

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Идентификация новых нуклеотидных последовательностей гена *Glu-B1-1*, кодирующего глютенины х-типа у мягкой пшеницы

А.А. Галимова^{1, 2}✉, Б.Р. Кулуев^{1, 2}

¹ Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

² Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

✉ aiz.galimova@yandex.ru

Аннотация. Мягкая пшеница, наряду с другими представителями трибы Пшеницевых, обладает огромным генетическим потенциалом для создания сортов с высокими технологическими и реологическими свойствами муки. Поэтому исследования генетической базы полиморфизма сортов мягкой пшеницы и выявление аллелей генов, ассоциированных с высокими хлебопекарными признаками, представляются актуальными. Цель данной работы – анализ нуклеотидных последовательностей гена субъединиц х-типа высокомолекулярных глютенинов *Glu-B1-1* и анализ предсказанных аминокислотных последовательностей его белкового продукта у трех генотипов мягкой пшеницы. В ходе генотипирования по гену *Glu-B1-1* у сортов мягкой пшеницы Авеста, Ленинградка крупнозерная и линии С-75094 были обнаружены ранее не описанные изменения в размерах амплифицируемых участков. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей этих генов с известными опубликованными последовательностями показал наличие двух делеций у генотипов Авеста и С-75094 и семи однонуклеотидных замен у сорта Ленинградка крупнозерная. Выравнивание предсказанных аминокислотных последовательностей *Glu-B1* рассматриваемых генотипов и стандартного сорта, несущего аллель *Glu-B1-a*, показало, что делеции в аминокислотных последовательностях у сорта Авеста и линии С-75094 локализируются в центральном домене белка и влияют на количество три-, гекса- и нонапептидов. У сорта Ленинградка крупнозерная было выявлено уменьшение количества трипептида GQQ и гексапептида PGQGQQ на одну единицу; кроме того, выявлены замены пяти аминокислот. Таким образом, нами обнаружены ранее не описанные делеции и замены в нуклеотидных последовательностях гена высокомолекулярных глютенинов *Glu-B1-1*, которые приводят к изменениям аминокислотных последовательностей в функционально значимых участках, а именно в центральных доменах белковых молекул. Выявленные мутации могут быть использованы при генотипировании сортообразцов мягкой пшеницы.

Ключевые слова: хлебопекарные качества; высокомолекулярные субъединицы глютенина; гены *Glu-1*; генотипирование.

Для цитирования: Галимова А.А., Кулуев Б.Р. Идентификация новых нуклеотидных последовательностей гена *Glu-B1-1*, кодирующего глютенины х-типа у мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(5):433-439. DOI 10.18699/VJGB-23-52

Identification of new nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene encoding x-type glutenins in bread wheat

A.A. Galimova^{1, 2}✉, B.R. Kuluev^{1, 2}

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

² Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

✉ aiz.galimova@yandex.ru

Abstract. Studies of the genetic base and polymorphism of bread wheat cultivars aimed at identifying alleles of genes associated with high baking and other economically valuable traits seem to be relevant, since bread wheat, along with all representatives of the Triticeae tribe, has a huge genetic potential for creating cultivars with high technological and rheological properties of grain flour. The aim of this study was sequencing and analysis of the nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene, and analysis of the predicted amino acid sequences of its protein product in three cultivars of bread wheat. Thus, in the course of genotyping cultivars and lines of bread wheat for the *Glu-B1-1* gene, in the cultivars 'Avesta', 'Leningradka krupnozernaya' and line C-75094, previously undescribed changes in the size of amplifiable regions of the *Glu-B1-1* gene for high-molecular-weight glutenins were found.

Comparative analysis of the nucleotide sequences of these genes with known sequences showed the presence of two deletions in 'Avesta' and C-75094 and the presence of seven single-nucleotide substitutions in 'Leningradka krupnozernaya'. Alignment of the predicted *Glu-B1* amino acid sequences of the studied accessions and the standard cultivar carrying the *Glu-B1-a* allele showed that deletions in the amino acid sequences of 'Avesta' and C-75094 accessions are localized in the central domain of the protein and affect the amount of tri-, hexa-, and nonapeptides, and in 'Leningradka krupnozernaya', a decrease in GQQ and PGQGQQ by one unit was revealed. In addition, substitutions of five amino acids were found in 'Leningradka krupnozernaya'. Thus, we have found previously undescribed deletions and substitutions in the nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene for high-molecular-weight glutenins, which lead to changes in amino acid sequences in functionally important regions, namely, in the central domains of protein molecules. The identified mutations can be used for genotyping bread wheat cultivars.

Key words: baking quality; high-molecular-weight glutenin subunits; *Glu-1* genes; genotyping.

