

Генетика и селекция пшеницы

УДК 633.11:631.51:577.2

doi: 10.15389/agrobiology.2023.5.840rus

РАЗНООБРАЗИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ГЕНОВ *Glu-1*
В КОЛЛЕКЦИИ ОБРАЗЦОВ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ
(*Triticum durum* Desf.)*В.А. КОРОБКОВА¹✉, А.Ю. КРУПИНА¹, А.В. АРХИПОВ¹, А.С. ЯНОВСКИЙ²,
А.Д. ВОРОПАЕВА², Л.А. БЕСПАЛОВА², А.А. МУДРОВА², Л.А. НАЗАРОВА¹,
М.М. МАГОМЕДОВ³, П.Ю. КРУПИН¹, М.А. САМАРИНА¹, Д.С. УЛЬЯНОВ¹,
Г.И. КАРЛОВ¹, М.Г. ДИВАШУК¹

Зерно твердой пшеницы, которое используется в макаронной и крупяной промышленно-сти, должно обладать высокими показателями качества клейковины, которое зависит от многих факторов, в том числе от аллельного состояния генов высокомолекулярных глютенинов, кодирующих субъединицы запасных белков пшеницы (HMW-GS). В настоящей работе впервые показана структура обширной коллекции сортов и селекционных линий-двуручек твердой пшеницы по сочетанию аллельных вариантов генов локуса *Glu-1*. Цель работы состояла в идентификации аллельного состояния генов высокомолекулярных глютенинов *Glu-A1* и *Glu-B1* с применением методов SDS-PAGE и KASP-анализа в коллекции, включающей сорта и перспективные селекционные линии двуручек твердой пшеницы, и оценке их влияния на индекс глютена. Материалом для исследований служила коллекция из 198 селекционных линий и сортов-двуручек твердой пшеницы, собранная в НИЦ им. П.П. Лукьяненко. Аллельное состояние HMW-GS оценивали методом SDS-PAGE. Величину индекса глютена измеряли с помощью системы Perten Glutomatic® 2100 System («PerkinElmer», США). Для выявления аллельных вариантов генов HMW-GS также применяли KASP-маркеры: *Glu-Ax1/x2**_SNP для *Glu-A1* и *BX7OE_866_SNP* для идентификации не отличимых с помощью SDS-PAGE аллелей *Glu-B1b* (*Bx7* + *Bu8*) и *Glu-B1al* (*Bx7^{OE}* + *Bu8*). Маркер *BX7OE_866_SNP* основан на SNP в промоторной области: вариант С ассоциирован с аллелем *Glu-B1al*, несущим двойную копию *Bx7* в результате дубликации локуса, вариант G — с отсутствием двойной копии *Bx7*. Вывод об аллельном состоянии генов HMW-GS *Glu-A1* и *Glu-B1* делали на основании сравнения данных, полученных с помощью KASP-анализа и SDS-PAGE. По результатам исследований было выявлено три аллеля в локусе *Glu-A1* и восемь — в локусе *Glu-B1*. В подавляющем большинстве изученных образцов присутствовал аллель *Glu-A1c* (98 %), а на долю образцов с *Glu-A1a* и *Glu-A1b* приходилось соответственно 0,5 и 1,5 %. По локусу *Glu-B1* наблюдалось численное превосходство образцов с аллелем *Glu-B1al* (60 %) над образцами, несущими *Glu-B1d* (17 %) и *Glu-B1e* (12 %). На долю образцов с субъединицами *Bx7* + *Bu8* (*Glu-B1b*) пришлось 3 % исследованных образцов. Мы также выявили редкие аллели *Glu-B1h* (1 %), *Glu-B1i* (1 %), а также *Glu-B1z* (1 %) и *Glu-B1z** (5 %). Два последних различались однонуклеотидным полиморфизмом в промоторной области гена, кодирующего *Bx7* субъединицу. Прослеживалась тенденция к распространению и закреплению в сортах твердой пшеницы аллеля *Glu-B1z**. Также было отмечено положительное влияние *Glu-B1d* на индекс глютена и негативный эффект *Glu-B1e* на его величину.

Ключевые слова: *Triticum durum*, твердая пшеница, высокомолекулярные глютенины, HMW-GS, *Glu-A1*, *Glu-B1*, KASP-маркер, SDS-PAGE, индекс глютена.

Твердая пшеница (*Triticum durum* Desf.) — одна из основных культур, возделываемых для производства продуктов питания. Ее зерно широко используется в макаронной и крупяной промышленности, а также в хлебопечении (1). Для получения высококачественной макаронной продукции зерно твердой пшеницы должно обладать соответствующими показателями по таким признакам, как стекловидность, содержание белка, клейковины и каротиноидных пигментов (2-4). В связи с тем, что потребители проявляют интерес к продуктам с улучшенными свойствами, возрастают и требования производителей к качеству сырья (5). Особое внимание уделяется клейковине, состояние которой оценивают с помощью индекса глютена, характеризующего силу внутри- и межмолекулярных связей. Индекс глютена также используют в селекционной работе для отбора наиболее перспективных

* Исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-16-00121 и Государственного задания FGUM-2022-0001.

