

УДК 575.162:575.167:633.111.1

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛЯ *Glu-B1a1* ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ГЛЮТЕНІНІВ ТА ЙОГО ВПЛИВ НА ОЗНАКИ ХЛІБОПЕКАРСЬКОЇ ЯКОСТІ У ПШЕНИЦЬ, ПРИДАТНИХ ДО ПОШИРЕННЯ В УКРАЇНІ

А.В. ЗЛАЦЬКА

*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

Серед сортів озимої м'якої пшениці, занесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 2008 р., виявлено шість (Куяльник, Селянка, Панна, Зміна, Вдала, Скарбниця) сортів-носіїв алеля *Glu-B1a1*, характерного для пшениць із високими показниками хлібопекарської якості. Простежено позитивний зв'язок між наявністю цього алеля в сорту та показниками хлібопекарської якості «сила борошна» та «об'єм хліба», хоча високі характеристики цих ознак не пояснюються лише наявністю цього алеля.

*Ключові слова:* м'яка пшениця, високомолекулярні глютеніни, *Glu-B1a1*, сила борошна, об'єм хліба.

Білки клейковини (глютеніни, гліadini) відіграють ключову роль у формуванні тіста та його хлібопекарських властивостей. Насамперед це пов'язано з утворенням білкового матриксу-сітки у процесі змішування борошна внаслідок виникнення міжмолекулярних і внутрішньомолекулярних зв'язків ковалентної й нековалентної природи між низько- і високомолекулярними глютенінами та гліадинами. Високомолекулярні глютеніни (ВМГ) білкового матриксу відповідають за властивості, пов'язані з в'язкістю—розтяжністю клейковини, а отже, й тіста. Низькомолекулярні глютеніни (НМГ) виконують функції ланок ланцюга білкової сітки. Серед них є як ті, що слугують термінаторами розгалуження й розширення білкового матриксу, так і ті, що сприяють формуванню білкового каркасу. Останні містять різну кількість цистеїнових основ, необхідних для утворення дисульфідних містків [8]. Ці НМГ збільшують розмір поліпептидної сітки і тим самим поліпшують таку ознаку, як «сила борошна» [13, 19]. Високомолекулярні глютеніни є продуктами експресії двох міцно зчеплених генів типу «х» та «у» локусів *Glu-A1*, *Glu-B1* і *Glu-D1*, що знаходяться на довгому плечі хромосом відповідно 1A, 1B, 1D [18]. Низькомолекулярні глютеніни кодуються локусами *Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3* на коротких плечах хромосом відповідно 1A, 1B, 1D [9]. Хоча вміст НМГ у зерні пшениці більший за вміст ВМГ, основний внесок у прояв певних ознак хлібопекарської якості роблять саме ВМГ, тому їх інтенсивно використовують як маркери в селекційних програмах [6].

Внаслідок вивчення поліморфізму ВМГ наприкінці 1970—початку 1980-х років було створено перший каталог їх алельних варіантів [17]. Подальші дослідження зв'язків цих алелів з ознаками хлібопекарської якості пшениці дали змогу здійснити їх ранжування за ступенем впливу