For citation: Galimova A.A., Kuluev B.R. Identification of new nucleotide sequences of the *Glu-B1-1* gene encoding x-type glutenins in bread wheat. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(5):433-439. DOI 10.18699/VJGB-23-52

Введение

Высокомолекулярные субъединицы глютенина (ВМСГ) играют важную роль в определении вязкоупругих свойств зерна мягкой пшеницы, поскольку они способствуют образованию более крупных полимеров клейковины и являются основными детерминантами эластичности теста (Shewry et al., 1989, 1992, 1995, 1997). Поэтому характеристика состава ВМСГ – важная задача в программах селекции мягкой пшеницы, направленных на улучшение качества зерна. Это дает возможность прогнозирования хлебопекарных качеств сортов мягкой пшеницы (Rayne, 1987; Nucia et al., 2019).

До недавнего времени основным методом определения состава ВМСГ был SDS-электрофорез запасных белков, на основе которого выявлено огромное аллельное разнообразие ВМСГ в трибе Пшеницевых. К примеру, для локуса *Glu-A1* субгена А на сегодняшний день установлено 52 аллеля, для локуса *Glu-B1* субгена В – 83 аллеля, для локуса *Glu-D1* субгена D – 70 аллелей (McIntosh et al., 2013).

В последние годы на смену SDS-электрофорезу белков приходят методы молекулярной генетики, которые позволяют различить субъединицы высокомолекулярных глютенинов со схожими молекулярными массами на генетическом уровне (Vafin et al., 2018; Nucia et al., 2019). Однако нуклеотидные последовательности большинства аллелей ВМСГ, определенных с помощью белковых электрофореграмм, до сих пор не охарактеризованы и не депонированы в базах данных. Исследования, направленные на определение нуклеотидных последовательностей аллелей генов, ассоциированных с высоким или низким качеством зерна, актуальны, так как их результаты могут быть использованы в маркер-ориентированной и геномной селекции мягкой пшеницы.

В ходе генотипирования 95 сортов мягкой пшеницы по составу генов запасных белков (Галимова и др., 2023) нами были идентифицированы генотипы, несущие ранее неизвестные нуклеотидные последовательности x-типа, кодируемые локусом *Glu-B1-1* (обозначение в соответствии с Каталогом генных символов пшеницы (McIntosh et al., 2013)). Они обнаружены у сортов Авеста, Ленинградка крупнозерная и линии С-75094. В настоящей работе описаны эти новые делеции и замены, а также приведены некоторые характеристики предсказанных фраг-

ментов аминокислотных последовательностей субъединиц данных аллельных вариантов высокомолекулярных глютенинов.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили озимые сорта мягкой пшеницы Стерлинская (используется в качестве контрольного образца – сорта, несущего аллель субъединицы x-типа – Vx7), Авеста, яровые сорт Ленинградка крупнозерная и линия С-75094, полученные из коллекции генетических ресурсов растений Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР). По данным ВИР, сорт Ленинградка крупнозерная и линия С-75094 обладают низкими хлебопекарными качествами. В соответствии с данными, приведенными в Госреестре селекционных достижений (<https://reestr.gossortrf.ru/sorts/9358556/>, дата обращения 15.10.2022), сорт Авеста характеризуется хлебопекарными качествами на уровне хорошего филлера.

Геномную ДНК из высушенных листьев мягкой пшеницы выделяли с помощью ЦТАБ (Doyle J.J., Doyle J.L., 1987). Для амплификации фрагмента гена *Glu-B1-1* использовали пару праймеров VxF/VxR (Ma et al., 2003). Прямой праймер VxF отжигается на двух участках гена *Glu-B1-1*, формируя в ходе ПЦР вместе с обратным праймером два продукта реакции размерами 766 и 630 п.о. Амплификацию ДНК осуществляли по программе: начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин; 35 циклов: денатурация – 95 °С, 40 с, отжиг праймеров – 58 °С, 40 с, элонгация – 72 °С, 1 мин; конечная элонгация – 72 °С, 3 мин. Визуализацию результатов амплификации проводили в 1.6 % агарозных гелях с маркерами длин фрагментов ДНК 100 bp («Евроген», Россия).

