

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СУБЪЕДИНИЦ ГЛЮТЕНИНА ДИКОЙ ПОЛБЫ (*TRITICUM DICOCOIDES*)

О.А. ОРЛОВСКАЯ\*, К.К. ЯЦЕВИЧ, С.И. ВАКУЛА, Л.В. ХОТЫЛЕВА, А.В. КИЛЬЧЕВСКИЙ

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск

E-mail: O.Orlovskaya@igc.by

Проведена идентификация и молекулярный анализ высокомолекулярных субъединиц глютеина (HMW-GS) образца дикой полбы *T. dicoccoides* K5199. Выявлены новые HMW субъединицы глютеина 1AxTd и 1ByTd. Определены нуклеотидные последовательности генов 1AxTd и 1ByTd (коды доступа в базе данных GenBank MN475136 и MG897125 соответственно). Установлено, что кодирующая последовательность гена 1AxTd имеет наибольшее сходство с геном 1Ax1 *T. aestivum* (99,7%), в то время как последовательность гена 1ByTd – с генами других образцов *T. dicoccoides* (98,5 и 97,6%). Первичная и вторичная структуры белка исследованных HMW-GS позволяют прогнозировать высокий вклад в хлебопекарные свойства субъединицы 1AxTd и средний вклад субъединицы 1ByTd. Оценка важнейших критериев качества зерна показала повышенное содержание белка и клейковины, но сниженные реологические характеристики клейковины *T. dicoccoides* K5199.

**Ключевые слова:** *T. dicoccoides*, HMW-GS, SDS-электрофорез, секвенирование, первичная и вторичная структура белка, качество зерна.

**Введение.** Дикая полба *T. dicoccoides* (Körn. exAschers. etGraebn.) Schweinf.,  $2n = 4x = 28$ , AABB) является древнейшим тетраплоидным видом рода *Triticum*, в процессе доместикиации из которого человеком были выделены другие виды пшениц [1]. *T. dicoccoides* произрастает в различных экологических условиях и характеризуется широкой вариабельностью по признакам продуктивности, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам [2]. Кроме того, генофонд дикой полбы представляет интерес для улучшения мягкой пшеницы по биологической ценности и хлебопекарным свойствам зерна [3, 4].

Известно, что существенное влияние на качество хлеба оказывают высокомолекулярные субъединицы запасных белков глютеинов (HMW-GS), которые кодируются локусами *Glu-*

*1* (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*), расположенными на длинных плечах хромосом первой гомеологичной группы [5]. Каждый из этих локусов состоит из двух тесно сцепленных генов, кодирующих субъединицы x- и y-типа [6]. Теоретически мягкая пшеница (*T. aestivum* L.) может содержать 6 субъединиц высокомолекулярных глютеинов, но из-за замолкания некоторых кодирующих их генов для сортов мягкой пшеницы характерны 3–5 субъединиц (всегда присутствуют – Vx, Dx, Du и дополнительно могут быть – Vu и Ax). Гены, отвечающие за синтез субъединицы 1Au, обычно не экспрессируются в сортах гексаплоидной пшеницы [7].

Свойства пшеничного теста зависят от состава аллелей локусов *Glu-1*. Разработана классификация, согласно которой каждой субъединице высокомолекулярных глютеинов или совместно наследуемой комбинации субъединиц присваивается балл качества (от 1 до 4) [8]. Например, комбинация субъединиц Dx5+ +Du10 оказывает более положительный эффект на хлебопекарные свойства (4 балла), чем Dx2+Du12 (2 балла) [9]. В литературе имеются сведения о негативном влиянии на качество теста HMW-GS Vx20 и Vu20 [10, 11].

Известно, что для локусов *Glu-1* характерен множественный аллелизм [12, 13]. Однако генетическая изменчивость по аллелям данных локусов у сортов мягкой пшеницы в процессе современной селекции уменьшилась в несколько раз [14]. Исследования зарубежных ученых показали, что аллельное разнообразие локусов *Glu-1* у видов рода *Triticum* несравненно богаче, чем у культивируемых сортов пшеницы. HMW-GS с новой структурной характеристикой были идентифицированы у *T. urartu* [15], *A. tauschii* [16], *T. dicoccoides* [17], видов *Aegilops* [18]. В связи с этим, сородичи *T. aestivum* представляют большой интерес для расширения генетического разнообразия локусов *Glu-1* коммерческих сортов пшеницы. Цель дан-

© О.А. ОРЛОВСКАЯ, К.К. ЯЦЕВИЧ, С.И. ВАКУЛА, Л.В. ХОТЫЛЕВА, А.В. КИЛЬЧЕВСКИЙ, 2020

ного исследования — идентификация, молекулярный анализ HMW-GS дикой полбы *T. dicoccoides* K5199 и оценка качества зерна данного образца.

**Материалы и методы.** В работе использовали образец полбы *T. dicoccoides* K5199 ( $2n = 4x = 28$ , AABB) из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова. Глютенины выделяли по методике Singh et al. 1991 [19] и анализировали в SDS-PAGE [20] в вертикальной электрофоретической камере Maxigel (Biometra-Biomedizinische). HMW-GS определяли по номенклатурной системе Рауне [6]. Для идентификации HMW-GS в качестве стандарта выступал сорт мягкой пшеницы Новосибирская 67, имеющий следующий состав субъединиц: 1Ax1, 1Bx7+1By8, Dx2+Dy12.

