої роботи [1], в якій найінформативнішими виявилися дані, отримані за вимірювання при довших хвилях, ніж рекомендовано в літературі (600 нм) [5].

Середній арифметичний ефект алельного стану в локусі Wx-A1, тобто відмінність, пов'язана з наявністю або відсутністю алелів Wx-A1a/Wx-A1b, становив 0,050 одиниці абсорбції.

Середні ефекти впливу функціональних алелів локусів Wx-B1b та Wx-D1a на синтез амілози в крохмалі зерна м'якої пшениці щодо альтернативних нуль-алелів становили відповідно 0,054 і 0,082 одиниці абсорбції.

Кореляція суми ефекту впливу Wx-генів на синтез амілози, визначених дисперсійним аналізом, із фактично отриманими даними з аб-



Порівняння ефектів впливу алельного стану Wx-локусів (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) на вміст амлози в крохмалі генотипів, обчислених за адитивною моделлю взаємодії генів, із фактичними даними абсорбції

сорбції становила $r = 0,90$, що вказує на прийнятність у цілому адитивної моделі взаємодії генів. Загалом кореляція суми ефектів впливу Wx-генів на синтез амлози з відсотковим вмістом цього полімеру в крохмалі, згідно з даними Ямамори [8], дорівнювала $r = 0,77$.

У дослідженнях ознаки ваху слід враховувати особливості її детермінації та вияв компенсаторного ефекту, який полягає в тому, що наявність у генотипі функціонального алеля «а» лише в одному локусі призводить до підвищення накопичення амлози у крохмалі [7, 8]. Рисунок ілюструє фактичні дані абсорбції за довжини хвилі 600 нм відносно сум ефектів впливу алелів Wx-локусів, визначених за адитивною моделлю взаємодії генів. З нього добре видно непропорційний характер вияву ефектів впливу активних алелів Wx-генів на вміст амлози в крохмалі дослідних генотипів та відхилення від адитивності, спричинені ефектом компенсації алелів цих генів. Мінімальна абсорбція, як і очікувалось, спостерігалась у гібридів з трьома нуль-алелями bbb за локусами Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1. За наявності лише одного функціонального алеля «а» у будь-якому з трьох локусів абсорбція в середньому підвищувалась на 0,138 одиниці. Водночас очевидно, що рівень абсорбції амлози сорту Куяльник, який використовували як контроль, у селекційних форм із комбінаціями алелів Wx-локусів abb, bba, aba, bab, aab, baa не досягається. Лише генотипи з трьома алелями aaa за Wx-локусами повністю відтворювали рівень, характерний для батьківської форми сорту Куяльник (див. табл. 2).

Разом з тим у селекційних форм із повним набором мутантних алелів (Wx-A1b, Wx-B1b, Wx-D1b) спектри абсорбції амлози в трьох серіях спектрофотометричних вимірювань були помітно вищими, ніж у батьківської лінії Wx-12. Різниця залежно від довжини хвилі становила від 0,03 до 0,06 одиниці абсорбції (див. табл. 2). Це вказує на те, що досліджені форми хоча й мають однаковий алельний склад за Wx-генами, різняться за вмістом амлози.

Неповне відтворення Wx-фенотипу за наявності нуль-алелів за локусами Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1 може бути пов'язане з наявністю додаткових чинників, які впливають на вміст амлози в крохмалі зерна м'якої пшениці.

