

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЛЮТЕНИНА У ОБРАЗЦОВ ПШЕНИЦ – ДОНОРОВ ИММУНИТЕТА К ГРИБНЫМ ИНФЕКЦИЯМ

Л.В. Обухова

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: entin@isp.nsc.ru

Исследованы запасные белки – высокомолекулярные субъединицы глютеина (ВМСГ) у 5 образцов *Triticaceae* из коллекций сотрудников Института цитологии и генетики СО РАН (*Triticum timopheevi* Zhuk., *Triticum dicoccum* (Schrank) Schuebl., амфиплоид доктора Савова (*Triticum timopheevi* Zhuk. × *Triticum tauschii* (Cosson) Schmal.), часть из которых была использована при создании новых иммунных форм мягкой пшеницы. Для родительских форм – доноров иммунитета к грибным инфекциям – сделан прогноз хлебопекарного качества со стороны ВМСГ, а также зафиксированы аллельные состояния Glu-1 локусов как маркеры первой группы хромосом.

Ключевые слова: пшеницы-доноры, иммунитет, глютеины, оценка качества.

*Посвящается светлой памяти
Майстренко Ольги Ивановны*

Введение

Мировое разнообразие растений сохраняется в центрах генетических ресурсов растений и генных банках и является одним из основных источников улучшения сельскохозяйственных культур. Образцы из этих коллекций используются исследователями для создания новых форм. Так возникают авторские коллекции из новых форм и их родителей. Информация о свойствах родительских образцов не всегда доступна, так как она рассредоточена по статьям, подчас остается в рабочих журналах, а иногда теряется.

При создании новых форм пшениц на современном этапе необходимо иметь информацию о генетически детерминированных биохимических показателях, определяющих хлебопекарное качество. Знание этих параметров позволяет сопоставить возможности отечественных и зарубежных коллекций при выборе доноров.

В Институте цитологии и генетики СО РАН были созданы интрогрессивные формы мягкой пшеницы с высоким уровнем устойчивости к грибным инфекциям. В гибридизации участвовали коммерческие сорта мягкой пшеницы с

низким иммунитетом и образцы-доноры генов устойчивости к листовой ржавчине, мучнистой росе и другим болезням: *T. timopheevi* Zhuk., *T. dicoccum* (Schrank) Schuebl. и амфиплоид *T. timopheevi* × *T. tauschii* (синтетическая пшеница доктора М. Савова).

Большая коллекция так называемых вторичных доноров устойчивости, интрогрессивных линий *T. aestivum* L. (ТА), несущих устойчивость к листовой ржавчине от *T. timopheevi* Zhuk., была создана Е.Б. Будашкиной и Н.П. Калининой (1998). В другой коллекции, работа над которой была начата под руководством О.И. Майстренко (Maystrenko *et al.*, 1996) и продолжена ее коллегами Л.И. Лайковой, В.С. Арбузовой, Т.Т. Ефремовой и О.М. Поповой (Лайкова и др., 2004), донором иммунитета был амфиплоид (*T. timopheevi* × *T. tauschii*), созданный М. Савовым (Болгария).

Новая форма мягкой пшеницы Гибрид 21, полученная с участием *T. dicoccum*, была создана Е.Б. Будашкиной в соавторстве с М.Х. Коробейниковой (Будашкина, 1975). Гибрид 21 обладает комплексной устойчивостью к грибным инфекциям (Будашкина, 1975) и отличными

хлебопекарными качествами (Будашкина, 1975; Обухова и др., 2004).

У пшениц-доноров иммунитета к инфекциям теоретический и практический интерес представляют и другие хозяйственно важные признаки, в частности хлебопекарное качество (ХПК), которое на 47–60 % определяется запасными белками – высокомолекулярными субъединицами глютеина (Payne *et al.*, 1987), гены которых локализованы в длинных плечах 1А, 1В и 1D хромосом, образуя локусы Glu-A1, Glu-B1 и Glu-D1 (Payne, Lawrence, 1983). Каждой субъединице или парной (кодминантно наследуемой) комбинации субъединиц присвоен балл качества. Суммируя эти баллы, можно оценить вклад, вносимый ВМС-глютеиновой фракцией в качество хлеба (Payne *et al.*, 1987; Lukow *et al.*, 1989).