На основании нуклеотидных последовательностей генов базы данных GenBank были подобраны пары праймеров, перекрывающие участки полноразмерных генов *1AxTd* и *1ByTd* образца *T. dicoccoides* K5199 (табл. 1).

Секвенирование фрагментов осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Су-

le Sequencing kit (Applied Biosystems). Для компьютерной обработки данных, полученных в результате секвенирования, пользовались программой Sequencing Analysis Software v5.2 (Applied Biosystems); для анализа гомологии нуклеотидных последовательностей — базой данных GenBank при помощи анализатора BLAST Национального центра биотехнологической информации США. Нуклеотидную последовательность исследованных генов транслировали в аминокислотную последовательность с помощью OFR Finder NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ofrfinder>). Вторичную структуру белков предсказывали на on-line сервере CFSSP [21]. Филогенетическое дерево строили на основе нуклеотидных последовательностей генов HMW-GS с помощью программы MEGA4 [22].

Для оценки качества зерна использовали следующие показатели: содержание белка (ГОСТ 10846-91), массовая доля и качество клейковины (ГОСТ 9353-90). Данные анализы проводили в Центральной республиканской лаборатории по определению качества новых сортов растений ГУ «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений» (г. Минск, РБ).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Анализ состава HMW-GS методом электрофо-

Таблица 1. Праймеры для амплификации фрагментов генов *1AxTd* и *1ByTd* образца *T. dicoccoides* K5199

| Праймер  | Последовательность праймеров (5'→3') | Размер продуктов амплификации, п.н. |
|----------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| Ax1F     | AGACCGTCCAAAAATCTGTTTTACA            | ≈ 580                               |
| Ax579R   | TAGTGCAGGTATTCCCCAAA                 |                                     |
| Ax232F   | TCCAAGGGTGGATCTTTCTA                 | ≈ 790                               |
| Ax1024R  | СТААТТGCTGCTCTTGTGTT                 |                                     |
| Ax1266F  | ATCAACACAAGAGCAGCAAT                 | ≈ 680                               |
| Ax1946R  | CCTGGCTGCAACGGA                      |                                     |
| Ax1932F  | TCCGTTGCAGCCAGG                      | ≈ 830                               |
| Ax2645R  | СТАСТАCTGGCTGGCCAACAATGC             |                                     |
| By_1F    | GATCCTATGTTAATTTAGACATGAAT           | ≈ 730                               |
| By_729R  | ATGGACTGTTAGTGAATTGATCTC             |                                     |
| By_608F  | CACACAACCATTGTCCC                    | ≈ 750                               |
| By_1361R | GCAGAGAAGTTGGGTAGTATC                |                                     |
| By_9F    | TTCTCTGCATCAGTCAGGA                  | ≈ 662                               |
| By_9R    | AGAGAAGCTGTGTAATGCC                  |                                     |
| By9R-F   | GGCATTACACAGCTTCTCT                  | ≈ 740                               |
| By_2720R | GTCCCTGGTTGGTGTCC                    |                                     |
| By_2301F | ACCCAGCTTCTCTGCAGC                   | ≈ 590                               |
| By_2887R | TCACTGGCTAGCCGATAATG                 |                                     |

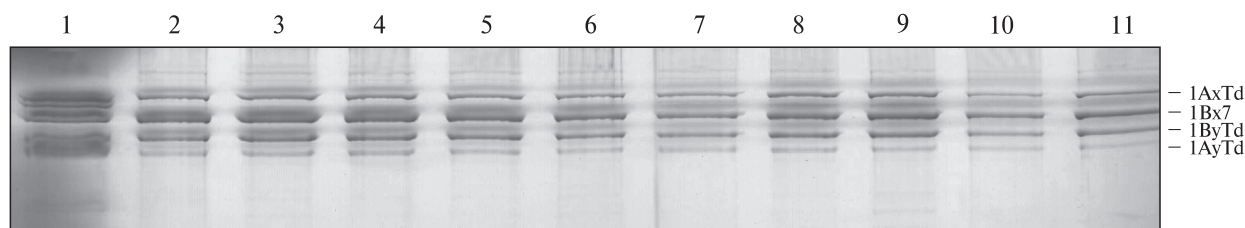


Рис. 1. Электрофореграмма HMW-GS в SDS-PAGE: 1 – сорт пшеницы Новосибирская 67; 2–11 – *T. dicoccoides* K5199

реза в SDS-PAGE показал, что образец *T. dicoccoides* K5199 имеет 4 высокомолекулярные субъединицы глютеина, из которых только субъединица 1Bx7 (кодируется аллелем *Glu-B1-1a*) часто встречается у сортов мягкой пшеницы (рис. 1). Электрофоретическая подвижность субъединиц 1Ax и 1By исследованного образца ниже, чем у субъединиц 1Ax1 и 1By8 сорта Новосибирская 67, соответственно. Кроме того, для *T. dicoccoides* K5199 выявлена субъединица 1Ay, которая отсутствует практически у всех коммерческих сортов мягкой пшеницы. Особенно представляют интерес обнаруженные новые аллели в локусе *Glu-A1*, так как вклад данного локуса в формирование качества хлеба выше, чем локуса *Glu-B1* [23]. Однако изучение генетического разнообразия сортов пшеницы различной селекции по составу субъединиц глютеина показало, что локус *Glu-A1* представлен, как правило, только 3 аллелями, кодирующими субъединицы 1, 2\* и null. При этом в коллекциях некоторых регионов большая часть образцов содержит аллель «с» (null). Сорта пшеницы, несущие данный аллель, как правило, характеризуются низким качеством зерна и имеют в большей степени кормовое значение [24].