линий твердой пшеницы наряду с такими классическими методами, как анализ фаринограмм и миксограмм или определение SDS-седиментации (6, 7). Индекс глютена крайне важен для современной технологии высокотемпературной сушки макаронных изделий, которая широко применяется в производстве пасты в Северной Америке, Австралии и странах Европы. Эта технология, увеличивающая как объем, так и эффективность производства макаронной продукции, используется и в России, однако ее широкому распространению в нашей стране и странах СНГ препятствует малое число сортов твердой пшеницы с требуемой генетической основой, обеспечивающей клейковину определенного качества (8, 9).

Качество клейковины твердой пшеницы, определяемое ее реологическими свойствами, зависит от компонентов глиадиновой и глютелиновой фракций белка, соотношения глиадинов и глютелинов, аллельных вариантов глиадиновых и глютелиновых локусов, а также от взаимодействия генотип—среда (10–12). Глютелины — запасные белки пшеницы, состоящие из связанных между собой многочисленных полипептидных цепей (субъединиц) (13, 14). Глютелиновая фракция белка образуется высокомолекулярными (high molecular weight, HMW) и низкомолекулярными (low molecular weight, LMW) глютелинами. Гены, кодирующие высокомолекулярные глютелины, находятся в локусе *Glu-1*, гены низкомолекулярных глютелинов локализованы в *Glu-3* (15).

Высоко- и низкомолекулярные глютелины неодинаковы по своему влиянию на качество клейковины твердой пшеницы и макаронных изделий. На качество зерна и конечной продукции наибольшее влияние оказывают LMW-глютелины (10, 16, 17). Вместе с тем влияние HMW-глютелинов также немаловажно (11, 18, 19). Высокомолекулярные глютелины у твердой пшеницы кодируются локусами *Glu-A1* и *Glu-B1*, каждый из них кодирует х- и у-субъединицы, возникшие в результате древней дупликации, при этом у-субъединица у *Glu-A1* не экспрессируется (13). О влиянии аллельного состояния *Glu-A1* на качество изделий из твердой пшеницы нет однозначного мнения из-за фактической фиксации нуль-аллеля *Glu-A1c* в большинстве мировых коллекций современных сортов (19, 20). К аллелям *Glu-B1* с положительным влиянием на качество клейковины твердой пшеницы и макаронных изделий относят, например, *Glu-B1b* (Bx7 + By8), *Glu-B1al* (Bx7^{OE} + By8), *Glu-B1d* (Bx6 + By8), *Glu-B1h* (Bx14 + By15), *Glu-B1z* (Bx7 + By15), к аллелям с негативным эффектом — *Glu-B1e* (Bx20 + By20) (19, 21, 22).

Поскольку гены высокомолекулярных глютелинов характеризуются значительным разнообразием аллельных вариантов субъединиц белков, различающихся по степени влияния на качество зерна твердой пшеницы, вызывает интерес изучение распространения аллельных вариантов генов HMW-GS, а также сочетания их аллелей в разных коллекциях твердой пшеницы (16, 19, 23). Несмотря на точность таких методов детекции субъединиц запасных белков зерна, как lab-on-a-chip, жидкостная хроматография и масс-спектрометрия, электрофорез белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) остается наиболее доступным и широко используемым (11, 21, 22).

Аллельное состояние генов *Glu* определяют с помощью классической полимеразной цепной реакции (ПЦР) с разделением продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном геле, а также конкурентной аллель-специфичной ПЦР, или KASP (kompetitive allele specific PCR) (24). KASP-маркеры позволяют различать однонуклеотидные полиморфизмы между аллелями (single nucleotide polymorphisms, SNPs) за счет конкуренции

между двумя прямыми праймерами — олигонуклеотидными последовательностями, которые комплементарны целевому участку ДНК, но различаются на 3'-конце целевыми SNP, а на 5'-конце имеют разные «хвосты» с уникальными последовательностями. В набор для KASP помимо двух альтернативных прямых и одного общего обратного праймера входят две FRET-касеты (fluorescence resonance energy transfer, перенос энергии резонанса флуоресценции), каждая из которых представляет собой двуцепочечный олигонуклеотид. Одна цепочка FRET-касеты с 3'-конца комплементарна уникальному «хвосту» того или иного прямого праймера, а на 5'-конце несет ковалентно связанный флуорофор (как правило, одна кассета несет FAM, другая — HEX); вторая цепочка FRET-касеты (комплементарная первой) на 3'-конце несет гаситель флуорофора.

В первом раунде ПЦР происходит отжиг одного из альтернативных прямых праймеров: в конкуренции между прямыми альтернативными праймерами преимуществом обладает праймер, соответствующий SNP матричной ДНК, с которой проходит ПЦР. Во втором раунде ПЦР происходит отжиг обратного (общего) праймера. В третьем раунде ПЦР на «хвосте» прямого праймера происходит отжиг той из двух FRET-кассет, которая комплементарна «хвосту» прямого праймера, имевшего преимущество. В результате происходит пространственная изоляция флуорофора и гасителя и наблюдается испускание сигнала (FAM или HEX). В случае если анализируется гетерозигота, детектируются одновременно два сигнала (24). Благодаря тому, что KASP-метод основан на детекции сигнала в ПЦР в реальном времени, в нем отсутствует этап разделения фрагментов в геле, что значительно ускоряет процедуру генотипирования.

