

ОРЛОВСКАЯ О. А.[✉], ЯЦЕВИЧ К. К., ВАКУЛА С. И., ХОТЫЛЕВА Л. В., КИЛЬЧЕСКИЙ А. В.
Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси,
Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: O.Orlovskaya@igc.by
[✉] O.Orlovskaya@igc.by, +(375 17) 284-04-10

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СУБЪЕДИНИЦ ГЛЮТЕНИНА 1ВХ6.1 И 1ВУ22.1 ОБРАЗЦА *TRITICUM SPELTA* K1731

Цель. Некоторые сорта спельты (*Triticum spelta* L.) наряду с аллелями глиадинов и высокомолекулярных субъединиц глютеинов (HMW-GS), идентичных мягкой пшенице, содержат специфические аллели, которые являются источником обогащения генофонда *T. aestivum*. Цель данной работы – идентификация, молекулярный анализ HMW-GS образца европейской спельты *T. spelta* K1731 и оценка его влияния на эластичные свойства клейковины. **Методы.** Идентификация HMW-GS проводилась методом SDS-электрофореза и ПЦП-анализа. Нуклеотидные последовательности генов определяли посредством секвенирования по Сэнгеру. Вторичную структуру белков предсказывали на on-line сервере CFSSP. **Результаты.** У образца *T. spelta* K1731 выявлены субъединицы 6.1+22.1 локуса *Glu-B1*, которые кодируются специфическим для спельт аллелем *Glu-B1be*. Определены нуклеотидные последовательности генов *1Вх6.1*, *1Ву22.1* изученного образца спельты, проведен анализ аминокислотной последовательности и вторичной структуры белка пары субъединиц 6.1+22.1. **Выводы.** Молекулярный анализ HMW-GS 1Вх6.1 и 1Ву22.1 *T. spelta* K1731 установил невысокий вклад в хлебопекарное качество зерна исследованных субъединиц.

Ключевые слова: *Triticum spelta* K1731, HMW-GS, SDS-электрофорез, секвенирование, вторичная структура белка, качество клейковины.

Запасные белки эндосперма, формирующие клейковину (глиадины и глютеины), определяют хлебопекарные качества пшеницы. Глиадины относительно мало влияют на силу муки, в то время как глютеины, состоящие из высоко- и низкомолекулярных субъединиц, играют большую роль в формировании трехмерной структуры клейковины и оказывают существенное влияние на качество хлеба [1]. Ведутся

исследования по идентификации генов, кодирующих HMW-GS у различных представителей трибы *Triticeae*: *Hordeum*, *Secale*, *Thinopyrum*, *Aegilops* и *Dasyphyrum* [2, 3]. Однако оценке влияния новых аллелей HMW-GS сородичей пшеницы на хлебопекарные свойства посвящено пока немного работ. Цель данного исследования – идентификация, молекулярный анализ HMW-GS образца европейской спельты *Triticum spelta* K1731 и оценка его влияния на эластичные свойства клейковины.

Материалы и методы

В работе использовали образец европейской спельты *T. spelta* K1731 (2n=6x=42, AABBDD) из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова. Глютеины выделяли по методике Singh et al. 1991 [4] и анализировали в SDS-PAGE [5] в вертикальной электрофоретической камере Maxigel (Biometa-Biomedizinische). HMW-GS определяли по номенклатурной системе Payne [6]. Гены HMW-GS идентифицировали с помощью 8 пар праймеров к наиболее распространенным аллелям локусов *Glu-1* [7-10]. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе Biometa-Professional в условиях, оптимальных для каждого из праймеров. Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 1,6 % агарозном геле в 1× TAE-буфере (40мМ трис-НСl, рН 8,0, 10мМ ЭДТА).