На основании нуклеотидных последовательностей генов, размещенных в базе GenBank, нами были подобраны праймеры для амплификации фрагментов генов образца *T. dicoccoides* K5199 (табл. 1). Секвенированием по Сэнгеру определены нуклеотидные последовательности генов *1AxTd* и *1ByTd*, которые зарегистрированы в международной молекулярной базе данных (коды доступа MN475136 и MG897125 соответственно). Длина кодирующей последовательности гена *1AxTd* составляет 2490 п.н. и имеет наибольшее сходство с

*1Ax1 T. aestivum* (X61009) 99,7 %. Данные гены отличаются только 7 однонуклеотидными заменами (SNP), которые приводят к 4 заменам в аминокислотной последовательности белка (SAP). Достаточно высокий уровень идентичности установлен с геном *1Ax1 T. dicoccoides* (KU745285) – 98,9 %. Различия между ними были также только в виде SNP (23 транзиции и 4 трансверсии), 13 из которых вызывают изменения в первичной структуре белка.

Белок, кодируемый геном *1AxTd* образца *T. dicoccoides* K5199, состоит из 830 аминокислот и имеет типичную структуру высокомолекулярных субъединиц глютеина х-типа: сигнальный пептид (21 аминокислоты); N-концевой домен (A, 86 аминокислот); центральный домен (B, 681 аминокислота); C-концевой домен (C, 42 аминокислоты). Влияние HMW субъединиц глютеина на качество хлеба, главным образом, заключается в их возможности формировать ковалентные дисульфидные связи, определяющие эластичные свойства клейковины [25]. S-S-связи образуются цистеиновыми остатками, которые, как правило, содержатся в концевых доменах. Согласно литературным данным, большинство субъединиц х-типа имеют четыре цистеиновых остатка (три – в А-доме и один – в С-доме), из которых два остатка домена А формируют внутримолекулярные, а остальные два – межмолекулярные дисульфидные связи [25]. Кроме числа цистеиновых остатков влияние на хлебопекарные свойства оказывает размер HMW-GS [26]. Считается, что чем больше аминокислотных остатков содержит субъединица, тем более положительный эффект она оказывает на качество теста [27]. Различия в размере субъединиц обусловлены протяженностью центрального домена, состоящего из пов-

торяющихся гексапептидов (последовательность QQPGQG) с включением гексапептидов типа YYPTSL и трипептидов типа QQR или QPG [28]. Например, субъединица Dx5 содержит дополнительный цистеин для формирования межмолекулярных связей, в сравнении с Dx2; а Dy10 имеет большую длину центрального домена, чем Dy12 [29]. В результате чего, комбинация субъединиц Dx5+Dy10 обеспечивает высокие хлебопекарные свойства и ей присвоен самый высокий балл качества (4 балла), а Dx2+Dy12 оказывает негативное влияние на силу теста (2 балла).

Субъединица 1AxTd образца *T. dicoccoides* K5199 имела такое же количество цистеиновых остатков (4), как большинство субъединиц из базы данных GenBank (табл. 2). Длина изученной нами субъединицы была как у субъединицы 1Ax1 *T. aestivum*, которая согласно литературным данным определяет хорошие хлебопекарные качества [30].

Нами установлено, что длина кодирующей последовательности гена 1ByTd образца *T. dicoccoides* K5199 составляет 2154 п.н., соответствующий ему белок состоит из 717 аминокислот. Для нуклеотидной последовательности данного гена выявлен высокий уровень сходства с генами других образцов *T. dicoccoides* – 1By15\*, KJ666136 (98,5 %) и 1By, KJ666135 (97,6 %). Отличия между нуклеотидными последовательностями генов 1ByTd и 1By15\* заключаются в