Для секвенирования продуктов ПЦР брали в среднем 500 нг каждого продукта ПЦР, полученного выше. Продукты очищали с помощью реакции: 1 ЕД щелочной фосфатазы (NEB, США) и 10 ЕД экзонуклеазы I (NEB, США) в конечном объеме 10 мкл при 37 °С в течение 15 мин с последующей инактивацией фермента при 85 °С в течение 15 мин. 1 мкл (~50 нг) каждого из очищенных образцов непосредственно использовали в качестве матрицы для секвенирования. Реакцию ставили с 10 пМ праймера и 0.5 мкл BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix в конечном объеме 10 мкл. Последовательность циклов сек-

венирующей реакции: денатурация – 96 °С в течение 10 с, отжиг праймера – 58 °С, 5 с, элонгация – 60 °С, 4 мин для всех 30 циклов. Флуоресцентно меченые продукты ПЦР анализировали на секвенаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

При секвенировании фрагментов исследуемых генов каждого образца использовали три биологические повторности. Секвенирование проводили с двух концов при помощи праймеров VxF и VxR. Далее для каждого образца путем выравнивания трех полученных последовательностей было составлено по одной консенсусной последовательности. Данная процедура проводилась, прежде всего, для избегания возможных ошибок при секвенировании. Выравнивание последовательностей нуклеотидов методом Clustal W и обнаружение предполагаемых мутаций выполнены в программе MEGA версии 11.0.8 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11).

Результаты

В ходе генотипирования 95 сортов и линий мягкой пшеницы по генам *Glu-1* субгеномов А, В и D геном-специфичными праймерами (Галимова и др., 2023) нами обнаружены ранее не описанные делеции в нуклеотидной последовательности гена *Glu-B1*, кодирующего ВМСГ х-типа (*Glu-B1-1*). При анализе аллельного состояния гена *Glu-B1-1* ожидаемыми продуктами реакции амплификации являлись ампликоны размером 766 и 630 п. о. Нарботка продуктов реакции указанных размеров свидетельствовала бы о том, что сорт несет аллель субъединицы х-типа – Vx7 (в настоящем исследовании в качестве контроля взят сорт Стерлинская). Однако в случае трех сортов и линий (Авеста, Ленинградка крупнозерная, С-75094) в ходе генотипирования были обнаружены продукты реакции, отличные от ожидаемых: один продукт реакции вместо двух, имеющий размеры 766 п. о. или ~669 п. о. и ранее не описанный в литературе. При амплификации геномной ДНК сорта Ленинградка крупнозерная выделен только один продукт реакции размером 766 п. о. При амплификации ДНК сорта Авеста и линии С-75094 также образовался один продукт реакции, при этом на электрофореграмме выявлен ампликон размером больше 630 п. о. и меньше 700 п. о. В литературе имеются данные о наработке продуктов ПЦР размером 669 п. о. при использовании пары праймеров VxF/VxR (Ma et al., 2003). Это дало нам основание полагать, что продукты ПЦР генотипов Авеста и С-75094 представляют собой описанный ранее фрагмент гена *Glu-B1-1* размером 669 п. о. (Галимова и др., 2023). Поэтому далее размер этого ПЦР-продукта мы обозначали как ~669 п. о. (рис. 1, табл. 1).

Затем для определения нуклеотидных последовательностей обнаруженных фрагментов гена *Glu-B1-1* было проведено их секвенирование. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *Glu-B1-1* генотипов Авеста и С-75094 с известными аннотированными последовательностями ДНК и РНК из базы данных GenBank не выявил полной идентичности между ними. Выравнивание нуклеотидной последовательности фрагментов гена *Glu-B1-1* образцов С-75094 и Авеста показало их сходство с субъединицей х-типа аллеля *i*, который имеет три делеции относительно аллеля *a*. В рас-

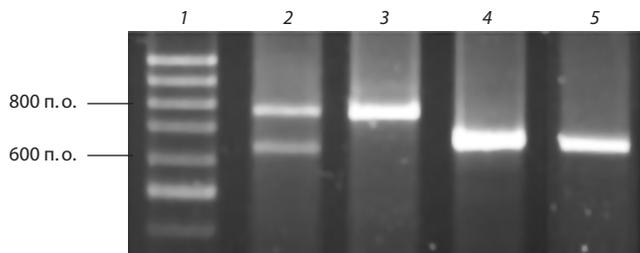


Рис. 1. Электрофореграмма результатов амплификации фрагмента гена *Glu-B1-1* праймерами VxF/VxR.

1 – маркер длин фрагментов ДНК 100 bp («Евроген», Россия); 2 – сорт Стерлинская с ожидаемыми размерами ампликонов 766 + 630 п. о.; 3 – сорт Ленинградка крупнозерная (766 п. о.); 4 – сорт Авеста (~669 п. о.); 5 – линия С-75094 (~669 п. о.).

Таблица 1. Ожидаемые и фактические длины ампликонов при генотипировании исследуемых генотипов мягкой пшеницы с использованием праймеров VxF/VxR

Сорт/линия	Размер ампликона, п. о.	
	ожидаемый	фактический
Стерлинская	766 + 630	766 + 630
Ленинградка крупнозерная		766
Авеста		~669
С-75094		

сматриваемых нами образцах выявлены только две из них (рис. 2, а–в). Таким образом, размер амплифицированного и секвенированного нами фрагмента гена *Glu-B1-1* составил 687 п. о.

Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *Glu-B1-1* сорта Ленинградка крупнозерная, для которого был выявлен продукт амплификации размером 766 п. о., показал, что в одном из двух участков отжига прямого праймера VxF произошли две однонуклеотидные замены (G→A и A→G), которые, вероятно, препятствуют отжигу прямого праймера (рис. 3). Предположительно, в результате этого образуется только один продукт реакции вместо ожидаемых двух.

Поскольку ген *Glu-B1-1* исследуемых генотипов (Авеста, Ленинградка крупнозерная, С-75094) был секвенирован не полностью, он дополнен с двух концов фланкирующими участками аллеля *Glu-B1a* (номер GenBank VK006773) для проведения сравнительного анализа их аминокислотных последовательностей. Таким образом, анализ предсказанных аминокислотных последовательностей белка Glu-B1-1 рассматриваемых генотипов осуществлялся на основании данных, полученных в результате секвенирования фрагмента гена *Glu-B1-1*.

Центральная часть белка Glu-B1-1 представлена вторичными мотивами из три-, гекса- и нонапептидов GQQ, PGQGQQ и GYYTSPQQ. Несмотря на то что у аминокислотных последовательностей генотипов Авеста и С-75094 число аминокислот отличается от числа ами-

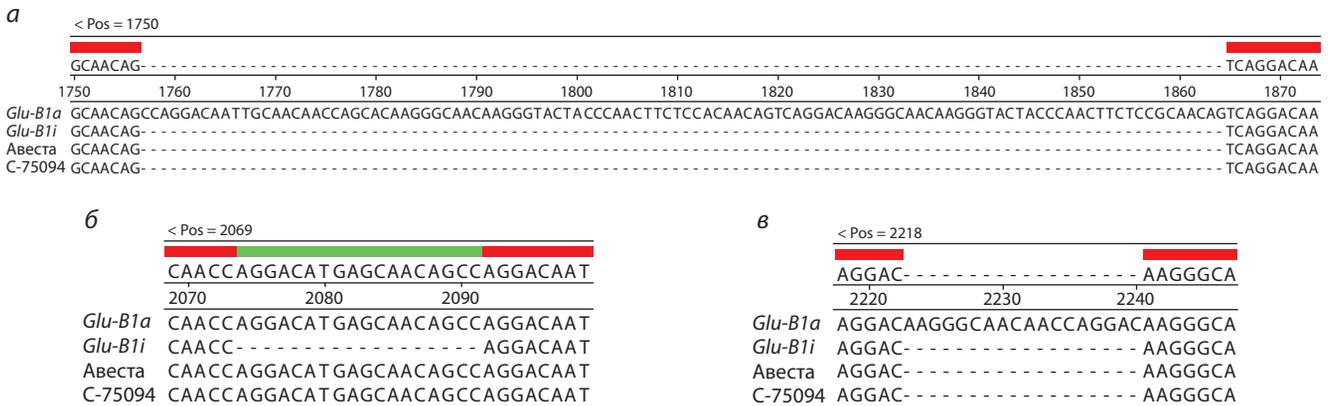


Рис. 2. Результаты выравнивания нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *Glu-B1-1* генотипов Авеста и C-75094 с нуклеотидными последовательностями *Glu-B1-1* аллелей *Glu-B1a* (номер GenBank VK006773) и *Glu-B1i* (номер GenBank AB263219).

a – делеция (нуклеотиды 1757–1864); *б* – делеция (нуклеотиды 2074–2091, данной делецией отличаются нуклеотидные последовательности *Glu-B1-1* аллеля *Glu-B1i* и изучаемых генотипов Авеста и C-75094); *в* – делеция (нуклеотиды 2223–2240).



Рис. 3. Однонуклеотидные замены (G→A и A→G) в нуклеотидной последовательности гена *Glu-B1-1* сорта Ленинградка крупнозерная на месте отжига прямого праймера VxF.

Красной рамкой выделено место отжига прямого праймера VxF.

нокислот сорта-носителя аллеля *Glu-B1i*, все три сравниваемые аминокислотные последовательности имеют одинаковое количество повторов три-, гекса- и нонапептидов (табл. 2).

Существенные различия в количестве остатков аминокислот и мотивов наблюдаются при сравнении аминокислотных последовательностей трех упомянутых сортов и линий с аминокислотной последовательностью сорта-носителя аллеля *Glu-B1a*. Так, в аминокислотной последовательности аллеля *Glu-B1a* содержатся 44 трипептида GQQ, 18 гексапептидов PGQGQQ и 11 нонапептидов GYYPTSPQQ, тогда как в аминокислотных последова-

тельности сортов-носителей аллеля *Glu-B1i* и в образцах Авеста и C-75094 количество пептидов уменьшается на три, один и два мотива соответственно (рис. 4, см. табл. 2).