Секвенирование фрагментов осуществляли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems) с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator v3.1 Cycle 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 последо-

вательностей – базой данных GenBank при помощи анализатора BLAST Национального центра биотехнологической информации США. Нуклеотидную последовательность исследованных генов транслировали в аминокислотную последовательность с помощью ORFprogramNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Вторичную структуру белков предсказывали на online сервере CFSSP (Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server, <http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>).

Результаты и обсуждение

Анализ состава HMW-GS методом электрофореза в SDS-PAGE показал, что образец *T. Spelta* K1731 имел 5 субъединиц: 1, 6.1+22.1, 2+12 (рис.). Особый интерес представляют не характерные для сортов *T. aestivum* субъединицы 6.1+22.1 (M_r 99 и 88 kDa соответственно), подвижность которых по результатам SDS-электрофореза близка по подвижности субъединицам 6+8, и эти субъединицы, согласно литературным данным, кодируются специфическим для спельт аллелем *Glu-B1be* [11]. Данный аллель не характерен для сортов *T. aestivum*, однако с высокой частотой встречается в группе европейских спельт.

Идентификация HMW-GS также проводилась при помощи 8 пар праймеров к наиболее распространенным аллелям локусов *Glu-1*, кодирующих синтез высокомолекулярных субъединиц глютеина. ПЦР-анализ подтвердил данные электрофореза в SDS-PAGE. По локусам *Glu-A1* и *Glu-D1* у изученного нами образца *T. spelta* K1731 выявлены аллели *a* (кодируют субъединицы 1 и 2+12 соответственно), которые также широко распространены у сортов мягкой пшеницы. Можно отметить, что аллель *a* является доминирующим у европейских спельт по локусу *Glu-D1* и характеризуется невысоким вкладом в качество клейковины [12]. При использовании праймеров GluBxF/GluBxR, позволяющих амплифицировать фрагменты, ассоциированные с наиболее распространенными

генами х-типа пшеницы: *Bx7* (фрагменты 630 и 766 п. н.), *Bx6* (фрагменты ~660 и ~840 п. н.), *Bx17* (фрагмент 669 п. н.), у образца *T. spelta* K1731 синтезировались фрагменты ~840 п. н. и ~700 п. н., не характерные для *T. aestivum*. При амплификации с участием праймеров ZSBy9aF1/R3 для определения аллеля, кодирующего субъединицу у-типа в локусе *Glu-B1*, обнаружен фрагмент ~752 п. н., который не выявлен у сортов мягкой пшеницы. Таким образом, на основе данных метода электрофореза в SDS-PAGE и ПЦР-анализа установлено, что синтез фрагментов ~840 п. н. и ~700 п. н. при использовании пары праймеров GluBx указывает на наличие гена *Bx6.1*, а фрагмент ~752 п. н. при амплификации с парой праймеров ZSBy9aF1/R3 - гена *By22.1*.

HMW-GS определяют эластичные свойства клейковины в большей степени, чем остальные ее компоненты. Однако окончательно не установлена взаимосвязь между строением глютеинов и их функцией. Известно, что HMW-GS имеют три структурных домена: N – концевой (А, около 80–105 аминокислот), центральный (В, около 480–700 аминокислот), С – концевой (С, 42 аминокислоты). Домены А и С содержат повторы, а содержат много цистеиновых и положительно заряженных аминокислотных остатков. Центральный домен состоит из повторяющихся гексапептидов (последовательность QQPQG) с включением гексапептидов типа YYPTSL и трипептидов типа QQP или QPG [13]. Вторичная структура белка (α -helix, β -sheet, β -turns) также играет важную роль в определении его свойств. Изучение вторичной структуры высокомолекулярных глютеинов показало, что домены А и С содержат преимущественно α -helix и имеют глобулярную структуру. Также установлено наличие в центральном домене большого количества β -turns, которые формируют широкие спиральные структуры, в значительной степени определяющие эластичные свойства клейковины [14].