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА

1. *Петрова І.В., Хохлов О.М., Чеботар С.В. та ін.* Оптимізація спектрофотометричного визначення вмісту амілози в зерновому крохмалі селекційного матеріалу пшениці // Физиология и биохимия культ. растений. — 2008. — **40**, № 3. — С. 223—230.
2. *Рибалка О.І., Червоніс М.В.* Генетичне різноманіття пшениці у створенні сортів для виробництва біоетанолу // Вісн. аграр. науки. — 2007. — № 9. — С. 32—36.
3. *Delwiche S.R., Graybosch R.* Identification of Waxy wheat by near-infrared reflectance spectroscopy // Cereal Sci. — 2002. — N 35. — P. 29—38.
4. *Foley W.J., McIlwee A., Lawler I.* Ecological applications of near-infrared reflectance spectroscopy a tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance // Oecologia. — 1998. — N 116. — P. 293—305.
5. *Fujita N., Hasegawa H., Taira T.* The isolation and characterization of a Wx mutant of diploid wheat (*Triticum monococcum* L.) // Plant Sci. — 2001. — **160**. — P. 595—602.
6. *Schulman A.H., Tomooka S., Suzuki A., Hizukuri S.* Structural analysis of starch (*Hordeum vulgare* L.) // Carbohydr. Res. — 1995. — **275**. — P. 361—369.
7. *Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M.* Molecular characterization of waxy mutations in wheat // Mol. Gen. Genet. — 1999. — **261**. — P. 463—471.
8. *Yamamori M., Nakamura T., Endo T.R., Nagamine T.* Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat // Theor. Appl. Gen. — 1994. — **89**. — P. 179—184.

Отримано 17.04.2009

МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ АМИЛОЗЫ В КРАХМАЛЕ ЗЕРНА СЕЛЕКЦИОННЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ

И.В. Петрова,¹ А.Н. Хохлов,² С.В. Чеботарь,¹ Ю.М. Сиволан¹

¹Южный биотехнологический центр в растениеводстве Украинской академии аграрных наук, Одесса

²Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноводства и сортоизучения Украинской академии аграрных наук, Одесса

В системе трехфакторного дисперсионного анализа дана метрологическая характеристика метода спектрофотометрического определения содержания амилозы в крахмале зерна пшеницы (оценены повторяемость, воспроизводимость, дифференцирующая способность). Для характеристики различий, обусловленных генотипами, показаны преимущества применения более длинных волн (700—750 нм). Определены эффекты влияния аллельного состояния Wx-локусов (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) на содержание амилозы в крахмале генотипов гибридной популяции. Средние эффекты влияния функциональных аллелей Wx-A1a, Wx-B1a, Wx-D1a составляли соответственно 0,050, 0,054, 0,082 единицы оптической плотности. Отмечены отклонения от аддитивности, обусловленные компенсаторным эффектом. Показано неполное воспроизведение Wx-фенотипа при наличии нуль-аллелей по локусам Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1 у селекционных форм.

METROLOGICAL CHARACTERISTIC OF THE METHOD OF SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF THE AMYLOSE CONTENT IN THE GRAIN STARCH OF THE BREEDING WHEAT LINES

I.V. Petrova,¹ A.N. Khokhlov,² S.V. Chebotar,¹ Yu.M. Sivolap¹

¹South Plant Biotechnology Center, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences
3 Ovidiopolska road, Odessa, 65036, Ukraine

²Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigation,
Ukrainian Academy of Agrarian Sciences
3 Ovidiopolska road, Odessa, 65036, Ukraine

The metrological characteristic of the method of spectrophotometry determination of the amylose content in the wheat starch was conducted in the system of three-factors analysis of variance (the repeatability, the reproducibility and the separation ability) were studied. In this aspect the advan-

tages of the application of long waves (700—750 nm) for the description of the distinctions caused by genotypes have been shown. The effects of the allelic state of the Wx-loci (Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1) on the amylose content in the starch of the hybride population genotypes were studied. The average effects of functional alleles Wx-A1a, Wx-B1a, Wx-D1a on amylose content have been determined as 0,050; 0,054; 0,082 units of optical density, accordingly. It should be noted that the deviation from the additiveness was due to the compensatory effect. It was shown that Wx-phenotype couldn't be completely reproduced in the presence of null-alleles by Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1 loci.

Key words: wheat, breeding, Wx-genes, amylose, spectrophotometry.