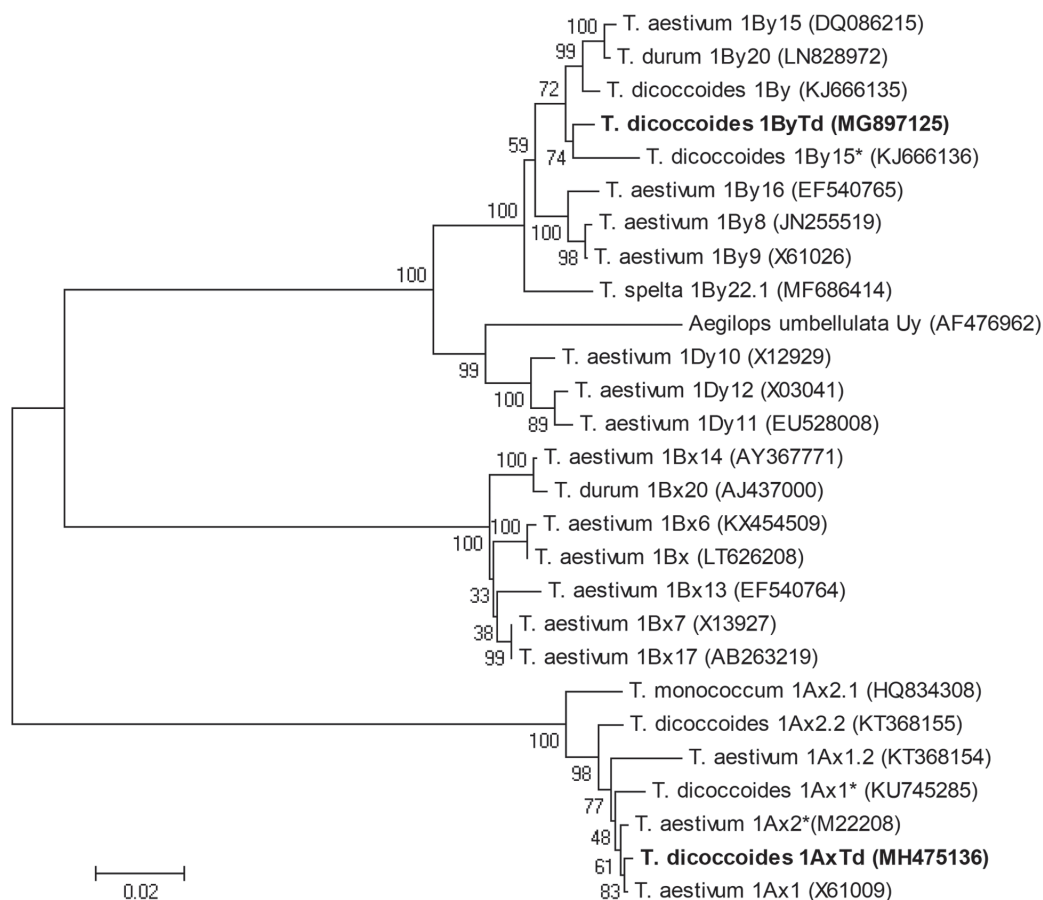
32 SNP (19 транзиций и 13 трансверсий), 18 из которых приводят к изменениям в аминокислотной последовательности белка. При сравнении с генами, широко распространенными среди сортов мягкой пшеницы, наибольший уровень идентичности обнаружен с последовательностью гена 1By9, X61026 (96,3 %). Идентифицированы 42 транзиции и 35 трансверсии, 35 SAPs. Кроме того, в последовательности 1By9 есть делеция в 45 п.н. в позиции 1791–1835 и инсерция в 9 п.н. (2093–2101).

ДНК-последовательность гена 1ByTd была транслирована в гипотетическую последовательность аминокислот, которая имела типичную структуру высокомолекулярных субъединиц глютеина у-типа: сигнальный пептид (21 аминокислоты); N – концевой домен (A, 104 аминокислоты); центральный домен (B, 550 аминокислот); C – концевой домен (C, 42 аминокислоты). Число и расположение цистеиновых остатков, которые дают возможность образовывать межмолекулярные дисульфидные связи, ответственные за упругие свойства клейковинных белков, у данной субъединицы не отличалась от других субъединиц у-типа из базы данных GeneBank (табл. 2). Что касается размера белка, то аминокислотная последовательность в повторяющемся домене субъединицы 1ByTd была больше на 12 остатков по сравнению с последовательностью 1By9, которая обеспечивает невысокое качество клейко-

Таблица 2. Аминокислотная последовательность субъединиц 1AxTd, 1ByTd *T. dicoccoides* K5199 и 1Ax, 1By субъединиц высокомолекулярных глютеинов *T. aestivum*

| Субъединица  | Номер доступа в GenBank | Вид                          | Количество остатков |            |            |           |            |             |          |          |          |
|--------------|-------------------------|------------------------------|---------------------|------------|------------|-----------|------------|-------------|----------|----------|----------|
|              |                         |                              | аминокислотных      |            |            |           |            | цистеиновых |          |          |          |
|              |                         |                              | SP                  | NT         | CR         | CT        | всего      | NT          | CR       | CT       | всего    |
| <b>1AxTd</b> | <b>MH475136</b>         | <b><i>T. dicoccoides</i></b> | <b>21</b>           | <b>86</b>  | <b>681</b> | <b>42</b> | <b>830</b> | <b>3</b>    | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>4</b> |
| 1Ax1         | X61009                  | <i>T. aestivum</i>           | 21                  | 86         | 681        | 42        | 830        | 3           | 0        | 1        | 4        |
| 1Ax2         | M22208                  | <i>T. aestivum</i>           | 21                  | 86         | 666        | 42        | 815        | 3           | 0        | 1        | 4        |
| <b>1ByTd</b> | <b>MG897125</b>         | <b><i>T. dicoccoides</i></b> | <b>21</b>           | <b>104</b> | <b>550</b> | <b>42</b> | <b>717</b> | <b>3</b>    | <b>3</b> | <b>1</b> | <b>7</b> |
| 1By8         | JN255519                | <i>T. aestivum</i>           | 21                  | 104        | 553        | 42        | 720        | 3           | 3        | 1        | 7        |
| 1By9         | X61026                  | <i>T. aestivum</i>           | 21                  | 104        | 538        | 42        | 705        | 3           | 3        | 1        | 7        |
| 1By15        | DQ086215                | <i>T. aestivum</i>           | 21                  | 104        | 556        | 42        | 723        | 3           | 3        | 1        | 7        |

Примечания. SP – сигнальный пептид, NT – N-концевой домен, CR – центральный (повторяющийся) домен, CT – C-концевой домен.



**Рис. 2.** Филогенетическое дерево HMW-GS генов, построенное на основе полных нуклеотидных последовательностей кодирующих регионов ДНК. Выделены последовательности исследованного нами образца *T. dicoccoides* K5199

вины, но немного ниже при сравнении с субъединицами 1By8 и 1By15, имеющими высокий балл качества (табл. 2).