на формування цих ознак [18]. Основою першого каталогу ВМГ стали результати досліджень їх алельного складу в ДСН-ПААГ (поліакриламідний гель з додецилсульфатом натрію) [11]. Це доволі ефективний метод ідентифікації субодиноць ВМГ, однак із певними складнощами стикаються, коли різні субодиноці неможливо розділити, й отже, ідентифікувати, оскільки вони мають однакові молекулярні маси і відповідно електрофоретичні рухливості [7, 12]. Для вирішення цієї проблеми використовують такі методи, як RP-HPLC (зворотнофазова вискоэффективна рідинна хроматографія) [15], що дає змогу не лише розділити субодиноці ВМГ з однаковою електрофоретичною рухливістю, а й провести кількісний аналіз субодиноць за співвідношенням концентрації певної субодиноці до загальної кількості ВМГ, а також методи молекулярної генетики, що ґрунтуються на аналізі первинної структури ДНК генів ВМГ та регіонів, які їх оточують. Залучення цих методів забезпечило глибше вивчення алельного складу ВМГ пшениці і відповідно розширило існуючий каталог порівняно із 1983 р. Якщо до першого каталогу було занесено 11 алельних варіантів за локусом Glu-B1, то на сьогодні налічується більш як 59 алельних варіантів за цим локусом [16, 22]. Однак найцікавіший з погляду вивчення впливу ВМГ на ознаки хлібопекарської якості алель Glu-B1a1, продуктом експресії якого є дві субодиноці Vx7<sup>OE</sup> +Vu8\*, перша з них має підвищений рівень експресії Vx7 порівняно із субодиноцею зі звичайним його рівнем. Алель Glu-B1a1 надзвичайно рідкісний серед світової популяції сортів м'якої пшениці. Його ідентифіковано серед біотипів стародавнього угорського сорту Bankuti 1201 [10], австралійських сортів Kukri, Chara та селекційної лінії CD87, аргентинських сортів Klein Universal, Sinvalocho 4339, Teranos Pintos Precoz [4] і, що найважливіше, у групі канадських надсильних пшениць Glenlea, Wildcat, Bluesky, ES-4 [14, 15], що і привернуло всесвітню увагу вчених до його детальнішого дослідження.

Іншою особливістю цього алеля є те, що його майже неможливо ідентифікувати звичайним електрофоретичним розділенням у ДСН-ПААГ: субодиноця Vx7<sup>OE</sup> є дещо товщою за звичайну субодиноцю Vx7. У комплексі до електрофоретичного розділення цей алель можна ідентифікувати: 1) за елюцією піка субодиноці Vu до піка субодиноці Dx методом RP-HPLC; 2) за підвищеною експресією субодиноці Vx7 (молярна частка >39 % Vx); 3) за інсерцією у 43 пн у регіоні MAR (matrix-attachment region), що розміщений за промотором гена Vx7 і дуплікацією у 18 пн у кодуючому регіоні гена, хоча остання не є специфічною виключно для алеля Glu-B1a1. Такий самий тип дуплікації ідентифіковано і в первинній структурі ДНК інших алелів, зокрема алеля Glu-B1b сорту Chinese Spring [4].

На думку багатьох дослідників, саме стародавні українські сорти пшениць Галицька (Галиція) і Галичанка були донорами згаданого алеля для світової селекції [4]. У зв'язку з цим метою роботи було вивчення алельного складу ВМГ серед сортів, придатних до поширення в Україні, для ідентифікації сортів-носіїв алеля Glu-B1a1 та з'ясування впливу останнього на ознаки хлібопекарської якості, зокрема ознаку «сила борошна».

### Методика

Матеріалом для дослідження було понад 110 сортів озимої м'якої пшениці, занесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширен-

ня в Україні у 2008 р., а також сорт ярої пшениці Chinese Spring та сорт Glenlea. Останній належить до групи канадських надсильних пшениць.

Технологічні показники «сила борошна», «вміст білка в зерні» та «об'єм хліба» сортів м'якої пшениці визначали методами Державного сортовипробування [3]. Електрофоретичне розділення запасних білків ВМГ виконували методом Леммлі в модифікації [11]. Алелі ВМГ ідентифікували за каталогом [17]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для виявлення інсерції у 43 пн у регіоні MAR проводили за методикою Буттов та співавт. [4]. Послідовність праймерів така: MAR-F 5'-CCTCAGCATGCAA-CATGCAGC-3'; MAR-R 5'-CTGAAACSTTTGGCCAGT-CATGTC-3'. Для реакції брали 50–100 нг ДНК, 10 пмоль кожного з праймерів, 1 мкл 10-кратного буфера Taq-полімерази («Fermentas»), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub> та 1 у (одиниця активності ферменту) Taq-полімерази («Fermentas»). Ампліфікацію проводили на термоциклері BioRad IQ5, режим процесу: денатурація 95 °С — 3 хв, потім 40 циклів 95 °С — денатурація 30 с, 58 °С — відпал 30 с, 72 °С — елонгація 1 хв, завершальна елонгація 72 °С — 5 хв. Продукти ампліфікації візуалізували після їх електрофоретичного розділення у 2 %-му агарозному гелі в ультрафіолетовому світлі із залученням етидйіброміду як фарбувального реагенту.