В настоящей работе были исследованы запасные белки, высокомолекулярные субъединицы глютеина у образцов *Triticum*, которые использовались в ИЦиГ СО РАН при создании новых форм мягкой пшеницы, а также перспективных форм для использования в дальнейшем. Целями работы были: 1) паспортизация образцов, определение аллельных состояний Glu-1 локусов, выявление полиморфизма и гетерозигот по этому признаку; 2) поиск образцов с активными *Lsu*-генами; 3) прогнозирование ХПК на основе качества Glu-1 оценок; 4) фиксация аллельных состояний Glu-1 локусов как надежных и испытанных маркеров первой группы хромосом.

Материалы и методы

Эндемичный вид *Triticum timopheevi* var. *viticulosum* ($2n = 28$, геномы GGA¹A¹) был предоставлен Е.Б. Будашкиной. Образец *T. dicocum* var. *farrum* ($2n = 28$, геномы ВВАА), происходивший из коллекции ВИР 1969 и 1970 гг. репродукции и утративший всхожесть без деструкции глютеинов, был предоставлен М.Ф. Ермаковой. В работе исследованы также два образца *T. dicocum* (№ 7647, коллекция 2 и образец О.М. Майстренко), предоставленные Н.П. Гончаровым. Синтетическая пшеница (*Triticum timopheevi* × *Triticum tauschii*), созданная доктором М. Савовым (Болгария) ($2n = 42$, геномы GGA¹A¹DD), была предоставлена Л.И. Лайковой (№ 994 ее коллекции).

Высокомолекулярные субъединицы глютеина выделяли и анализировали одномерным электрофорезом в SDS-PAGE по Обуховой с соавт. (Обухова и др., 1997). Белки выделяли из индивидуальных зерновок (в случае образца *T. timopheevi* дополнительно из образца муки весом 55 граммов (Обухова и др., 2008)). Электрофореграммы обрабатывали компьютерной программой GelPro Analyzer 4.0. Молекулярную массу (Mr) субъединиц глютеина определяли по G. Galili и M. Feldman (1983) с помощью маркерного сорта. Для этого нами была проведена калибровка ВМС-глютеинов маркерных сортов с использованием НМВ-набора белков фирмы Bio Rad. При интерпретации электрофореграмм использовали литературные сведения по аллельным состояниям глютеинкодирующих локусов (Glu-1) (Payne, Lawrence, 1983; Обухова и др., в печати; Vallega, Waines, 1987; Branlard *et al.*, 1989; Morgunov *et al.*, 1993; Piergiovanni, Blanco, 1999; Pfluger *et al.*, 2001). Качество Glu-1 в баллах оценивали по О. Lukow с соавт. (Lukow *et al.*, 1989) (табл. 1).

Результаты и обсуждение

Все полученные результаты приведены в табл. 2. Денситограмма *T. timopheevi* представлена на рисунке. В образце *T. timopheevi* не был

Таблица 1

Показатели качества для отдельных субъединиц глютеина или их пар по: Lukow *et al.*, 1989

Оценка	Локус		
	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1
	Высокомолекулярные субъединицы глютеина		
4	–	–	5+10
3	1	17+18	–
3	2*	7+8	–
3	–	13+16	–
2	–	7+9	2+12
2	–	–	3+12
1	null	7	4+12
1	–	6+8	–
1	–	20	–

Таблица 2

Субъединицы – продукты глютенинкодирующих локусов Glu-1
и оценка Glu-1 качества (в баллах) у образцов пшениц из разных коллекций

Образец	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	Glu-1- балл
<i>T. timopheevi</i> (Е.Б. Будашкина)	Mr* (103; 92,3; 67,3)	Mr*(107; 100)	–	?+?
<i>T. dicoccum</i> (М.Ф. Ермакова)	2*	(6+8)+(17+18)	–	3+1 3+3
<i>T. dicoccum</i>	2*	(6+8)	–	3+1
<i>T. dicoccum</i>	2**	(13+16)+(7+8) [#]	–	?+3
Н.П. Гончаров (№ 7647 кол. 2)				
(<i>T. timopheevi</i> × <i>T. tauschii</i>)	null	Mr*(107; 100)	1,5+Г2	1+?+ ?
Л.И. Лайкова (№ 994)				

Примечание. Mr* – субъединицы представлены в виде молекулярных масс в kDa, полученных нами (см. Материалы и методы); [#] – слабая экспрессия субъединиц (7+8) локусом Glu-B1, что указывает на гетерозиготное состояние локуса Glu-B1 (f+b). Glu-1 балл качества складывается из суммы оценок Glu-A1 + Glu-B1 + Glu-D1 (см. Материалы и методы). «?» – качество Glu-1 аллельных состояний не известно. «–» – D-геном отсутствует.