Использование маркеров системы KASP позволяет эффективно выявлять как однонуклеотидные полиморфизмы, так и инсерции/делеции специфического участка ДНК (25). Основой KASP-маркеров могут быть как ранее созданные классические ПЦР-маркеры, разработанные на полиморфизмы между аллелями генов, так и однонуклеотидные полиморфизмы, выявленные методами ассоциативной генетики с помощью высокопроизводительного SNP-генотипирования (26). KASP-маркеры широко применяются в селекции сельскохозяйственных растений, в том числе пшеницы, благодаря высокой точности, эффективности и производительности, что позволяет выполнять масштабный скрининг коллекций сортов, расщепляющихся популяций и селекционных линий (27). KASP-маркеры используются для анализа аллельного состояния генов хозяйственно ценных признаков пшеницы, в том числе генов запасных белков (28-30).

В предыдущих исследованиях в коллекциях сортов и селекционных образцов озимой твердой пшеницы (23) и сортообразцов из питомника конкурсного сортоиспытания яровой твердой пшеницы (21), собранных в Национальном центре зерна (НЦЗ) им. П.П. Лукьяненко, мы проанализировали эффекты аллельных вариантов *Glu-A1* и *Glu-B1* в отношении качества зерна и макаронных изделий.

В настоящей работе впервые определена структура обширной коллекции сортов и селекционных линий-двуручек твердой пшеницы по сочетанию аллельных вариантов генов локуса *Glu-1*.

Цель работы состояла в идентификации аллельного состояния генов высокомолекулярных глютеинов *Glu-A1* и *Glu-B1* с применением методов SDS-PAGE и KASP-анализа в коллекции, включающей сорта и перспективные селекционные линии двуручек твердой пшеницы, и оценке их влияния на индекс глютена.

Методика. Материалом для исследований служила коллекция из 198 селекционных линий и сортов-двуручек твердой пшеницы, собранная в НЦЗ им. П.П. Лукьяненко.

Аллельное состояние HMW-GS оценивали методом SDS-PAGE согласно ранее описанной методике (23, 31). Величину индекса глютена измеряли с помощью системы Perten Glutomatic® 2100 System («PerkinElmer», США) согласно протоколу (23, 32).

Геномную ДНК выделяли из 4-суточных проростков СТАВ-методом с некоторыми изменениями с использованием титер-трубок для массового анализа (33).

Для выявления аллельных вариантов гена *Glu-A1* применяли маркер *Glu-Ax1/x2*_SNP*, включающий FAM-праймер 5'-AAGTGTAACCTCTCC-GCAACG-3' (соответствует нуль-аллелю *Glu-A1c*, Ax-null), HEX-праймер 5'-ACСТАAGTGTAACCTCTCCGCAACA-3' (соответствует наличию аллеля *Glu-A1a*, кодирующего субъединицу Ax1, или аллеля *Glu-A1b*, кодирующего субъединицу Ax2*), общий праймер 5'-CGAAGAAGCTTGGCCTGGATAG-TAT-3' (28).

Поскольку образцы с аллелем *Glu-B1b* (Bx7 + By8), несущие одну копию Bx7, и образцы с аллелем *Glu-B1a1* (Bx7^{OE} + By8), характеризующиеся чрезмерной экспрессией Bx7 в результате дупликации фрагмента локуса (34), неотличимы при анализе методом SDS-PAGE, был использован KASP-маркер Bx7^{OE}_866_SNP, включающий HEX-праймер 5'-GTGGAATATTA-GTGATGGCGTGAC-3' (соответствует наличию аллеля *Glu-B1a1*, кодирующего субъединицы Bx7^{OE} + By8), FAM-праймер 5'-GTGGAATATTA-GTGGCGTGAG-3' (соответствует отсутствию аллеля *Glu-B1a1*) и общий праймер 5'-TTCTTCTCTCGTTGGCCTTATCGC-3' (33). Маркер основан на SNP в промоторной области: вариант С ассоциирован с аллелем *Glu-B1a1*, несущим двойную копию Bx7, вариант G — с отсутствием двойной копии Bx7 (28, 29).

ПЦР проводили в 96-луночном ПЦР-планшете. ПЦР-смесь объемом 10 мкл содержала 5 мкл Master mix KBS-1050-102 с присутствием красителей FAM, HEX, ROX («LCG Biosearch Technologies», Великобритания), 1,5 пМ аллель-специфических праймеров, 3,75 пМ общего праймера и 5 мкл матричной ДНК (50 нг на лунку). Использовали протокол touchdown: 15 мин при 94 °С (активация фермента); 20 с при 94 °С, 60 с при 61-55 °С (снижение температуры с каждым циклом на 0,6 °С), 30 с при 94 °С (10 циклов); 20 с при 94 °С, 60 с при 55 °С (35 циклов); считывание сигнала 60 с при 37 °С. ПЦР проводили в BIO-RAD CFX96 («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1.

Вывод об аллельном состоянии генов HMW-GS *Glu-A1* и *Glu-B1* делали на основании сравнения результатов, полученных с помощью KASP-анализа и SDS-PAGE.