### Результати та обговорення

Згідно з даними досліджень світової колекції сортів м'якої пшениці, субодиночку Vx7<sup>OE</sup> в усіх випадках ідентифікували у комбінації з субодиночками Vu8 або Vu8\* [15], які можна диференціювати лише методом RP-NPLC за позицією піка елюції субодиночки Vu відносно піка Dx. Оскільки за електрофоретичного розділення в ДСН-ПААГ субодиночки Vx7<sup>OE</sup> і Vx7, як і субодиночки Vu8 та Vu8\* майже неможливо диференціювати, то при ідентифікації сортів або ліній із генотипом Vx7<sup>OE</sup> + Vu8, Vx7<sup>OE</sup> + Vu8\* не виключений помилковий висновок щодо їх алельного складу як носіїв алеля Glu-B1b. Тому на першому етапі дослідження ми провели скринінг із залученням ДСН-ПААГ електрофорезу всіх використаних в аналізі сортів м'якої пшениці, щоб виділити сорти, які за даними електрофоретичного аналізу мали комбінацію субодиночок Vx7 + Vu8 (тобто алель Glu-B1b і споріднені йому, в тім числі Glu-B1a1).

У результаті з понад 110 сортів озимої м'якої пшениці було відібрано 41 гомогенний сорт і 9 сортів, які мали біотиби з такою комбінацією субодиночок для подальшого молекулярно-генетичного аналізу. Зі зразків цих сортів виділили ДНК і провели дослідження з ідентифікації інсерції у 43 пн у регіоні MAR гена Vx7<sup>OE</sup> за допомогою ПЛР.

Виявлено лише шість сортів, які були носіями цієї інсерції: Панна, Селянка, Вдала, Зміна, Скарбниця, Куяльник. У всіх сортах пшениць цієї групи після ампліфікації в електрофоретичному спектрі продуктів ПЛР ідентифіковано амплікон розміром 563 пн, характерний для сортів або ліній носіїв алеля a1 локусу Glu-B1. Решта сортів містили амплікон розміром 520 пн (рис. 1). Слід зазначити, що сортами-носіями цього алеля переважно були відносно нові сорти, внесені до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні у 2001–2007 рр. Переважно це сорти, створені в Селекційно-генетичному інституті (СГІ, Одеса). Згідно з нашими попередніми результатами, у зразках стародавніх сортів української селекції (в тім числі Кримка, Українка 0248) та в зразках сортів, створених у 1950–1990-х роках у СГІ, інших селекційних установах України, не виявлено алеля a1 локусу Glu-B1 [1]. Це підтвер-