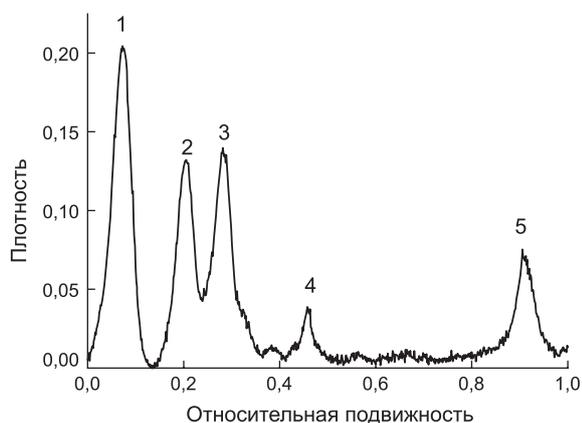


Рис. Денситограмма *T. timopheevi* получена из электрофореграммы ВМС-глютенина в SDS-PAGE. Локус Glu-A¹ контролирует протеины NN 2 (103 kDa), 4 (92,3 kDa) и 5 (67,3 kDa). Glu-G1 контролирует протеины NN 1 (107 kDa) и 3 (100 kDa).

обнаружен полиморфизм среди высоко- и низкомолекулярных субъединиц глютенина. Образец *T. timopheevi* экспрессирует пять ВМСГ. Аллельное состояние локуса Glu-G1 представлено двумя продуктами генов *IGx* и *IGy* с Mr 107 и 100 kDa соответственно. Glu-A¹ локус экспрессирует три продукта с Mr 103, 92,3 и 67,3 kDa (Обухова и др., в печати). Как известно, *T. timopheevi* имеет хорошее качество хлеба (Дорофеев и др., 1987). Это можно объяснить тем, что все гены, кодирующие ВМСГ, активно работают. В то время как в коммерческих сортах мягкой пшеницы *IAy*-ген всегда «молчит»,

могут также «молчать» гены *IAx* и *IBy* (Payne, Lawrence, 1983). Образец *T. timopheevi* потенциально может быть хорошим донором генов ВМСГ, включая *IA'y*-ген.

Образец *T. dicoccum* участвовал в создании новой формы мягкой пшеницы Гибрид 21. Эта пшеница имеет, кроме комплексной устойчивости к грибным инфекциям (Будашкина, 1975), отличные свойства зерна и муки (Будашкина, 1975; Обухова и др., 2004). Анализ ВМСГ у образца *T. dicoccum* выявил слабый полиморфизм по этому признаку. Было исследовано 215 зерновок, и только две из них имели генотип локуса Glu-B1i, определяющий наличие у них субъединиц (17+18), как и у Гибрида 21. Все другие зерновки имели аллельное состояние локуса Glu-B1d, контролирующее субъединицы (6+8). Качество Glu-B1, ранжированное ранее в балльной системе (Lukow *et al.*, 1989) (табл. 1), у субъединиц (17+18) выше, чем у субъединиц (6+8). Такое аллельное состояние локуса Glu-B1i (17+18) среди сортов мягкой пшеницы советской и российской селекции встречается редко (3 %) (Morgunov *et al.*, 1993), тогда как в сортах Аргентины и Австралии частота этого аллеля составляет 30 % (Morgunov *et al.*, 1993). Все зерновки *T. dicoccum* имели субъединицу 2*, аллель *Glu-A1b*, который имеет высокий балл по Glu-1 оценке (Lukow *et al.*, 1989) (табл. 1).

Ранее авторы работ (Vallega, Waines, 1987; Branlard *et al.*, 1989) при исследовании ВМСГ у образцов *T. dicoccum* и *T. durum* не обнаружили

ВМ-субъединиц глютеина (17+18) и (7+9), на основе чего был сделан вывод о мутационном происхождении этих субъединиц в ТА (Branlard *et al.*, 1989). У этого предположения нет оснований, так как в обоих случаях анализировалось малое количество зерновок (не более 2 или не более 10), что конечно недостаточно при низкой встречаемости аллелей. Субъединицы (17+18) ВМ-глютеина были обнаружены в образцах *T. dicocum* в более поздней работе (Piergiovanni, Blanco, 1999). Судя по результатам, полученным на невсхожих зерновках, можно думать, что аллель *Glu-B1i* присутствует в коллекции *T. dicocum* ВИР.