При статистической обработке данных по индексу глютена, выраженного в процентах, проводили трансформация logit (35), после чего все расчеты велись с преобразованными значениями. Для различных состояний входных категорий значимость различий среднего индекса глютена оценивали по критерию Тьюки для множественных парных сравнений при 95 % доверительном интервале для однофакторных моделей ANOVA (<https://www.statsmodels.org/dev/generated/statsmodels.sandbox.stats.multicomp.MultiComparison.html>).

Результаты. По результатам KASP-анализа и SDS-PAGE были

получены данные о структуре коллекции селекционных линий и сортов-двуручек твердой пшеницы (рис. 1, приложение 1; полностью данные приложения по 198 образцам см. на <http://www.agrobiology.ru>).

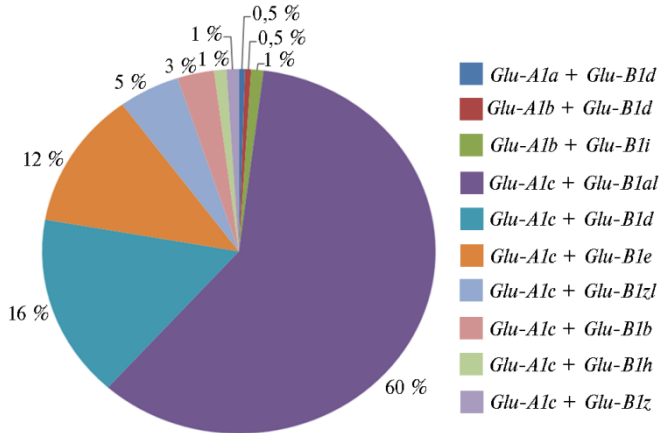


Рис. 1. Распределение сочетаний аллелей генов HMW-GS у образцов из коллекции селекционных линий и сортов-двуручек твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) (Национальный центр зерна имени П.П. Лукьяненко, 2021 год).

Приложение 1. Аллельные варианты генов HMW-GS в коллекции селекционных линий и сортов-двуручек твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.), собранной в НИЦ имени П.П. Лукьяненко (Национальный центр зерна имени П.П. Лукьяненко, 2021 год)

№ п/п	Образец	Аллель <i>Glu-A1</i>	Аллель <i>Glu-B1</i>
1	4801h142	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
2	4822h19	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
3	3902h3-18-3	<i>Glu-A1b</i>	<i>Glu-B1i</i>
4	4646h22	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
5	4583h47	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
6	4789h26	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
7	4290h4	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
8	4754h76	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
9	4507h14	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
10	4799h38	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1b</i>
11	4387h8	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
12	4782h67	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1b</i>
13	4503h23	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1b</i>
14	4293h25	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1b</i>
15	4810h54	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
16	4814h20	<i>Glu-A1b</i>	<i>Glu-B1i</i>
17	4291h83	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
18	4297h12	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
19	4316h90	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1a1</i>
20	4249h103	<i>Glu-A1c</i>	<i>Glu-B1d</i>

Установлено, что 194 образца из коллекции (98 %) имели аллель *Glu-A1c*, что свидетельствовало об отсутствии у них субъединицы Ax. Также были обнаружены образцы с аллелями *Glu-A1a* (1 образец) и *Glu-A1b* (3 образца), несущие соответственно субъединицы Ax1 и Ax2*.

По локусу *Glu-B1* мы выявили 8 вариантов аллелей. Аллель *Glu-B1b*, соответствующий наличию субъединиц Vx7 + Vy8, был обнаружен у 6 образцов. Сочетание субъединиц Vx6 + Vy8, присущее *Glu-B1d*, выявлено у 34 образцов, что составляет 17 % изучаемой коллекции. Аллель *Glu-B1e* несли 24 образца с субъединицами Vx20 + Vy20. Редкими аллелями были *Glu-B1h* (Vx14 + Vy15) и *Glu-B1i* (Vx17 + Vy18), каждый из которых встречался только у двух образцов (соответственно у 3552h59-18-7 и COLOSSEO и у 4814h20 и 3902h3-18-3). Наибольшая часть коллекции (118 образцов, или 60 %) была представлена аллелем *Glu-B1a1* (Vx7^{OE} + Vx8), для которого характерна чрезмерная экспрессия субъединицы Vx7, обусловленная дупликацией фрагмента локуса (34). В образцах с субъединицами Vx7 + Vy15 наблюдался полиморфизм по KASP-маркеру: два образца (4636h22 и 4593h36) показали вариант G, 10 образцов — вариант C в промоторной области, в связи с чем первый вариант мы назвали *Glu-B1z* (Vx7 + Vy15), второй — *Glu-B1z**, субъединицы условно обозначены Vx7(C) + Vy15 (рис. 2). *Glu-A1a* и *Glu-A1b* в изученной коллекции твердой пшеницы встречались только в комбинации с *Glu-B1d* и *Glu-B1i*. *Glu-B1d* также встречался в сочетании с *Glu-A1c*.

На рисунке 2 представлены паттерны белковых субъединиц высокомолекулярных глютеинов, идентифицированные в процессе анализа методом SDS-PAGE и дополненные результатами KASP-анализа.