Были изучены филогенетические связи между HMW-GS исследованного образца полбы и субъединицами других представителей рода *Triticum*. Для анализа использовали описанные нами нуклеотидные последовательности генов *1AxTd*, *1ByTd* и другие 25 генов HMW-GS из базы данных GenBank (рис. 2). На построенном филогенетическом дереве можно выделить 4 субкластера, которые состоят из генов, кодирующих субъединицы 1By, 1Dy, 1Bx, 1Ax соответственно. *1AxTd* *T. dicoccoides* K5199 кластеризовался с геном *1Ax1* *T. aestivum* (X61009) с высоким значением бутстрепа 83, что говорит об их тесном родстве. Согласно филогенетическому анализу ген *1ByTd* входит в субклас-

тер 1By аллелей и большее сходство имеет с образцами полбы, а не мягкой пшеницы (рис. 2).

Вторичная структура белка ( $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -turns) также играет важную роль в определении его свойств. Существует мнение, что большее количество таких структурных мотивов, как  $\beta$ -sheet, связано с более высоким качеством клейковины [27, 31]. В частности, установлено, что  $\beta$ -sheet играют роль в обеспечении эластичности белка, повышая его способность противостоять значительным нагрузкам без нарушения целостности структуры [27]. Вторичная структура субъединицы *1AxTd* *T. dicoccoides* K5199 и *1Ax* субъединиц высокомолекулярных глютеинов *T. aestivum* с известными свойствами предсказана с использованием CFSSP (табл. 3). Сравнительный анализ вторичной структуры белка выявил, что субъединица *1AxTd*

по количеству  $\alpha$ -helix была на уровне субъединицы 1Ax1, но уступала ей по числу  $\beta$ -sheet, хотя и незначительно (табл. 3).

Предсказанная вторичная структура субъединицы 1ByTd существенно не отличалась от других субъединиц у-типа. В частности распределение структурных мотивов в концевых доменах было идентичным для всех изученных субъединиц (табл. 3). Можно отметить содержание в центральном домене субъединицы 1ByTd  $\alpha$ -helix, которое было самым высоким среди проанализированных образцов. Такое количество (24) данного структурного мотива отмечено еще только у высокоранжируемой по качеству субъединицы 1By15 (табл. 3). Однако число  $\beta$ -sheet у 1ByTd *T. dicoccoides* K5199 было ниже, чем у субъединицы 1By15 и достигало только уровня субъединицы с невысоким вкладом в качество клейковины 1By9 (табл. 3).

Исходя из сравнительного анализа первичной и вторичной структур белка выявленных нами HMW-GS дикорастущей полбы с субъ-

единицами мягкой пшеницы с известными эффектами на хлебопекарные свойства, можно предположить высокий и средний вклад в качество 1AxTd и 1ByTd *T. dicoccoides* K5199 соответственно.

Хлебопекарные свойства мягкой пшеницы в значительной степени определяются ее белковостью и коррелирующим с этим показателем количеством клейковины. Содержание общего белка у сильных пшениц должно быть не менее 14,5 %, а клейковины – не менее 28 %. В результате проведенных исследований у изученного образца полбы установлено высокое количество как белка (26,05 %), так и клейковины (50,9 %). Качество клейковины, обусловленное ее физико-химическими показателями (растяжимость, упругость, эластичность, вязкость), определяли по величине деформации ее шарика под действием нагрузки сжатия с использованием прибора ИДК. Согласно полученным данным реологические свойства клейковины *T. dicoccoides*

Таблица 3. Предсказанная вторичная структура 1Ax и 1By субъединиц высокомолекулярных глютеинов

| Субъединица | Номер доступа в GenBank | Вид                         | Структурные мотивы | Количество структурных мотивов в различных доменах белка |    |    |
|-------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------|--|----|----|
|             |                         |                             |                    | NT   | CR | CT |
| 1AxTd       | MH475136                | <i>T. dicoccoides</i> K5199 | $\alpha$ -helix    | 7  | 26 | 1  |
|             |                         |                             | $\beta$ -sheet     | 5  | 32 | –  |
|             |                         |                             | $\beta$ -turns     | 7  | 86 | 3  |
| 1Ax1        | X61009                  | <i>T. aestivum</i>          | $\alpha$ -helix    | 7  | 26 | 1  |
|             |                         |                             | $\beta$ -sheet     | 5  | 34 | –  |
|             |                         |                             | $\beta$ -turns     | 7  | 84 | 3  |
| 1Ax2        | M22208                  | <i>T. aestivum</i>          | $\alpha$ -helix    | 7  | 29 | 1  |
|             |                         |                             | $\beta$ -sheet     | 5  | 31 | –  |
|             |                         |                             | $\beta$ -turns     | 7  | 87 | 3  |
| 1ByTd       | MG897125                | <i>T. dicoccoides</i>       | $\alpha$ -helix    | 5  | 24 | 3  |
|             |                         |                             | $\beta$ -sheet     | 6  | 22 | 2  |
|             |                         |                             | $\beta$ -turns     | 6  | 83 | 4  |
| 1By8        | JN255519                | <i>T. aestivum</i>          | $\alpha$ -helix    | 5  | 22 | 3  |
|             |                         |                             | $\beta$ -sheet     | 6  | 24 | 2  |
|             |                         |                             | $\beta$ -turns     | 6  | 83 | 4  |
| 1By9        | X61026                  | <i>T. aestivum</i>          | $\alpha$ -helix    | 5  | 18 | 3  |
|             |                         |                             | $\beta$ -sheet     | 6  | 22 | 2  |
|             |                         |                             | $\beta$ -turns     | 6  | 83 | 4  |
| 1By15       | DQ086215                | <i>T. aestivum</i>          | $\alpha$ -helix    | 5  | 24 | 3  |
|             |                         |                             | $\beta$ -sheet     | 6  | 23 | 2  |
|             |                         |                             | $\beta$ -turns     | 6  | 83 | 4  |

Примечания. NT – N-концевой домен, CR – центральный (повторяющийся) домен, CT – C-концевой домен.