Нами были продолжены поиски редкого аллеля *Gli-B1i* в двух образцах *T. dicocum* из коллекции Н.П. Гончарова. Один образец имел состав субъединиц (2*; 6+8) из коллекции О.И. Майстренко, а другой образец (№ 7647 коллекция 2) содержал субъединицу 2**, кодируемую *Glu-A1* по каталогу Branland с совт. (1989), и редкий аллель локуса *Glu-B1*. Для продуктов локуса *Glu-B1* были определены Mr. Для гена *1Bx* – 94,8 kDa, а для *1By*-гена – 90,6 kDa. Эти Mr соответствуют субъединицам (13+16) согласно каталогу Р. Рауне и G. Lawtence (1983). Следует отметить, что локус *Glu-B1* слабо экспрессирует дополнительно субъединицы (7+8), кроме субъединиц (13+16), т. е. данный локус находится в гетерозиготном состоянии. По этой причине образец (№ 7647, кол. 2) нуждается в мониторинге по ВМСГ при пересевах (табл. 2). Образец *T. dicocum* с аллелем *Glu-B1f* (13+16) имеет такую же высокую *Glu-1* оценку качества, как аллель *Glu-B1i* субъединицы (17+18) (табл. 1). Аллель «f» субъединицы (13+16) еще более редок среди коммерческих сортов и в отечественных сортах не встречается (Morgunov *et al.*, 1993).

Анализ 10 индивидуальных зерновок синтетического гексаплоида (*T. timopheevi* × *T. tauschii*) д-ра М. Савова не выявил полиморфизма среди ВМСГ. Продукты локуса *Glu-G1* по подвижности в одномерном электрофорезе PAGE-SDS для синтетика совпадают с продуктами локуса *Glu-G1*, найденными в образце *T. timopheevi* из коллекции Е.Б. Будашкиной. Продукты локуса *Glu-D1* идентифицированы по каталогу (Pfluger *et al.*, 2001) и представлены в табл. 2. Обращает на себя внимание то, что локус *Glu-A1* у данного синтетика молчит по не известным пока

причинам. В литературе описаны две причины молчания генов локуса *Glu-A1* у сортов мягкой пшеницы: либо гены могут быть повреждены вставкой фрагмента мобильного элемента, либо стоп-кодоном. В нашем случае можно предположить, что локус *Glu-A1* замолчал, оказавшись под супрессией продукта(ов) 1D хромосом. Альтернативным объяснением является реорганизация в области локуса *Glu-A1*, приводящая к его инактивации.

Заключение

Как показали наши исследования, образец *T. timopheevi* экспрессирует три продукта локуса *Glu-A1*, тогда как в коммерческих сортах с гомологичного локуса экспрессируется только одна или ни одной субъединицы. Потенциально образец *T. timopheevi* может выступать в роли донора активного гена ВМСГ-1Ау и тем самым являться донором хороших хлебопекарных качеств. Можно надеяться, что в коллекции ВИР есть образец *T. dicocum* с аллелем *Glu-B1i* (17+18), который обнаружен в Гибриде 21. Образец *T. dicocum* (№ 7647 коллекция 2) имеет редкие аллели локусов *Glu-1* и нуждается в мониторинге по ВМСГ при пересевах, так как локус *Glu-B1* находится в гетерозиготном состоянии. Синтетическая пшеница д-ра М. Савова не может являться донором высокого хлебопекарного качества из-за молчания локуса *Glu-A1*.

Отметим также, что родительские формы целесообразно сохранять наравне с новыми формами для дальнейших генетико-сравнительных исследований или для использования родительских форм вновь.

Автор благодарит коллег Е.Б. Будашкину, М.Ф. Ермакову, Л.И. Лайкову и Н.П. Гончарова за предоставленные образцы, Г.В. Генералову за помощь в работе и Е.В. Левитеса за полезные обсуждения.

Литература

Будашкина Е.Б. Цитогенетическое изучение межвидовых гибридов пшеницы (*Triticum aestivum* × *Triticum dicocum*) и их селекционное значение: Дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1975. 174 с.