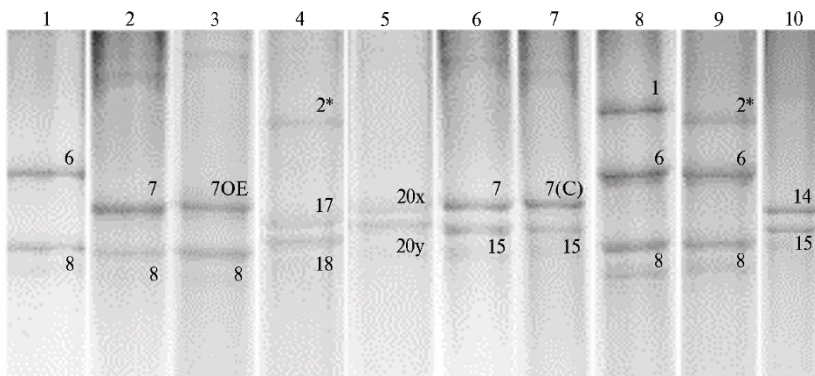


Рис. 2. Паттерны сочетаний субъединиц HMW-GS, детектированные у образцов из коллекции селекционных линий и сортов-двуручек твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) методом SDS-PAGE и подтвержденные с помощью KASP-анализа: 1 — 4598h48 (Bx6 + By8), 2 — ALLEMANNO (Bx7 + By8), 3 — 4583h47 (Bx7OE + By8), 4 — 4814h20 (Ax2*; Bx17 + By18), 5 — SAN MARCO (Bx20 + By20), 6 — 4593h36 (Bx7 + By15), 7 — 4808h8 (Bx7(C) + By15), 8 — 4626h42 (Ax1; Bx6 + By8), 9 — 4391h47 (Ax2*; Bx6 + By8), 10 — 3552h59-18-7 (Bx14 + By15) (Национальный центр зерна имени П.П. Лукьяненко, 2021 год).

Влияние аллелей высокомолекулярных глютеинов и составляющих их субъединиц на индекс глютена отражено в таблице. Ввиду отсутствия выборки у образцов с сочетаниями аллелей *Glu-A1a* + *Glu-B1d* и *Glu-A1b* + *Glu-B1d* статистические данные не представлены.

Величина индекса глютена у образцов из коллекции селекционных линий и сортов-двуручек твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) в зависимости от аллелей и субъединиц HMW-GS (Национальный центр зерна имени П.П. Лукьяненко, 2021 год)

	Фактор	Индекс глютена, %	Число образцов
By	By15	94,37 ^{ab}	14
	By18	99,11 ^{ab}	2
	By20	94,09 ^b	24
	By8	97,63 ^a	158
Glu-A1	<i>Glu-A1b</i>	98,91 ^a	3
	<i>Glu-A1c</i>	97,15 ^a	194
Glu-A1+Glu-B1	<i>Glu-A1b</i> + <i>Glu-B1i</i>	99,11 ^{ab}	2
	<i>Glu-A1c</i> + <i>Glu-B1al</i>	97,46 ^{ab}	118
	<i>Glu-A1c</i> + <i>Glu-B1b</i>	98,29 ^{ab}	6
	<i>Glu-A1c</i> + <i>Glu-B1d</i>	97,98 ^a	32
	<i>Glu-A1c</i> + <i>Glu-B1e</i>	94,09 ^b	24
	<i>Glu-A1c</i> + <i>Glu-B1h</i>	89,45 ^{ab}	2
	<i>Glu-A1c</i> + <i>Glu-B1z</i>	97,81 ^{ab}	2
	<i>Glu-A1c</i> + <i>Glu-B1z</i> *	94,05 ^{ab}	10
	<i>Glu-B1</i>	97,46 ^{ab}	118
Glu-B1	<i>Glu-B1b</i>	98,29 ^{ab}	6
	<i>Glu-B1d</i>	98,03 ^a	34
	<i>Glu-B1e</i>	94,09 ^b	24
	<i>Glu-B1h</i>	89,45 ^{ab}	2
	<i>Glu-B1i</i>	99,11 ^{ab}	2
	<i>Glu-B1z</i>	97,81 ^{ab}	2
	<i>Glu-B1z</i> *	94,05 ^{ab}	10

Примечание. Статистически незначимые средние значения на основании критерия Тьюки обозначены одинаковыми буквами.

Максимальное значение индекса глютена в 2021 году наблюдалось у образцов с аллелем *Glu-B1i*. Ввиду низкой встречаемости этого аллеля среди изученных образцов нам не удалось выявить для него статистически значимых отличий от других, однако он вызывает несомненный интерес для

дальнейшего изучения. Если рассматривать вклад каждой из субъединиц в повышение индекса глютена, то можно заметить, что присутствие *Vu8* значительно увеличивало этот показатель. Статистически достоверное снижение индекса глютена связано с присутствием субъединицы *Vu20*, характерной для *Glu-B1e*.