K5199 были невысоки (III группа качества). В чистом виде мука этого образца не может использоваться в хлебопечении, а нуждается в улучшении. В работах зарубежных ученых также встречаются сведения о невысоком качестве клейковины образцов дикорастущей полбы [32]. Известно, что в контроле вязко-эластичных свойств клейковины участвуют не только локусы *Glu-1*, но также *Glu-3*, определяющие компонентный состав низкомолекулярных глютеинов, и *Gli*, кодирующие спирто-растворимые белки глиадины [33]. Возможно, негативное влияние на хлебопекарные свойства оказывают другие гены. Например, ухудшение качества клейковины может происходить за счет редких глиадинов, которые не способны образовывать внутрицепочечные S-S связи из-за нечетного числа остатков цистеина или по стерическим причинам, что приводит к блокированию полимеризации глютеинов [34]. В связи с этим существует мнение, что необходимо исследовать влияние на силу теста не только HMW-GS, но и глиадинов [35].

Таким образом, у образца *T. dicoccoides* K5199 выявлены новые субъединицы высокомолекулярных глютеинов 1AxTd и 1ByTd, нехарактерные для сортов мягкой пшеницы. В результате проведения секвенирования фрагментов, синтезированных при участии подобранных нами праймеров, определены нуклеотидные последовательности генов *1AxTd* и *1ByTd*, которые зарегистрированы в международной молекулярной базе данных GenBank (коды доступа MH475136 и MG897125 соответственно). Установлено, что кодирующая последовательность гена *1AxTd* имеет наибольшее сходство с геном *1Ax1 T. aestivum* (99,7 %), в то время как последовательность гена *1ByTd* — с генами других образцов *T. dicoccoides* (98,5 и 97,6 %). Проведен сравнительный анализ аминокислотной последовательности и вторичной структуры белка у описанных нами субъединиц с известными субъединицами мягкой пшеницы, оказывающими положительный эффект на эластичные свойства клейковины. Полученные данные позволяют прогнозировать высокий вклад в качество субъединицы 1AxTd и средний вклад субъединицы 1ByTd. Оценка важнейших критериев качества зерна пшеницы показала повышенное содержание белка и

клейковины, но сниженные реологические свойства клейковины в зерне *T. dicoccoides* K5199. Исследованный образец полбы с новыми генами, кодирующими высокомолекулярные субъединицы глютеинов, представляет интерес для расширения генофонда мягкой пшеницы и улучшения ряда показателей качества зерна.

**Соответствие этическим стандартам.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках финансирования Национальной академией наук Беларуси заданий 2.03 и 2.27 Государственной программы научных исследований «Биотехнологии» на 2016–2020 гг., подпрограммы «Структурная и функциональная геномика».

#### CHARACTERIZATION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT GLUTENIN SUBUNITS IN WILD EMMER WHEAT (*TRITICUM DICOCOIDEOS*)

O.A. Orlovskaya, K.K. Yatsevich,  
S.I. Vakula, L.V. Khotyleva, A.V. Kilchevsky

Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,

E-mail: O.Orlovskaya@igc.by

The identification and molecular analysis of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) of the wild emmer wheat *T. dicoccoides* K5199 were carried out. Novel HMW glutenin subunits 1AxTd and 1ByTd were identified. The nucleotide sequences of *1AxTd* and *1ByTd* genes were detected (access codes in the GenBank are MH475136 and MG897125, respectively). The coding sequence of *1AxTd* was similar to *1Ax1* of *T. aestivum* (99,7 %), while the *1ByTd* gene sequence was similar to the genes of other *T. dicoccoides* samples (98,5 and 97,6 %). The primary and secondary protein structures of the studied HMW-GS allow us to predict a high contribution of the 1AxTd subunit to the bread-making qualities and the average contribution of 1ByTd thereto. The evaluation of the most important grain quality traits revealed the increased content of protein and gluten, along with the reduced rheological properties of *T. dicoccoides* K5199 gluten.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ СУБДИНИЦЬ ГЛЮТЕНИНУ ДИКОЇ ПОЛБИ (*TRITICUM DICOCOIDEOS*)