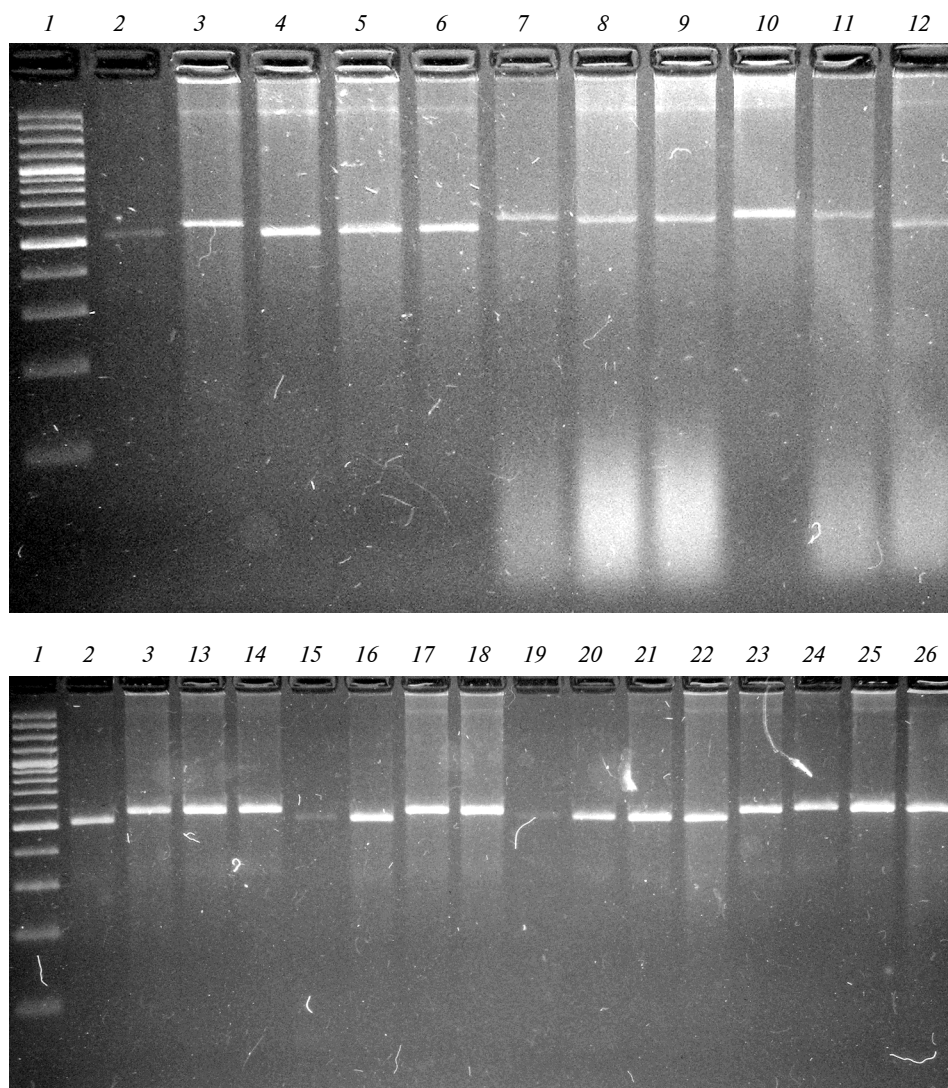


Рис. 1. Результати ПЛР-аналізу сортів з аельспецифічними праймерами до регіону MAR гена *Glu-B1a1*:

1 – маркер 100 пн; 2 – Chinese spring; 3 – Glenlea; 4–6 – Ремеслівна; 7–9 – Селянка; 10, 11 – Скарбниця; 12 – Доля, 13, 14 – Куяльник; 15, 16 – Диканька; 17, 18 – Панна; 19, 20 – Дальницька; 21, 22 – Дріада 1; 23, 24 – Зміна; 25, 26 – Вдала (пояснення в тексті)

джує, що він не був поширений у селекційному матеріалі, який традиційно використовували в українських селекційно-генетичних програмах. Його появу у шести виявлених нами сортів найімовірніше можна пояснити наявністю в їх родоводі сорту Одеська червоноколоса, що характеризується високими хлібопекарськими якостями на рівні канадських надсильних пшениць і застосовується в селекції для підвищення і поліпшення цих властивостей у нових сортів. Наявність цього алеля в сорту Одеська червоноколоса ми встановили у попередній роботі [1].

На наступному етапі дослідження ми намагались з'ясувати, чи пов'язані між собою наявність алеля *a1* локусу *Glu-B1* у сорту та деякі характеристики хлібопекарської якості борошна. Для цього ми узагальнили результати оцінювання таких показників, як «сила борошна» та