Локус *Glu-A1* в наших исследованиях был представлен тремя вариантами аллелей с преобладанием *Glu-A1c* (98 %). Преобладание аллеля *Glu-A1c* прослеживается и во многих других коллекциях твердой пшеницы вне зависимости от региона происхождения сортов (36–38). И хотя аллель *Glu-A1c* повсеместно распространен и зафиксирован даже у сортов современной селекции, среди образцов твердой пшеницы встречаются генотипы с аллелями *Glu-A1a* и *Glu-A1b* (19, 23, 38). В нашей коллекции на их долю пришлось соответственно 0,5 и 1,5 %. По сравнению с современными сортами повышенной частотой встречаемости аллеля *Glu-A1a* (до 38 %) характеризуются ландрасы и стародавние сорта Средиземноморья (37, 39). Аллели *Glu-A1a* и *Glu-A1b* представляют интерес для дальнейшего изучения, поскольку у образцов, в которых они комбинировались с аллелями локуса *Glu-B1*, наблюдались высокие показатели индекса глютена. Например, наибольшее значение индекса глютена было отмечено в образце с сочетанием *Glu-A1b* + *Glu-B1i*, однако ввиду малой выборки нам не удалось выявить статистически значимых различий между этим сочетанием аллелей и другими сочетаниями (см. табл.).

Локус *Glu-B1* был представлен 8 аллельными вариантами. Доминирующее положение среди всех обнаруженных вариантов занимал аллель *Glu-B1a1* (60 %) с субъединицами *Vx7^{OE}* + *Vu8*. В связи с тем, что SDS-PAGE не позволяет отличить *Vx7^{OE}* + *Vu8* (*Glu-B1a1*) от *Vx7* + *Vu8* (*Glu-B1b*), мы провели анализ с помощью KASP-маркера, выявляющего полиморфизм C/G в промоторной области гена, кодирующего субъединицу *Vx7* (28). В большинстве других исследований KASP-анализ не проводился, а состав субъединиц определялся с помощью SDS-PAGE. Если объединить полученные данные по *Glu-B1b* и *Glu-B1a1*, то мы получим долю в 63 % (124 образца), близкую к показателям в европейских (37) и австралийских (38) коллекциях твердых пшениц. По нашим данным, образцы с аллелями *Glu-B1a1* и *Glu-B1b* обладали высокими значениями индекса глютена (см. табл.).

Сочетание субъединиц *Vx6* + *Vu8* (*Glu-B1d*) в сортах мягкой пшеницы приводит к ухудшению хлебопекарных качеств, а в сортах твердой пшеницы, напротив, ассоциировано с высокими показателями качества клейковины (37, 38, 40). По нашим данным, образцы, несущие *Glu-B1d*, также характеризовались высокими показателями индекса глютена (см. табл.). Этот аллель умеренно распространен в средиземноморских сортах (37), где на его долю приходится около 20 % образцов, как и в наших исследованиях. Значительное распространение *Glu-B1d* наблюдается в сортах США и Канады (около 70 %) (38, 41).

Аллель *Glu-B1e* (*Vx20* + *Vu20*) ухудшает показатели качества клейковины (22, 40, 42). В современных сортах он встречается реже, чем в ландрасах и сортах старой селекции (16, 37). Хотя он и снижает значение индекса глютена, этот аллель присутствует (15–20 %) в современных сортах твердой пшеницы (19, 21, 39). Это может объясняться тем, что индекс глютена не единственный показатель, определяющий качество макаронных изделий. Поскольку *Vx20*+*Vu20* по-прежнему встречается у современных сортов коммерческого использования, такие сорта интересны для поиска и изучения других генетических систем, определяющих высокое качество

макаронных изделий (LMW-GS, содержание крахмала и белка, глиадины, индекс цвета).

Интерес представляют выявленные редкие аллели *Glu-B1h*, *Glu-B1z*, *Glu-B1z**, *Glu-B1i*, поскольку новые аллели позволяют разнообразить генофонд твердой пшеницы и расширить спектр технологических качеств продуктов питания, произведенных из сортов твердой пшеницы. Небольшая численность образцов с аллелями *Glu-B1i* (Vx17 + Vy18) и *Glu-B1h* (Vx14 + Vy15) не позволила в полной мере оценить их влияние на индекс глютена, однако они характеризовались соответственно самым высоким и самым низким средним значением индекса глютена (см. табл.). Другие исследователи отмечают сниженное значение показателя SDS-седиментации при оценке клейковины у образцов с субъединицами Vx14+Vy15 по сравнению с образцами, имеющими Vx17+Vy18 (20).

С помощью KASP-анализа мы выявили два варианта *Glu-B1z* (Vx7 + Vy15) с двумя вариантами SNP в промоторной части гена, кодирующего субъединицу Vx7. Образцы с полиморфизмом G — *Glu-B1z* (2 образца), образцы с полиморфизмом C были обозначены нами *Glu-B1z** (10 образцов). Поскольку промотор влияет на экспрессию белка, можно ожидать, что выявленные SNP приводят к фенотипическим различиям между сортами, обладающими аллелями *Glu-B1z* и *Glu-B1z**. Косвенно это подтверждают различия средних значений индекса глютена между образцами, несущими два указанных аллеля (см. табл.). Из-за малого объема выборки разница была статистически недостоверной, поэтому влияние этого SNP требует дальнейшего изучения. Кроме того, интересно, что число образцов с аллелем *Glu-B1z** (5 %) преобладало над числом образцов с широко используемым в селекции твердой пшеницы аллелем *Glu-B1b* (3 %), то есть аллель *Glu-B1z** постепенно распространяется и закрепляется в современных сортах твердой пшеницы.