О.А. Орловська, К.К. Яцевич,  
С.В. Вакула, Л.В. Хотилева, А.В. Кільчевський

Проведено ідентифікацію і молекулярний аналіз високомолекулярних субодиниць глютеніна (HMW-GS) зразка дикої полби *T. dicoccoides* K5199. Виявлено нові HMW субодиниці глютеніна 1AxTd і 1ByTd. Визначено нуклеотидні послідовності генів 1AxTd і 1ByTd (коди доступу в базі даних GenBank MN475136 і MG897125 відповідно). Встановлено, що кодує послідовність гена 1AxTd має найбільшу схожість з геном 1Ax1 *T. aestivum* (99,7 %), в той час як послідовність гена 1ByTd з генами інших зразків *T. dicoccoides* (98,5 і 97,6 %). Первинна і вторинна структури білка досліджених HMW-GS дозволяють прогнозувати високий внесок в хлібопекарські свойства субодиниці 1AxTd і середній внесок субодиниці 1ByTd. Оцінка найважливіших критеріїв якості зерна показала підвищений вміст білка і клейковини, але знижені реологічні характеристики клейковини *T. dicoccoides* K5199.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Goncharov, N.P., Kondratenko, E.Ya., Wheat origin, domestication and evolution, *Vestnik VOGiS*, 2008, vol. 12, no. 1/2, pp. 15979 (in Russian).
- Özkan, H., Willcox, G., Graner, A., Salamini, F., and Kilian, B., Geographic distribution and domestication of wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*), *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2011, vol. 58, no. 1, pp. 1153. doi: 10.1007/s10722-010-9581-5.
- Cakmak, I., Torun, A., Millet, E., Feldman, M., Fahima, T., Korol, A.B., Nevo, E., Braun, H.J., and Özkan, H., *Triticum dicoccoides*: an important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat, *Soil Sci. Plant Nutr.*, 2004, vol. 50, no. 7, pp. 104754. doi:10.1080/00380768.2004.10408573.
- Jiang, Z.L., Wu, B.H., Wang, Z.Z., Hu, J.L., Yuan, J., Chen, H.L., Liu, J., Zheng, Y.L., and Liu, D.C., Enriching novel Glu-Ax alleles and significantly strengthening gluten properties of common wheat through wide hybridization with wild emmer, *J. Cereal Sci.*, 2017, vol. 76, pp. 2719. doi: 10/1016/j.jcs.2017.04.018.
- Ribeiro, M., Miranda, J., and Branlard, G., One hundred years of grain omics: identifying the glutes that feed the world, *J. Proteome Res.*, 2013, vol. 12, no. 11, pp. 4702–16. doi: 10.1021/pr400663t.
- Payne, P.I., Lawrence, G.J., Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1* which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat, *Cereal Res. Com.*, 1983, vol. 11, no. 1, pp. 2935.
- Sun, M., Yan, Y., Jiang, Y., Xiao, Y., Hu, Y., Cai, M., Li, Y., Hsam, S.L.K., and Zeller, F.J., Molecular cloning and comparative analysis of a y-type inactive HMW glutenin subunit gene from cultivated emmer wheat (*Triticum dicoccum*L.), *Hereditas*, 2004, vol. 141, no. 1, pp. 46–54. doi: 10.1111/j.1601-5223.2004.01835.x.
- Payne, P.I., Nightingale, M.A., Krattiger, A.F., and Holt, L.M., The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties, *J. Sci. Food Agric.*, 1987, vol. 40, no. 1, pp. 51–65. doi: 10.1002/jsfa.2740400108.
- Liang, D., Tang, J., Peca, R.J., Singh, R., He, X., Shen, X., Yao, D., Xia, X., and He, Z., Characterization of CIMMYT bread wheats for high- and low-molecular weight glutenin subunits and other quality-related genes with SDS-PAGE, RP-HPLC and molecular markers, *Euphytica*, 2010, vol. 172, no. 2, pp 235–50. doi: 10.1007/s10681-009-0054-x.
- Shewry, P.R., Gilbert, S.M., Savage, A.W.J., Tatham, A.S., Wan, Y.F., Belton, P.S., Wellner, N., D'Ovidio, R., Békéýs, F., and Halford, N.G., Sequence and properties of HMW subunit 1Bx20 from pasta wheat (*Triticum durum*) which is associated with poor end use properties, *Theor. Appl. Genet.*, 2003, vol. 106, no. 4, pp. 744–50. doi: 10.1007/s00122-002-1135-6.
- Santagati, V.D., Sestili, F., Lafiandra, D., D'Ovidio, R., Rognaux, H., and Masci, S., Characterization of durum wheat high molecular weight glutenin subunits Bx20 and By20 sequences by a molecular and proteomic approach, *J. Mass Spectrom.*, 2016, vol. 51, no. 7, pp. 5127. doi: 10.1002/jms.3776.
- Branlard, G., Dardevet, M., Amiour, N., and Igrejas, G., Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.), *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2003, vol. 50, no. 7, pp. 669–79. doi: 10.1023/A:1025077005401.
- Li, Y., Zhou, R., Branlard, G., and Jia, J., Development of introgression lines with 18 alleles of glutenin subunit and evaluation of the effects of various alleles on quality related traits in wheat (*Triticum aestivum* L.), *J. Cereal Sci.*, 2010, vol. 51, no. 1, pp. 127–33. doi: 10.1016/j.jcs.2009.10.008.
- Novoselskaya-Dragovich, A.Yu., Genetics and genomics of wheat: storage proteins, ecological plasticity, and immunity, *Rus. J. Genet.*, 2015, vol. 51, no. 5, pp. 47690. doi: 10.1134/S102279541505004X.
- Caballero, L., Martin, L.M., and Alvarez, J.B., Allelic variation for the high- and low-molecular-weight glutenin subunits in wild diploid wheat (*Triticum urartu*) and its comparison with durum