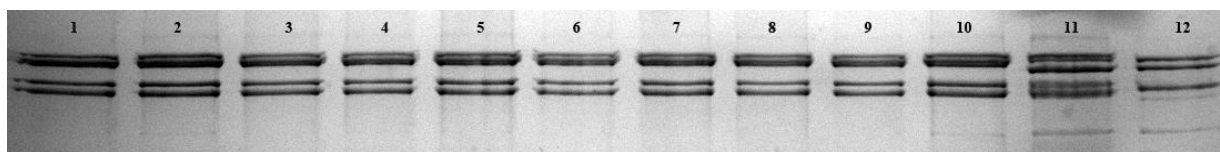


Рис. Электрофореграмма HMW-GS в SDS-PAGE растений *T. spelta* K1731: 1–10 – *T. spelta* K1731; 11 – сорт пшеницы Новосибирская 67; 12 – сорт пшеницы Целинная 20.

Мы провели молекулярный анализ генов локуса *Glu-B1* образца *T. spelta* K1731. Секвенирование ПЦР-фрагментов длиной ~840 п. н. и ~700 п. н., полученных при амплификации с праймерами GluBxF/GluBxR, показало, что они относятся к одной области гена и идентичны друг другу в районе перекрытия. Такая ситуация возникла из-за того, что прямой праймер GluBxF имеет сходство к несколькими близкорасположенными друг к другу участками ДНК в анализируемой области. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *1Вх6.1 T. spelta* K1731 зарегистрирована нами в международной молекулярной базе данных (код доступа MF686415.1). Для данной последовательности обнаружен очень высокий уровень сходства с нуклеотидной последовательностью *1ВхT. aestivum*, LT626208 (99,8 %), поэтому в дальнейшем анализе молекулярной структуры гена *1Вх6.1* мы использовали нуклеотидную последовательность полноразмерного гена *1ВхT. aestivum*, размещенную в базе GenBank. При сравнении нуклеотидных последовательностей исследуемого нами гена и *1Вх6* и *1Вх7*, которые наиболее часто встречаются у сортов пшеницы, обнаружено большое сходство с геном *1Вх6*. Отличия между ними заключались только в единичных SNPs, тогда как делеций и инсерций не обнаружено.

ДНК-последовательность гена *1Вх* была транслирована в гипотетическую последовательность аминокислот, которая имела типичную структуру высокомолекулярных субъединиц глютеина х-типа: сигнальный пептид (21 аминокислоты); N – концевой домен (86 аминокислот); центральный домен (675 аминокислот); C – концевой домен (42 аминокислоты). Данные о предсказанной с использованием CFSSP вторичной структуре субъединицы *1Вх* представлены в таблице 1. Наибольшее сходство вторичной структуры у выявленной нами субъединицы обнаружено со структурой субъединицы *1Вх6*, вклад в качество хлеба которой оценивается невысоко. Отличие между данными HMW-GS отмечено только по количеству β -sheet в центральном домене (табл. 1).

Секвенированием по Сэнгеру также была определена нуклеотидная последовательность фрагмента ~ 752 п. н. В базе данных GenBank с помощью программы BLAST установили, что наибольшим сходством с фрагментом гена *1Ву22.1* образца *T. spelta* K1731 обладают *1ВуT. Aestivum* cultivar Saumurd' Automneline A,