Анализ количества аминокислот в предсказанных аминокислотных последовательностях четырех сравниваемых генотипов показал уменьшение количества остатков Е (глутаминовая кислота), Н (гистидин), Q (глутамин), Р (пролин), G (глицин) у образцов Авеста, C-75094 и у сорта с аллелем *Glu-B1i*, по сравнению с сортом, несущим аллель *Glu-B1a* (см. табл. 2). Так, значительная разница в количестве глутаминов выявлена в аминокислотных последовательностях аллеля *Glu-B1a* и последовательностях аминокислот остальных образцов: *n*–18 остатков глутамина в аллеле *Glu-B1i* и *n*–16 – в последовательностях аминокислот генотипов Авеста и C-75094. Помимо глутамина, в аминокислотных последовательностях *Glu-B1-1* образцов Авеста и C-75094 имеются различия в количестве пролинов (*n*–7) и глицинов (*n*–8). Сорт, несущий аллель *Glu-B1i* (номер GenBank AB263219), отличается, кроме глутамина, по числу еще четырех аминокислот: глутаминовой кислоты, гистидина, пролина и глицина (см. табл. 2, рис. 4). Из анализа предсказанных фрагментов аминокислотной последовательности видно, что у секвенированного фрагмента глютеина образцов

Таблица 2. Количество повторяющихся мотивов ВМСГ и аминокислотных остатков в исследуемом участке белка *Glu-B1-1*

Аллель/генотип	Количество повторов мотивов локуса <i>Glu-B1-1</i>			Количество аминокислотных остатков				
	Трипептид GQQ	Гексапептид PGQGQQ	Нонапептид GYYPTSPQQ	Е	Н	Q	Р	G
<i>Glu-B1a</i>	44	18	11	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i>
<i>Glu-B1i</i>	41	17	9	<i>n</i> –1	<i>n</i> –1	<i>n</i> –18	<i>n</i> –8	<i>n</i> –9
<i>Glu-B1-1</i> (Авеста, C-75094)	41	17	9	<i>n</i>	<i>n</i>	<i>n</i> –16	<i>n</i> –7	<i>n</i> –8
<i>Glu-B1-1</i> (Ленинградка крупнозерная)	43	17	11	<i>n</i>	<i>n</i> –1	<i>n</i> –1+1	<i>n</i>	<i>n</i> –2

Примечание. Обозначения аминокислотных остатков: Е – глутаминовая кислота, Н – гистидин, Q – глутамин, Р – пролин, G – глицин. *n* – количество аминокислотных остатков белка *Glu-B1-1* генотипа (сорта), несущего аллель *Glu-B1a*; *n*–1+1 – замена, ведущая к образованию аминокислоты глутамином (Н→Q), и замена глутамина другой аминокислотой (Q→R).

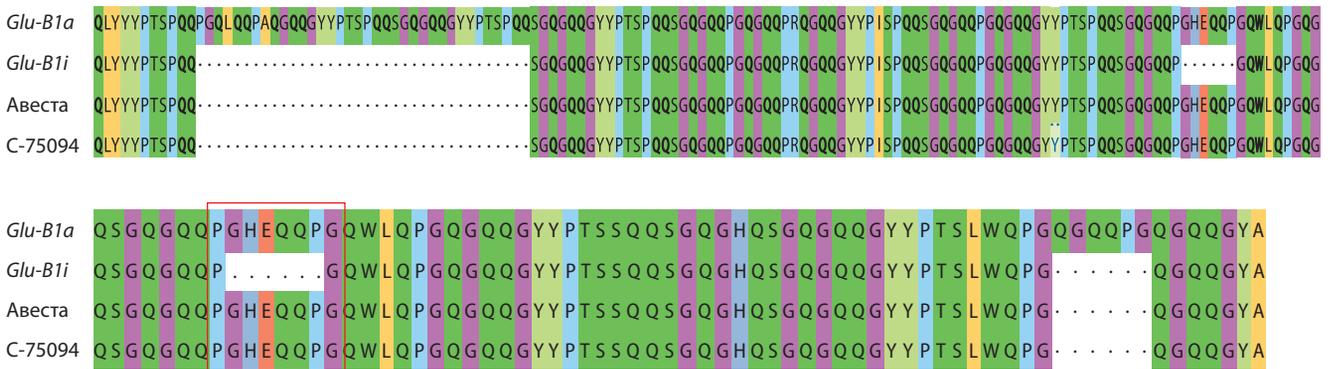


Рис. 4. Результаты выравнивания предсказанных аминокислотных последовательностей белка Glu-B1-1 сортов, несущих аллели *Glu-B1a*, *Glu-B1i*, и изучаемых образцов Авеста, С-75094.