- wheat, *Australian J. Agr. Res.*, 2008, vol. 59, pp. 906–10. doi: 10.1071.AR08065.
16. Lua, C.M., Yanga, W.Y., Zhanga, W.J., and Lua, B.-R., Identification of SNPs and development of allelic specific PCR markers for high molecular weight glutenin subunit D<sup>x</sup>1.5 from *Aegilops tauschii* through sequence characterization, *J. Cereal Sci.*, 2005, vol. 41, pp. 13–8. doi: 10.1016/j.jcs.2004.05.006.
  17. Margiotta, B., Colaprici, G., and Urbano, M., Polymorphism of high Mr glutenin subunits in wild emmer *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*: chromatographic, electrophoretic separation and PCR analysis of their encoding genes, *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2014, vol. 61, no. 2, pp. 33143. doi: 10.1007/s10722-013-0037-6.
  18. Liu, Z., Yan, Z., Wan, Y., Liu, K., Zheng, Y., and Wang, D., Analysis of HMW glutenin subunits and their coding sequences in two diploid *Aegilops* species, *Theor. Appl. Genet.*, 2003, vol. 106, no. 8, pp. 1368–78. doi: 10.1007/s00122-002-1175-y.
  19. Singh, N.K., Shepherd, K.W., and Cornish, G.B., A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin, *J. Cereal Sci.*, 1991, vol. 14, no. 3, pp. 203–8. doi: 10.1016/S0733-5210(09)80039-8.
  20. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–5.
  21. Kumar, T.A., CFSSP: Chou and Fasman secondary structure prediction server, *Wide spectrum*, 2013, vol. 1, no. 9, pp. 15–9. doi: 10.5281/zenodo.50733.
  22. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S., MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2007, vol. 24, no. 8, pp. 1596–9. doi: 10.1093/molbev/msm092.
  23. Dobrotvorskaya, T.V., Martynov, S.P., Analysis of diversity of Russian and Ukrainian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars for high-molecular-weight glutenin subunits, *Rus. J. Genet.*, 2011, vol. 47, no. 7, pp. 799812. doi: 10.1134/S1022795411070052.
  24. Ribeiro, M., Bancel, E., Faye, A., Dardevet, M., Ravel, C., Branlard, G., and Igrejas, G., Proteogenomic characterization of novel x-type high molecular weight glutenin subunit 1Ax1.1, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 3, pp. 565067. doi: 10.3390/IJMS1403-5650.
  25. Shewry, P.R., Tatham, A.S., Disulphide bonds in wheat gluten proteins, *J. Cereal Sci.*, 1997, vol. 25, pp. 207–27.
  26. Wieser, H., Zimmermann, G., Importance of amounts and proportions of high molecular weight subunits of glutenin for wheat quality, *Eur. Food Res. Technol.* 2000, vol. 210, no. 5, pp. 324–30. doi: 10.1007/s002170050558.
  27. Jin, M., Xie, Z., Li, J., Jiang, S., Ge, P., Subburaj, S., Li, X., Zeller, F.J., Hsam, S.L.K., and Yan, Y., Identification and molecular characterization of HMW glutenin subunit 1By16\* in wild emmer, *J. Appl. Genet.*, 2012, vol. 53, no. 3, pp. 24958. doi: 10.1007/s13353-012-0101-5.
  28. Shewry, P.R., Halford, N.G., and Tatham, A.S., High molecular weight subunits of wheat glutenin, *J. Cereal Sci.*, 1992, vol. 15, pp. 105–20. doi: 10.1016/S0733-5210(09)80062-3.
  29. Utebayev, M., Dashkevich, S., Kunanbayev, K., Bome, N., Sharipova, B., and Shavrucov, Yu., Genetic polymorphism of glutenin subunits with high molecular weight and their role in grain and dough qualities of spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) from Northern Kazakhstan, *Acta Physiol. Plant.*, 2019, vol. 41, pp. 71. doi: 10.1007/s11738-019-2862-5.
  30. He, Z.H., Liu, I., Xia, X.C., Liu, J.J., and Pena, R.J., Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality on Chinese bread wheats, *Cereal Chem.*, 2005, vol. 82, no. 4, pp. 34550. doi: 10.1094/CC-82-0345.
  31. Guo, X.H., Hu, J.L., Wu, B.H., Wang, Z.Z., Wang, D., Liu, D.C., and Zheng, Y.L., Special HMW-GSs and their genes of *Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides* accession D141 and the potential utilization in common wheat, *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 2016, vol. 63, no. 5, pp. 83344. doi: 10.1007/s10722-015-0287-6.
  32. Zhang, D., Yuan, Y., Su, Y., and Li, S., Analysis of dough rheological property and gluten quality characteristics in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides* (Körn. ex Asch. et Graebn.) Schweinf.), *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2016, vol. 63, no. 4, pp. 675–83. doi: 10.1007/S10722-015-0275-x.
  33. Rasheed, A., Xia, X.C., Yan, Y.M., Appels, R., Mahmood, T., and He, Z.H., Wheat seed storage proteins: advances in molecular genetics, diversity and breeding applications, *J. Cereal Sci.*, 2014, vol. 60, no. 1, pp. 11–24. doi: 10.1016/j.jcs.2014.01.020.
  34. Obukhova L.V., Shumny V.K., Composition of high molecular weight glutenin subunits in common wheat varieties and promising lines, *Rus. J. Genet.*, 2018, vol. 54, no. 3, pp. 30513. doi: 10.1134/S10-22795418030092.
  35. Barak, S., Mudgil, D., and Khatkar, B.S., Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review, *Critical Rev. Food Sci. Nutrition*, 2015, vol. 55, no. 3, pp. 357–68. doi: 10.1080/10408398.2012.654863.

Поступила в редакцию 04.09.19

После доработки 16.10.19

Принята к публикации 18.05.20