LT626209 и *1Ву8.1 T. aestivum*, HQ731654 (уровень идентичности 99,6 % и 99,4 % соответственно). На основании нуклеотидных последовательностей этих генов были подобраны четыре пары праймеров, перекрывающие неустановленные участки полноразмерного гена *1Ву22.1*: *Ву_1F* (GATCCTATGTTAATTTTAGACATGAAT) и *Ву_729R* (ATGGACTGTTAGTGAA-TTGATCTC) (ожидаемый ампликон размером около 730 п. н.), *Ву_608F* (CACACAACC-ATTGTCCCG) и *Ву_1361R* (GCAGAGAA-GTTGGGTAGTATCC) (ожидаемый ампликон длиной около 750 п. н.), *Ву9R-F* (GGCATTA-CACAGCTTCTCT) и *Ву_2720R* (GTCCTGG-TTGGTGTCC), (ожидаемый ампликон размером около 740 п. н.), *Ву_2301F* (ACCCAGCTTCTCTGCAGC) и *Ву_2887R* (TCACTGGCTAG-CCGATAATG) (ожидаемый ампликон длиной около 590 п. н.). Полная последовательность гена *1Ву22.1* образца *T. spelta* K1731, полученная нами, зарегистрирована в базе данных GenBank (код доступа MF686414.1). Длина кодирующей последовательности гена составила 2154 п. н. и имела наибольшее сходство с *1ВуT. aestivum* (LT626209). Отличия между ними были только в виде однонуклеотидных замен: 24 транзиции (A↔G, T↔C) и 8 трансверсий (A↔T, T→G, G→C, C→A), которые привели к 16 заменам в аминокислотной последовательности белка.

Белок, кодируемый *1Ву22.1* (MF686414) образца *T. spelta* K1731, состоит из 717 аминокислот, имеет типичную структуру высокомолекулярных субъединиц глютеина у-типа: сигнальный пептид (21 аминокислоты); N – концевой домен (104 аминокислоты); центральный (повторяющийся) домен (550 аминокислот); C – концевой домен (42 аминокислоты). Согласно литературным данным, субъединицы х-типа (за исключением Dх5) имеют четыре цистеиновых остатка (три – в А-доме и один – в С-доме) [15], из которых два остатка домена А формируют внутримолекулярные, а остальные два – межмолекулярные дисульфидные связи. Субъединицы у-типа содержат пять цистеиновых остатков в А-доме и по одному в доменах В и С. В образовании межмолекулярных S-S-связей у данных субъединиц участвуют по одному цистеину домена А и В. Возможность формировать ковалентные дисульфидные связи за счет цистеиновых остатков способствует увеличению эластичности клейковинных белков.

При сравнении HMW-GS1By22.1 с другими субъединицами у-типа, информация о которых размещена в базе данных GeneBank, нами не выявлено отличий по числу и расположению цистениновых остатков (5 остатков в N-концевом домене, по 1 повторяющемуся C-концевому домену, табл. 2).

Число аминокислотных остатков субъединицы 1By22.1 превышало таковое субъединицы 1By9, которая обеспечивает невысокие качества клейковины, но было немного ниже при сравнении с субъединицами 1By8 и 1By15, вклад в хлебопекарное качество которых оценивается высоко [6]. Не обнаружено отличий в строении концевых доменов и по количеству β -turns в повторяющемся домене (табл. 3). Исследованная нами субъединица имела наименьшее число такого структурного мотива, как α -helix. Количество β -sheet было ниже, чем у высококормящихся по качеству субъединиц 1By8 и 1By15 (табл. 3).

Рядом исследований установлено, что β -sheet играют большую роль в обеспечении эластичности белка, повышая его способность противостоять значительным нагрузкам без нарушения целостности структуры, поэтому содержание данных структурных мотивов в молекуле высокомолекулярных субъединиц глютелинов оказывает положительный эффект на их качественные показатели [16]. Также есть мнение, что более высокое содержание α -helix способствует формированию высококачественной клейковины [17]. Выявленное при анализе вторичной структуры белка более низкое содержание таких мотивов, как α -helix и β -sheet субъединицы 1By22.1 (по сравнению с высококормящимися по качеству субъединицами 1By8 и 1By15), позволяет предположить невысокий вклад в качество клейковины исследованной субъединицы *T. spelta*.