Таким образом, в результате анализа 198 линий и сортов-двуручек твердой пшеницы из коллекции НЦЗ имени П.П. Лукьяненко мы установили, что в подавляющем большинстве изученных образцов присутствовал аллель *Glu-A1c* (98 %), а на долю образцов с *Glu-A1a* и *Glu-A1b* приходилось соответственно 0,5 и 1,5 %. По локусу *Glu-B1* наблюдалось численное превосходство образцов с аллелем *Glu-B1a1* (60 %) над образцами, несущими *Glu-B1d* (17 %) и *Glu-B1e* (12 %). На долю образцов с субъединицами Vx7 + Vy8 (*Glu-B1b*) пришлось 3 % от числа исследованных. Кроме того, мы выявили редкие аллели *Glu-B1h* (1 %), *Glu-B1i* (1 %), а также *Glu-B1z* (1 %) и *Glu-B1z** (5 %). Два последних различались однонуклеотидным полиморфизмом в промоторной области гена, кодирующего субъединицу Vx7. Прослеживалась тенденция к распространению и закреплению в сортах твердой пшеницы аллеля *Glu-B1z**. Также было отмечено положительное влияние *Glu-B1d* на индекс глютена и оказываемый на его величину негативный эффект *Glu-B1e*. Результаты анализа образцов двуручек, описанные в настоящей статье, вместе с ранее опубликованными данными, полученными при анализе коллекции озимой твердой пшеницы и перспективных сортообразцов яровой твердой пшеницы, расширяют представления о влиянии высокомолекулярных глютеинов на качество зерна, клейковины и макаронных изделий и могут быть полезны в селекционной работе по улучшению твердой пшеницы и созданию востребованных в производстве сортов.

e-mail: bowlingistka@gmail.com ✉, annshirley@yandex.ru, batler51@yandex.ru, lpukhova@yandex.ru, avelkroupin1985@gmail.com, Samarina.homa@yandex.ru, uldas1508@gmail.com, karlovg@gmail.com, divashuk@gmail.com;

²ФГБНУ Национальный центр зерна

им. П.П. Лукьяненко,

350012 Россия, г. Краснодар, квартал Центральная Усадьба КНИИСХ, 1,

e-mail: yanovskij81@list.ru, a.d.voropaeva@vk.com, bespalova_1_a@rambler.ru, mudrova.alya@mail.ru;

³Дагестанская опытная станция — филиал

ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт

генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,

368600 Россия, Республика Дагестан, Дербентский р-н, Хазарское, с. Вавилово,

e-mail: magomed.magomedov.1122@mail.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2023, V. 58, № 5, pp. 840-851

STUDY OF THE ALLELIC DIVERSITY OF THE *Glu-1* GENES IN THE DURUM WHEAT (*Triticum durum* Desf.) COLLECTION

V.A. Korobkova¹ ✉, A.Yu. Kroupina¹, A.V. Arkhipov¹, A.S. Yanovsky², A.D. Voropaeva², L.A. Bespalova², A.A. Mudrova², L.A. Nazarova¹, M.M. Magomedov³, P.Yu. Kroupin¹, M.A. Samarina¹, D.S. Ulyanov¹, G.I. Karlov¹, M.G. Divashuk¹

¹All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail bowlingistka@gmail.com (✉ corresponding author), annshirley@yandex.ru, batler51@yandex.ru, lpukhova@yandex.ru, pavelkroupin1985@gmail.com, Samarina.homa@yandex.ru, uldas1508@gmail.com, karlovg@gmail.com, divashuk@gmail.com;

²Lukyanenko National Grain Centre, Department of Breeding and Seed Production of Wheat and Triticale, 1, Tsentral'naya Usad'ba KNIISH, Krasnodar, 350012 Russia, e-mail yanovskij81@list.ru, a.d.voropaeva@vk.com, bespalova_1_a@rambler.ru, mudrova.alya@mail.ru;

³Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, Dagestan experimental station, s. Vavilovo, Khazarskoe, Derbent District, Republic of Dagestan, 368600 Russia, e-mail magomed.magomedov.1122@mail.ru ORCID:

Korobkova V.A. orcid.org/0009-0009-2330-3681

Kroupina A.Yu. orcid.org/0000-0003-3654-8310

Arkhipov A.V. orcid.org/0000-0003-1195-6086

Yanovsky A.S. orcid.org/0000-0003-3169-6066

Voropaeva A.D. orcid.org/0009-0008-3989-2188

Bespalova L.A. orcid.org/0000-0002-0245-7835

Mudrova A.A. orcid.org/0000-0001-7292-0867

Nazarova L.A. orcid.org/0000-0002-4056-8907

Magomedov M.M. orcid.org/0009-0006-0879-9226

Kroupin P.Yu. orcid.org/0000-0001-6858-3941

Samarina M.A. orcid.org/0000-0001-9102-4208

Ulyanov D.S. orcid.org/0000-0002-5880-5931

Karlov G.I. orcid.org/0000-0002-9016-103X

Divashuk M.G. orcid.org/0000-0001-6221-3659

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by the Russian Science Foundation, grant No. 21-16-00121 and State assignment FGUM-2022-0001