Красной рамкой выделен участок, по которому аминокислотные последовательности образцов Авеста и С-75094 отличаются от аминокислотной последовательности белка, закодированного аллелем *Glu-B1i*.

Авеста, Ленинградка крупнозерная и С-75094 отсутствуют вновь возникшие остатки цистеина, значимые для образования дисульфидных связей (см. табл. 2, рис. 4).

Выравнивание предсказанных аминокислотных последовательностей сортов, несущих аллели *Glu-B1a*, *Glu-B1i*, и исследуемых образцов Авеста и С-75094 показало, что потери аминокислот локализируются в центральном домене белка и влияют на количество три-, гекса- и нонапептидов (см. рис. 4). Однако необходимо отметить, что по количеству мотивов аминокислотные последовательности образцов Авеста и С-75094 не отличаются от аминокислотной последовательности *Glu-B1-1*, закодированной аллелем *Glu-B1i*. При этом генотипы Авеста и С-75094 отличаются от аллеля *Glu-B1i* количеством остатков глутаминовой кислоты, гистидина, глутамина, пролина и глицина.

Сравнительный анализ предсказанных аминокислотных последовательностей сорта Ленинградка крупнозерная и сорта, несущего аллель *Glu-B1a*, показал уменьшение количества трипептида GQQ и гексапептида PGQGQQ на одну единицу (см. табл. 2). Кроме того, выявлены замены пяти аминокислот, среди которых надо отметить замены двух остатков глицина (G→R, G→W), а также две замены, одна из которых ведет к образованию аминокислоты глутамин (H→Q), а вторая – к замещению глутамина аргинином (Q→R).

Обсуждение

Полиморфизм генов ВМСГ, вероятнее всего, является одной из причин высокой генетической изменчивости признаков мягкой пшеницы, влияющих на технологические и реологические свойства муки и, как следствие, на хлебопекарные качества (Patil et al., 2015; Ravel et al., 2020). В ходе генотипирования различных сортов и линий мягкой пшеницы по локусу *Glu-B1-1* нами идентифицированы ампликоны, длины нуклеотидных последовательностей которых не соответствовали ожидаемым. Обнаруженные в данной работе изменения в нуклеотидном составе гена субъединицы х-типа *Glu-B1* ранее не были описаны.

Зерлы ВМСГ состоят из N- и C-концевых доменов и центрального домена, который состоит из повторяющихся мотивов (Shewry et al., 1992). N- и C-концы содержат

больше заряженных остатков, чем центральный домен, и включают большую часть или все остатки цистеина, присутствующие в субъединицах. Домены повторов характеризуются три-, гекса-, и нонапептидными мотивами в субъединицах х-типа (GQQ, PGQGQQ и GYYPTSPQQ) и гекса- и нонапептидными повторами в субъединицах у-типа (PGQGQQ и GYYPTSLQQ) (Tatham et al., 1990). Таким образом, к определению эластичности белка могут иметь отношение две особенности структуры ВМСГ: количество и распределение дисульфидных связей, а также свойства и взаимодействия повторяющихся мотивов центрального домена (Kohler et al., 1994).

Дисульфидные связи чрезвычайно важны для структуры клейковины и являются значимыми факторами при определении вязкоупругих и реологических свойств теста (Lindsay et al., 2000; Li et al., 2016). Внутри- и межмолекулярные дисульфидные связи образуются между остатками цистеина (Wang et al., 2021). Для предсказанных фрагментов аминокислотных последовательностей изученных генотипов был проведен анализ содержания остатков цистеина, который показал отсутствие изменений в их количестве.

Хотя межцепочечные дисульфидные связи имеют решающее значение для стабилизации полимеров ВМСГ, работы, проведенные с использованием ядерного магнитного резонанса, показывают, что водородные связи, опосредованные боковыми цепями глутамина, тоже могут играть важную роль в стабилизации структуры клейковины (Belton, 1994; Belton et al., 1995). Большое содержание остатков глутамина обладает высокой способностью образовывать как внутри-, так и межмолекулярные водородные связи и положительно влияет на эластичность теста (Belton, 1999; Guo et al., 2019). У исследованных нами генотипов как раз обнаружены изменения в содержании глутамина (см. табл. 2). Отметим, что для образцов Авеста и С-75094 характерно наличие большего числа остатков глутамина по сравнению с сортом-носителем аллеля *Glu-B1i*.