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЯ Glu-B1a1

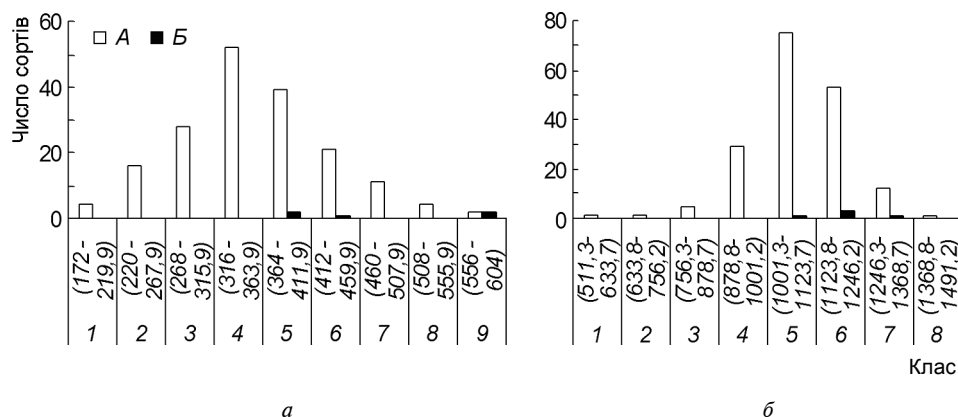


Рис. 2. Розподіл сортів пшениці за класами за ознакою «сила борошна» (а, в одиницях альвеографу) та «об'єм хліба» (б, в мілілітрах):

А — усі досліджені сорти; Б — пшениці з алелем Glu-B1a1

«об'єм хліба» у всіх досліджених сортів озимої м'якої пшениці. Усі сорти було згруповано в дев'ять класів за ознакою «сила борошна» та у вісім класів за ознакою «об'єм хліба», згідно з основними вимогами статистичного аналізу кількісних ознак [2] (рис. 2).

Характерно, що дев'ятий клас за ознакою «сила борошна», який включав лише два сорти з найвищими показниками цієї ознаки (556—604 одиниць альвеографу (о.а.), складався саме з двох сортів — Панна і Скарбниця — носіїв алеля ал локусу Glu-B1. Однак наявністю тільки цього алеля не можна пояснити високі показники ознаки «сила борошна» у сорту пшениці, оскільки сорти-носії досліджуваного алеля виявлено у п'ятому (364—411,9 о.а.) і шостому (412—459,9 о.а.) класах, але вони відсутні в класах сьомому (460—507,9 о.а.) і восьмому (508—555,9 о.а.) (див. рис. 2, а). Втім наявність цього алеля в сорту чи лінії підвищує її шанс проявити ознаки хлібопекарської якості на рівні сильних пшениць, оскільки не знайшли жодного сорту-носія цього алеля в першому—четвертому класах (див. рис. 2, а).

За ознакою «об'єм хліба» сорти-носії алеля ал локусу Glu-B1 потрапили у п'ятий—сьомий класи (див. рис. 2, б), їх не виявлено у восьмому класі, причому найбільше таких сортів було в шостому класі з об'ємом хліба зі 100 г борошна 1123,8—1246,2 мл, тобто вони також мали відносно високі показники за згаданою ознакою, але пояснити це виключно наявністю алеля ал локусу Glu-B1 не можна.

Те, що сорти пшениці — носії алеля ал локусу Glu-B1 потрапили в різні класи за дослідженими ознаками хлібопекарської якості, може бути пов'язане з отриманням результатів за цими ознаками в різні роки культивування кожного конкретного сорту. Ми спиралися на дані, усереднені за показниками трьох років проведення Державного сортопробування кожного сорту. Саме за цими характеристиками досліджені сорти внесені до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні, а випробовували їх у різні роки. Непряме підтвердження цього припущення є в роботі Бутов та співавт. [5]. Вони дослідили популяцію подвоєних гаплоїдів пшениці, отриманої від схрещування двох сортів CD87 (носій ал локусу Glu-B1) та Катерпа, і встановили, що позитивніший вплив на хлібопекарські властивості цей алель виявляє на фоні алеля Glu-D1d, а не Glu-D1a, та за культивування сортів-носіїв