- Будашкина Е.Б., Калинина Н.П. Способ создания интрогрессивных линий мягкой пшеницы ($2n = 42$), устойчивых к бурой ржавчине: Российский патент № 2138155 от 19.03.1998. Государственный реестр изобретений Российской Федерации. М. 27 сентября 1998 г.
- Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В. и др. Пшеницы мира / Под ред. В.Ф. Дорофеева. Л.: Агропромиздат, 1987. 560 с.
- Лайкова Л.И., Арбузова В.С., Ефремова Т.Т., Попова О.М. Создание иммунных линий сорта Саратовская 29 с комплексной устойчивостью к грибам бурой ржавчины и мучнистой росы // Генетика. 2004. Т. 40. № 3. С. 1–4.
- Обухова Л.В., Будашкина Е.Б., Ермакова М.Ф. и др. Качество зерна и муки у интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генами устойчивости к листовой ржавчине от *Triticum timopheevii* Zhuk. // С.-х. биология. 2008. № 5. С. 38–42.
- Обухова Л.В., Будашкина Е.Б., Шумный В.К. Поиск высокомолекулярных субъединиц глютеина *Triticum timopheevi* Zhuk. у линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L. × *Triticum timopheevi* Zhuk.) // Генетика. В печати.
- Обухова Л.В., Ермакова М.Ф., Будашкина Е.Б., Генералова Г.В. Иммунный Гибрид 21 как потенциальный донор высокого хлебопекарного качества пшеницы // Селекция сельскохозяйственных культур на иммунитет. Новосибирск, 2004. С. 112–114.
- Обухова Л.В., Майстренко О.И., Генералова Г.В. и др. Состав высокомолекулярных субъединиц глютеина у замещенных линий мягкой пшеницы, созданных с участием сортов с контрастными хлебопекарными свойствами // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1179–1184.
- Branlard G., Autran J.C., Monneveux P. High molecular weight glutenin subunit in *durum* wheat (*T. durum*) // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 78. P. 353–358.
- Galili G., Feldman M. Genetic control of endosperm proteins in wheat 1. The use of high resolution one-dimensional gel electrophoresis for the allocation of genes coding for endosperm protein subunits in the common wheat cultivar Chinese Spring // Theor. Appl. Genet. 1983. V. 64. P. 97–101.
- Lukow O.M., Payne P.I., Tkachuk R. The HMW glutenin subunit composition of Canadian wheat cultivars and their association with bread-making quality // J. Sci. Food Agric. 1989. V. 46. P. 451–460.
- Maystrenko O.I., Laikova L.I., Arbutova V.S., Popova O.M. Development of analogues of common spring wheat cv Saratovskaya 29 with complex resistance to powdery mildew, leaf and stem rust // 5th Intern. Wheat Conf. Ankara, 1996. P. 144.
- Morgunov A.I., Pena R.J., Crossa J., Rajaram S. World-wide distribution of Glu-1 alleles in bread wheat // J. Genet. Breed. 1993. V. 47. P. 53–60.
- 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. Commun. 1983. V. 11. P. 29–35.
- Payne P.I., Nightingale M.A., Krattiger A.F., 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. V. 40. P. 51–65.
- Pflugger L.A., D'Ovidio R., Margiotta B. et al. Characterisation of high- and low-molecular weight glutenin subunits associated to the D genome of *Aegilops Tauschii* in a collection of synthetic hexaploid wheats // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. P. 1293–1301.
- Piergiorganni A.R., Blanco A. Variation of HMW glutenin and γ -gliadin subunits in selected accessions of *Triticum dicoccon* (Schrank) and *T. spelta* L. // Cereal. Res. Comm. 1999. V. 27 (1/2). P. 205–211.
- Vallega V., Waines J.G. High-molecular-weight glutenin subunit variation in *Triticum turgidum* var. *dicoccon* // Theor. Appl. Genet. 1987. V. 74. P. 706–710.

HIGH MOLECULAR WEIGHT GLUTENIN SUBUNITS IN WHEAT ACCESSIONS SERVING AS FUNGAL INFECTION IMMUNITY DONORS

L.V. Obukhova

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: entin@isp.nsc.ru

Summary

High molecular weight glutenin subunits (HMW) were analyzed in five Triticeae accessions from collections kept at the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS: *Triticum timopheevi* Zhuk., *Triticum dicoccum* (Schränk.) Schuebl., and Dr. Savov's amphiploid (*Triticum timopheevi* Zhuk. × *Triticum tauschii* (Cosson) Schmal.). Part of them had been used in raising new common wheat varieties possessing fungus resistance and other commercially important traits. Bread-making quality was assessed according to HMW subunit score in the parental accessions, and allelic states of Glu-1 loci as markers of Group 1 chromosomes were determined.