Согласно литературным данным, вариации в центральном повторяющемся домене белков глютелинов являются основными причинами различий в размере его субъединиц

(Anderson, Greene, 1989; Halford et al., 1992; Shewry et al., 1992; D'Ovidio et al., 1995), что было показано и в нашей работе. Из анализа центрального участка предсказанного белка ВМСГ у образцов Авеста и С-75094 видно, что они отличаются от известной последовательности аминокислот сортов, несущих аллель *Glu-B1a*, количеством мотивов (всех трех типов) и, соответственно, числом аминокислот. От аминокислотной последовательности аллеля *Glu-B1i* они отличаются лишь числом аминокислот. Так, количество мотивов центрального домена у образцов Авеста и С-75094 и у аллеля *Glu-B1i* одинаково – 41 трипептид, 17 гексапептидов и 9 нонапептидов, но количество аминокислотных остатков у них разное (см. табл. 2, рис. 4). Для ярового сорта Ленинградка крупнозерная показано уменьшение количества три- и гексапептидов по сравнению с аминокислотной последовательностью сорта-носителя аллеля *Glu-B1a* (см. табл. 2). Таким образом, аминокислотные последовательности сортов Авеста, Ленинградка крупнозерная и образца С-75094 имеют меньшее количество повторов мотивов по сравнению с сортом, несущим аллель *Glu-B1a*.

Известно, что длина центрального домена, т. е. количество повторов его мотивов, влияет на эластичность теста (Gianibelli et al., 2001). Возможно, у генотипов Авеста, С-75094 и Ленинградка крупнозерная одним из факторов невысоких хлебопекарных качеств является уменьшение количества повторов мотивов GQQ, PGQGQQ, GYYPTSPQQ и количества аминокислотных остатков глутамина и глицина в составе белка Glu-B1-1.

Заключение

В работе описаны ранее неизвестные нуклеотидные последовательности гена ВМСГ α -типа – *Glu-B1-1*, которые были обнаружены в ходе генотипирования аллелей генов *Glu-1* у сортов Авеста, Ленинградка крупнозерная и линии С-75094. Выявленные мутации могут быть использованы при генотипировании сортов и линий мягкой пшеницы по генам ВМСГ. Также они могут быть предложены в качестве ДНК-маркеров в селекции, однако для этого требуется дальнейший детальный анализ на предмет влияния выявленных мутаций на хлебопекарные качества зерна. Различия в последовательности нуклеотидов гена *Glu-B1-1* приводят к изменениям в предсказанных аминокислотных последовательностях их белков. У изученных генотипов предсказаны изменения в количестве три-, гекса- и нонапептидных повторов центрального домена белка, а также выявлены изменения в количестве остатков глутамина и глицина. Поскольку длина центрального домена, а также аминокислотный состав его повторяющихся мотивов значимы при определении внутри- и межмолекулярных взаимодействий молекулы белка, результаты исследования могут быть приняты во внимание при анализе вязкоупругих свойств теста и хозяйственно ценных признаков у изученных сортов и линий.

Список литературы / References

Галимова А.А., Кулуев А.Р., Исмагилов К.Р., Кулуев Б.Р. Генетический полиморфизм локусов высокомолекулярных субъединиц глютенина у сортообразцов мягкой пшеницы Предуральской степной зоны. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(4):297-305. DOI 10.18699/VJGB-23-36.