Таблица 1. Предсказанная вторичная структура 1Vx субъединиц высокомолекулярных глютелинов пшеницы

Субъединица	Номер доступа в GenBank	Вид	Структурные мотивы	Количество структурных мотивов в различных доменах белка		
				NT	CR	CT
1Vx	LT626208	<i>T. aestivum</i>	α -helix	7	18	1
			β -sheet	6	29	-
			β -turns	6	88	3
1Vx6	KX454509	<i>T. aestivum</i>	α -helix	7	18	1
			β -sheet	6	31	-
			β -turns	6	88	3
1Vx7	X13927	<i>T. aestivum</i>	α -helix	6	13	1
			β -sheet	6	28	-
			β -turns	5	87	3
1Vx13	EF540764	<i>T. aestivum</i>	α -helix	6	15	1
			β -sheet	5	31	-
			β -turns	8	88	3

Таблица 2. Аминокислотная последовательность субъединицы 1By22.1 *T. spelta* K1731 и 1By субъединиц высокомолекулярных глютелинов *T. aestivum*

Субъединица	Номер доступа в GenBank	Вид	Число аминокислотных остатков					Число цистениновых остатков			
			SP	NT	CR	CT	всего	NT	CR	CT	всего
1By8	AY245797	<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
1By22.1	MF686414	<i>T. spelta</i>	21	104	550	42	717	3	3	1	7

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

Таблица 3. Предсказанная вторичная структура субъединицы 1Ву22.1 *T. spelta* K1731 и 1Ву субъединиц высокомолекулярных глютеинов *T. aestivum*

Субъединица	Номер доступа в GenBank	Вид	Структурные мотивы	Количество структурных мотивов в различных доменах белка		
				NT	CR	CT
1Ву8	AY245797	<i>T. aestivum</i>	α -helix	5	22	3
			β -sheet	6	24	2
			β -turns	6	83	4
1Ву9	X61026	<i>T. aestivum</i>	α -helix	5	18	3
			β -sheet	6	22	2
			β -turns	6	83	4
1Ву15	DQ086215	<i>T. aestivum</i>	α -helix	5	24	3
			β -sheet	6	23	2
			β -turns	6	83	4
1Ву22.1	MF686414	<i>T. spelta</i>	α -helix	5	20	3
			β -sheet	6	22	2
			β -turns	6	83	4

Таким образом, анализ аминокислотной последовательности и вторичной структуры белка HMW-GS 1Вх 6.1 и 1Ву 22.1, в сравнении с субъединицами 1Вх и 1Ву с высоким вкладом в качество, не выявил предпосылок для формирования высоких хлебопекарных качеств изученными субъединицами образца *T. spelta*. Данное предположение было подтверждено методом определения качества клейковины по величине деформации ее шарика под действием нагрузки сжатия с использованием прибора ИДК, согласно которому образец *T. spelta* K1731 характеризовался невысоким качеством клейковины (III группа качества). Полученные результаты согласуются с данными научной литературы, согласно которым зерно спельты содержит больше белка и клейковины по сравнению с мягкой пшеницей, но уступает ей по хлебопекарным свойствам [18].

Выводы

У образца *T. spelta* K1731 выявлены субъединицы 6.1+22.1, которые кодируются специфическим для спельты аллелем *Glu-B1be*. В результате секвенирования фрагментов, синтезированных при участии подобранных нами праймеров, определены нуклеотидные последовательности генов *1Вх6.1*, *1Ву22.1* образца *T. spelta* K1731, которые зарегистрированы в международной молекулярной базе данных GenBank (коды доступа MF686415.1 -*1Вх6.1*, MF686414.1 -*1Ву22.1*). Молекулярный анализ HMW-GS1Вх6.1 и 1Ву22.1 образца *T. spelta* K1731 установил невысокий вклад в качество клейковины данных субъединиц. Однако муку из спельты используют для изготовления кондитерских изделий и круп, поэтому исследованный нами образец с новыми генами, кодирующими синтез высокомолекулярных субъединиц глютеинов, можно использовать для обогащения генофонда мягкой пшеницы.