цього алеля в умовах помірного клімату, ніж у посушливих умовах з підвищеним рівнем температури. Усі досліджені нами сорти-носії алеля ал локусу Glu-B1 характеризувалися наявністю алеля Glu-D1d, що виключає вплив цього типу міжгенної взаємодії на досліджувані ознаки. Можна виключити також вплив алельного складу за локусом Glu-A1, оскільки всі сорти були носіями алеля b цього локусу за винятком двох сортів — Скарбниця і Вдала з алелем Glu-A1a, але водночас знаходилися в різних класах за ознакою «сила борошна» — відповідно в дев'ятому і п'ятому, а за ознакою «об'єм хліба» — в одному класі разом із сортом Куяльник, який є носієм алеля Glu-A1b. Стосовно природно-кліматичних умов, найімовірніше, що підвищення температури і посушливі умови пригнічують рівень експресії субодиниці Bx7, це виявляється у зниженні показника «сила борошна». Підтвердженням такого припущення є роботи, проведені на трансгенних лініях м'якої пшениці з множинними копіями субодиниці Dx5, в яких було показано, що збільшення числа копій цієї субодиниці, а отже, рівня її експресії, значно підвищує силу борошна внаслідок зміни фону і рівня глютенінів [20, 21].

Таким чином, у результаті наших досліджень серед сортів української селекції знайдено сорти-носії алеля ал локусу Glu-B1, характерного для пшениць із високими хлібопекарськими якостями. Хоча виявлено певний позитивний зв'язок між наявністю цього алеля в сорту та показниками хлібопекарської якості «сила борошна» й «об'єм хліба», пояснити високі характеристики цих ознак виключно його наявністю в сорту неможливо. Для подальшого дослідження сортів і з'ясування впливу на їх хлібопекарські характеристики ґрунтово-кліматичних умов треба залучити метод RP-HPLC, щоб встановити рівень експресії субодиниць Bx7 залежно від зміни температурного, водного режимів, наявності мінеральних добрив.

1. Злацкая А.В., Плодиенко Л.Н. Идентификация сортов с аллелем ал Glu-B1 (7<sup>00</sup> + 8) среди современных и культивированных в Украине сортов озимой мягкой пшеницы // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. — К.: Логос, 2007. — Т. 1. — С. 45–49.
2. Лакін Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 296 с.
3. Методика державного сортовипробування сільськогосподарських культур. Методи визначення показників якості рослинницької продукції / Під ред. В.В.Волкодава. — К.: АЛЕФА, 2000. — 144 с.
4. Butow B.J., Gale K.R., Iken J. et al. Dissemination of the highly expressed Bx7 glutenin subunit (Glu-B1a1 allele) in wheat as revealed by novel PCR markers and RP-HPLC // Theor. Appl. Genet. — 2004. — **109**. — P. 1525–1535.
5. Butow B.J., Ma W., Gale K.R. et al. Molecular discrimination of Bx7 alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular-weight glutenin allele has a major impact on wheat flour dough strength // Ibid. — 2003. — **107**. — P. 1524–1532.
6. Cornish G.B., Skylas D.J., Siriamornpun S. et al. Grain proteins as markers of genetic traits in wheat // Aust. J. Agr. Res. — 2001. — **52**. — P. 1161–1171.
7. D'Ovidio R., Anderson O.D. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality // Theor. Appl. Genet. — 1994. — **88**. — P. 759–763.
8. Greenfield J.J.A., Ross-Muephy S.B., Tamas L. et al. Rheological properties of monomeric and polymeric forms of C hordeins, a sulfur-poor prolamin of barley // J. Cereal Sci. — 1998. — **27**. — P. 233–236.
9. Gupta R.B., Shepherd K.W. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. I. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats // Theor. Appl. Genet. — 1990. — **80**. — P. 65–74.
10. Juhasz A., Larroque O.R., Tamas L. et al. Bankuti 1201 — an old Hungarian wheat variety with special storage protein composition // Ibid. — 2003. — **107**. — P. 697–704.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — **227**. — P. 680–685.