- [Galimova A.A., Kuluev A.R., Ismagilov K.R., Kuluev B.R. Genetic polymorphism of high-molecular-weight glutenin subunit loci in bread wheat varieties in the Pre-Ural steppe zone. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(4):297-305. DOI 10.18699/VJGB-23-36.]
- Anderson O.D., Greene F.C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1989;77:689-700. DOI 10.1007/BF00261246.
- Belton P.S. A hypothesis concerning the elasticity of high molecular weight subunits. In: *Wheat Kernel Proteins: Molecular and Functional Aspects*. Proceedings of the International Meeting, S. Martino Al Cimino, Viterbo (Italy), September 28–30, 1994. Viterbo: Università degli studi della Tuscia, 1994;159-165.
- Belton P.S. Mini review: on the elasticity of wheat gluten. *J. Cereal Sci.* 1999;29(2):103-107. DOI 10.1006/jcers.1998.0227.
- Belton P.S., Colquhoun I.J., Grant A., Wellner N., Field J.M., Shewry P.R., Tatham A.S. FTIR and NMR studies on the hydration of a high- M_r subunit of glutenin. *Int. J. Biol. Macromol.* 1995;17(2):74-80. DOI 10.1016/0141-8130(95)93520-8.
- D'Ovidio R., Masci S., Porceddu E. Development of a set of oligonucleotide primers specific for genes at the *Glu-1* complex loci of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91:189-194. DOI 10.1007/BF00220876.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 1987;19(1):11-15.
- Gianibelli M.C., Larroque O.R., MacRitchie F., Wrigley C.W. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem.* 2001;78(6):635-646. DOI 10.1094/CCHEM.2001.78.6.635.
- Guo H., Wu J., Lu Y., Yan Y. High-molecular-weight glutenin 1Bx17 and 1By18 subunits encoded by *Glu-B1i* enhance rheological properties and bread-making quality of wheat dough. *J. Food Qual.* 2019;2019:1958747. DOI 10.1155/2019/1958747.
- Halford N.G., Field J.M., Blair H., Urwin P., Moore K., Robert L., Thompson R., Flavell R.B., Tatham A.S., Shewry P.R. Analysis of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality. *Theor. Appl. Genet.* 1992;83:373-378. DOI 10.1007/BF00224285.
- Kohler P., Keck B., Muller S., Wieser H. Disulphide bonds in wheat gluten. In: *Wheat Kernel Proteins: Molecular and Functional Aspects*. Proceedings of the International Meeting, S. Martino Al Cimino, Viterbo (Italy), September 28–30, 1994. Viterbo: Università degli studi della Tuscia, 1994;45-54.
- Li X.J., Liu T.H., Song L.J., Zhang H., Li L.Q., Gao X. Influence of high-molecular-weight glutenin subunit composition at *Glu-A1* and *Glu-D1* loci on secondary and micro structures of gluten in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Food Chem.* 2016;213:728-734. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.07.043.
- Lindsay M.P., Tamas L., Appels R., Skerritt J.H. Direct evidence that the number and location of cysteine residues affect glutenin polymer structure. *J. Cereal Sci.* 2000;31(3):321-333. DOI 10.1006/jcers.2000.0309.
- Ma W., Zhang W., Gale K. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. *Euphytica*. 2003;134:51-60. DOI 10.1023/A:1026191918704.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. In: *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*. Proceed. of the 12th International Wheat Genetics Symposium. Yokohama, 2013;84-95.
- Nucia A., Okoń S., Tomczyńska-Mleko M. Characterization of HMW glutenin subunits in European spring common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.* 2019;66:579-588. DOI 10.1007/s10722-018-00733-x.
- Patil V.R., Talati J.G., Singh C., Parekh V.B., Jadeja G.C. Genetic variation in glutenin protein composition of aestivum and durum wheat

- cultivars and its relationship with dough quality. *Int. J. Food Properties*. 2015;18(9-12):2393-2408. DOI 10.1080/10942912.2014.980948.
- Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1987; 38:141-153. DOI 10.1146/annurev.pp.38.060187.001041.
- Ravel C., Faye A., Ben-Sadoun S., Ranoux M., Dardevet M., Dupuits C., Exbrayat F., Poncet Ch., Sourdille P., Branlard G. SNP markers for early identification of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GSs) in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2020; 133(3):751-770. DOI 10.1007/s00122-019-03505-y.
- Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S. The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye: genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality. In: Mifflin B.J. (Ed.) *Oxford Surveys of Plant and Molecular Cell Biology*. London: Oxford Univ. Press, 1989;163-219.
- Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 1992;15(2):105-120. DOI 10.1016/S0733-5210(09)80062-3.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Barro F., Barcelo P., Lazzeri P. Biotechnology of breadmaking: unravelling and manipulating the multi-protein gluten complex. *BioTechnology*. 1995;13:1185-1190. DOI 10.1038/nbt1195-1185.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Lazzeri P. Biotechnology of wheat quality. *J. Sci. Food Agric.* 1997;73(4):397-406. DOI 10.1002/(SICI)1097-0010(199704)73:4<397::AID-JSFA758>3.0.CO;2-Q.
- Tatham A.S., Drake A.F., Shewry P.R. Conformational studies of synthetic peptides corresponding to the repetitive region of the high molecular weight (HMW) glutenin subunits of wheat. *J. Cereal Sci.* 1990;11(3):189-200. DOI 10.1016/S0733-5210(09)80163-X.
- Vafin R., Rzhanova I., Askhadullin D., Askhadullin D., Vasilova N. Screening of the genotypes of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the allelic variants of *Waxy* genes and HMW glutenin subunits. *Acta Agrobot.* 2018;71(4):1746. DOI 10.5586/aa.1746.
- Wang L., Yu J.J., Wang C.C. Protein disulfide isomerase is regulated in multiple ways: consequences for conformation, activities, and pathophysiological functions. *BioEssays*. 2021;43(3):2000147. DOI 10.1002/bies.202000147.

ORCID ID

A.A. Galimova orcid.org/0000-0002-7068-3359
B.R. Kuluev orcid.org/0000-0002-1564-164X

Благодарности. Работы по генотипированию и поиску ДНК-маркеров мягкой пшеницы поддержаны грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.). Исследования по секвенированию и анализу нуклеотидных последовательностей генов глютелинов проводятся в рамках государственного задания № 122030200143-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.10.2022. После доработки 27.04.2023. Принята к публикации 12.05.2023.