References

1. Shewry P.R., Halford N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Botany*. 2002. Vol. 53. P. 947–958.
2. Niu Z.X., Klindworth R., Wang R.R.-C., Jauhar P.P., Larkin P.J., Xu S.S. Characterization of HMW glutenin subunits in *Thynopyrum intermedium*, *Th. bessarabicum*, *Lophopyrum elongatum*, *Aegilops markgrafii*, and their addition lines in wheat. *Crop Sci*. 2011. Vol. 51, № 2. P. 667–677. doi: 10.2135/cropsci2010.04.0235.
3. Xu S.S., Khan K., Klindworth D.L., Nygard G. Evaluation and characterization of high-molecular weight 1D glutenin subunits from *Aegilops tauschii* in synthetic hexaploid wheats. *J. Cereal Sci*. 2010. Vol. 52, № 2. P. 333–336. doi: 10.1016/j.jcs.2010.05.004.
4. Singh N.K., Shepherd K.W., Cornish G.B. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*. 1991. Vol. 14. P. 203–208.
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. No. 227 (5259). P. 680–685.

6. 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. P. 29–35.
7. Ma W., Zhang W., Gale K.R. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. *Euphytica*. 2003. Vol. 134, № 1. P. 51–60. doi: 10.1023/A:1026191918704.
8. Ahmad M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 2000. Vol. 101, № 5–6. P. 892–896. doi: 10.1007/s001220051558.
9. Lafiandra D., Tucci G.F., Pavoni A., Turchetta T., Margiotta B. PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex *Glu-A1* locus in durum and bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1997. Vol. 94. P. 235–240.
10. Lei Z.S., Gale K.R., He Z.H., Gianibelli C., Larroque O., Xia X.C., Butow B.J., Ma W. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the *Glu-B1* locus in hexaploid wheat. *J. Cereal Sci.* 2006. Vol. 43, № 1. P. 94–101. doi: 10.1016/j.jcs.2005.08.003.
11. Kozub N.A., Boguslavskii R.L., Sozinov I.A., Tverdokhlebov Ye.V., Xynias I.N., Blume Ya.B., Sozinov A.A. Alleles at storage protein loci in *Triticum spelta* L. accessions and their occurrence in related wheats. *Cytology and genetics*. 2014. Vol. 48, № 1. P. 33–41.
12. Yan Y., Hsam S.L.K., Yu J.Z., Jiang Y., Ohtsuka I., Zeller F.J. HMW and LMW glutenin alleles among tetraploid and hexaploid European spelt wheat (*Triticum spelta* L.) progenitors. *Theor. Appl. Genet.* 2003. Vol. 107. P. 1321–1330. doi: 10.1007/s00122-003-1315-z.
13. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*. 2007. Vol. 24, № 2. P. 115–119. doi: 10.1016/j.fm.2006.07.004.
14. Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 1992. Vol. 15. P. 105–120.
15. Shewry P.R., Tatham A.S. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. *J. Cereal Sci.* 1997. Vol. 25. P. 207–227.
16. Tatham A.S., Mifflin B.J., Shewry P.R. The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: relationship to gluten elasticity. *Cereal Chem.* 1985. Vol. 62. P. 405–412.
17. Guo X.H., Hu J.L., Wu B.H., Wang Z.Z., Wang D., Liu D.C., 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, № 5. P. 833–844. doi: 10.1007/s10722-015-0287-6.
18. Morgun V.V., Sichkar S.M., Pochinok V.M., Ninieva A.K., Chugunkova T.V. Characterization of spelt collection samples (*Triticum spelta* L.) by elements of plant productivity structure and baking quality. *Plant physiology and genetics*. 2016. Vol. 48, № 2. P. 112–119. [in Ukrainian] / Моргун В.В., Січкач С.М., Починок В.М., Нінієва А.К., Чугункова Т.В. Характеристика колекційних зразків спельти (*Triticum spelta* L.) за елементами структури продуктивності та хлібопекарською якістю. *Фізіологія рослин і генетика*. 2016. Т. 48, № 2. С. 112–119.