12. *Lafiandra D., D'Ovidio R., Margiotta B.* Studies of high-molecular-weight glutenin subunits and their encoding genes // Improvement of cereal quality by genetic engineering. — New York: Plenum Press. — 1994. — P. 105–111.
13. *Lafiandra D., Masci S., Blumental C., Wrigley C.W.* The formation of glutenin polymer in practice // Cereal Foods World. — 1999. — **44**. — P. 572–578.
14. *Lukow O.M., Forsyth S.A., Payne P.I.* Over-production of HMW glutenin subunits coded on chromosome 1B in common wheat, *Triticum aestivum* // J. Genet Breed. — 1992. — **46**. — P. 187–192.
15. *Marchylo B.A., Lukow O.M., Kruger J.E.* Quantitative variation in high-molecular weight glutenin subunit 7 in some Canadian wheats // J. Cereal Sci. — 1992. — **5**. — P. 29–37.
16. *McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M. et al.* Catalogue of gene symbols for wheat (MacGene 2003) (CD-ROM) // Proceedings of the 10<sup>th</sup> Int. wheat genetics symp. — 2003. — **4**. SIMI, Rome.
17. *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. Communic. — 1983. — **11**, N 1. — P. 29–34.
18. *Payne P.I., Nightingale M.A., Krattinger A.F., Holt L.M.* The relationship between HMW glutenin subunit composition and bread-making quality of British grown wheat varieties // J. Sci. Food Agr. — 1987. — **40**. — P. 51–65.
19. *Pogna N.E., Tusa P., Boggini G.* Genetic and biochemical aspects of dough quality in wheat // Adv. Food Sci. — 1996. — **18**. — P. 145–151.
20. *Popineau Y., Deshayes G., Lefebvre J. et al.* Prolamin aggregation, gluten viscoelasticity, and mixing properties of transgenic wheat lines expressing 1Ax and 1Dx high molecular weight glutenin subunit transgenes // J. Agr. Food Chem. — 2001. — **49**. — P. 395–401.
21. *Rooke L., Bekes F., Fido R. et al.* Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength // J. Cereal Sci. — 1999. — **30**. — P. 115–120.
22. *Xu S.S., Khan K., Klindworth D.L. et al.* Chromosomal location of genes for novel glutenin subunits and gliadins in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L., var. *dicoccoides*) // Theor. Appl. Genet. — 2004. — **108**. — P. 1221–1228.

Отримано 27.04.2009

#### ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЯ Glu-B1a1 ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЛЮТЕНИНОВ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА ПРИЗНАКИ ХЛЕБОПЕКАРНОГО КАЧЕСТВА У ПШЕНИЦ, ДОПУЩЕННЫХ К ВОЗДЕЛЫВАНИЮ В УКРАИНЕ

*А.В. Злацкая*

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Среди сортов озимой мягкой пшеницы, занесенных в Государственный реестр сортов растений, пригодных к распространению в Украине в 2008 году, обнаружены шесть (Куяльник, Селянка, Панна, Змина, Вдала, Скарбныця) сортов-носителей аллеля Glu-B1a1, характерного для пшениц с высокими показателями хлебопекарного качества. Наблюдалась положительная связь между наличием этого аллеля у сорта и показателями хлебопекарного качества «сила муки» и «объем хлеба», хотя высокие характеристики этих признаков не объясняются только наличием этого аллеля.

#### IDENTIFICATION OF Glu-B1a1 ALLELE OF HIGH-MOLECULAR WEIGHT GLUTENINS AND IT IMPACT ON CHARACTERISTICS RELATED TO BREAD-MAKING QUALITY IN WHEATS PERMITTED FOR REALIZATION IN UKRAINE

*A.V. Zlatska*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Six varieties (Kuyalnyk, Selyanka, Panna, Zmina, Vdala and Skarbnytsya) possessing allele Glu-B1a1, which mostly was identified in wheats with high bread-making characteristics, were found out among winter common wheat cultivars permitted for realization in Ukraine in 2008 according to National list of plant varieties. It was observed the positive correlation between possessing of allele Glu-B1a1 and some end-use traits «dough strength» and «bread loaf volume» of varieties however it was difficult to make conclusion that high characteristics of those traits in cultivars are due only to the presence of this allele.

*Key words:* common wheat, high molecular weight glutenins, Glu-B1a1, dough strength, bread loaf volume.