ORLOVSKAYA O. A., YATSEVICH K. K., VAKULA S. I., KHOTYLEVA L. V., KILCHEVSKY A. V.

Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: O.Orlovskaya@igc.by

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HIGH-MOLECULAR WEIGHT GLUTENIN SUBUNITS 1BX6.1 AND 1BY22.1 FROM *TRITICUM SPELTA* K1731 ACCESSION

Aim. Some spelt varieties, along with alleles of gliadins and high-molecular weight glutenin subunits (HMW-GS), identical to common wheat, contain specific alleles, that are source of *Triticum aestivum* gene pool enrichment. The aim of this work is the identification, molecular analysis of HMW – GS from *T. spelta* K1731 and evaluation of their effect on the elastic properties of gluten. **Methods.** Identification of HMW-GS was carried out by SDS-electrophoresis and PCR analysis. Nucleotide gene sequences were determined by Sanger sequencing. The secondary structure of proteins was predicted on the on-line CFSSP server. **Results.** Subunits 6.1 + 22.1 of the *Glu-B1* locus encoded by the *Glu-B1be* allele were detected in the *T. spelta* K1731. The nucleotide sequences of the *1Bx6.1*, *1By22.1* genes from spelt were determined, the amino acid sequence and the protein secondary structure of 6.1 + 22.1 subunits were analyzed. **Conclusions.** Molecular analysis of HMW-GS 1Bx6.1 and 1By22.1 from *T. spelta* K1731 established a low contribution to the bread-making quality of these subunits.

Keywords: *Triticum spelta* K1731, HMW-GS, SDS electrophoresis, sequencing, secondary protein structure, gluten quality.

ОРЛОВСЬКА О. А., ЯЦЕВИЧ К. К., ВАКУЛА С. В., ХОТИЛЕВА Л. В., КІЛЬЧЕВСЬКИЙ А. В.

Інститут генетики і цитології Національної академії наук Білорусі, Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27, e-mail: O.Orlovskaya@igc.by

МОЛЕКУЛЯРНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ СУБОДИНИЦЬ ГЛЮТЕНІНУ 1BX6.1 І 1BY22.1 ЗРАЗКА *TRITICUM SPELTA* K1731

Мета. Деякі сорти спельти поряд з алелями гліадинів і високомолекулярних субодниць глютенінів (HMW-GS), ідентичних м'якій пшениці, містять специфічні алелі, які є джерелом збагачення генофонду *Triticum aestivum*. Мета цієї роботи – ідентифікація, молекулярний аналіз HMW-GS зразка європейської спельти *T. spelta* K1731 та оцінка його впливу на еластичні властивості клейковини. **Методу.** Ідентифікацію HMW-GS

проводили методом SDS-електрофорезу і ПЛП-аналізу. Нуклеотидні послідовності генів визначали за допомогою секвенування за Сенгером. Вторинну структуру білків передбачали на on-line сервері CFSSP. **Результати.** У зразка *T. spelta* K1731 виявлені субодиниці 6.1 + 22.1 локусу *Glu-B1*, які кодуються специфічним для спельт алелем *Glu-B1be*. Визначено нуклеотидні послідовності генів *1Вх6.1*, *1Ву22.1* вивченого зразка спельти, проведено аналіз амінокислотної послідовності і вторинної структури білка пари субодиниць 6.1 + 22.1. **Висновки.** Молекулярний аналіз HMW-GS 1Вх6.1 і 1Ву22.1 *T. spelta* K1731 виявив невисокий внесок у хлібопекарську якість зерна досліджених субодиниць.

Ключові слова: *Triticum spelta* K1731, HMW-GS, SDS-електрофорез, секвенування, вторинна структура білка, якість клейковини.