Final revision received June 13, 2023

doi: 10.15389/agrobiol.2023.5.840eng

Accepted August 22, 2023

Abstract

Durum wheat grain, which is used in the production of pasta and groats, must meet requirements for specific parameters of gluten quality. Its high quality depends on various factors, including the allelic state of the high-molecular-weight glutenin genes that encode subunits of wheat storage proteins (HMW-GS). This work presents, for the first time, the allelic structure of the *Glu-1* loci in a wide collection of facultative durum wheat varieties and breeding lines. The objective of this study was to identify the allelic state of the *Glu-A1* and *Glu-B1* genes which encode high-molecular-weight glutenins in this collection. Additionally, the study aimed to evaluate the impact of these genes on the gluten index. The material for the research consisted of a collection of 198 breeding lines and varieties of facultative durum wheat obtained from the Lukyanenko National Grain Center. The allelic state of HMW-GS was assessed using SDS-PAGE. The gluten index value was measured using the Perten Glutomat® 2100 System (PerkinElmer, USA). To identify allelic variants of HMW-GS genes, KASP markers were also used. The *Glu-Ax1/x2**_SNP marker was utilized to identify the alleles of *Glu-A1*. The *BX7OE_866*_SNP marker was employed to differentiate between the *Glu-B1b* (Bx7 + By8) and *Glu-B1a1* (Bx7OE + By8) alleles, which cannot be distinguished through SDS-PAGE. The *BX7OE_866*_SNP marker is based on a single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region: the C variant is associated with the *Glu-B1a1* allele, which carries a duplicated copy of the Bx7 locus,

while the G variant is associated with the absence of the Bx7 duplication. The allelic state of the *Glu-A1* and *Glu-B1* was identified by comparing the results obtained using the KASP and SDS-PAGE assays. According to the research results, three alleles were identified for *Glu-A1*, and eight alleles were identified for *Glu-B1*. The vast majority of the studied accessions contained the *Glu-A1c* allele (98 %), while the proportion of accessions with *Glu-A1a* and *Glu-A1b* accounted for 0.5 % and 1.5 %, respectively. For *Glu-B1*, there was a higher number of accessions with the *Glu-B1a1* allele (60 %) compared to accessions carrying *Glu-B1d* (17 %) and *Glu-B1e* (12 %). The accessions containing subunits Bx7 + By8 (*Glu-B1b*) accounted for 3 % of the collection. In addition, rare alleles *Glu-B1h* (1 %), *Glu-B1i* (1 %), as well as *Glu-B1z* (1 %) and *Glu-B1z** (5 %) were identified. The last two differed in a single nucleotide polymorphism in the promoter region of the gene that encodes the Bx7 subunit. There was a tendency towards the distribution and fixation of the *Glu-B1z** allele in durum wheat varieties. A positive effect of *Glu-B1d* on the gluten index and a negative effect of *Glu-B1e* on its value were also observed.

Keywords: *Triticum durum*, durum wheat, high molecular weight glutenins, HMW-GS, *Glu-A1*, *Glu-B1*, KASP marker, SDS-PAGE, gluten index.

REFERENCES

1. Mastrangelo A.M., Cattivelli L. What Makes Bread and Durum Wheat Different? *Trends in Plant Science*, 2021, 26(7): 677-684 (doi: 10.1016/j.tplants.2021.01.004).
2. Fu B.X., Wang K., Dupuis B., Taylor D., Nam S. Kernel vitreousness and protein content: relationship, interaction and synergistic effects on durum wheat quality. *Journal of Cereal Science*, 2018, 79: 210-217 (doi: 10.1016/j.jcs.2017.09.003).
3. Myasnikova M.G., Mal'chikov P.N., Shabolkina E.N., Sidorenko V.S., Tugareva F.V., Rozova M.A., Chakheeva T.V., Tsygankov V.I. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*, 2019, 4(32): 112-119 (doi: 10.24411/2309-348X-2019-11141) (in Russ.).
4. Kaplan Evlice A. The effect of durum wheat genotypes on cooking quality of pasta. *European Food Research and Technology*, 2022, 248(3): 815-824 (doi: 10.1007/s00217-021-03899-4).
5. Padalino L., Mastromatteo M., Lecce L., Spinelli S., Contr F., Del Nobile M.A. Effect of durum wheat cultivars on physicochemical and sensory properties of spaghetti. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94(11): 2196-2204 (doi: 10.1002/jsfa.6537).
6. Clarke F.R., Clarke J.M., Ames N.A., Knox R.E., Ross R.J. Gluten index compared with SDS-sedimentation volume for early generation selection for gluten strength in durum wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 2010, 90(1): 1-11 (doi: 10.4141/CJPS09035).
7. Cecchini C., Bresciani A., Menesatti P., Pagani M.A., Marti A. Assessing the rheological properties of durum wheat semolina: a review. *Foods*, 2021, 10(12): 2947 (doi: 10.3390/foods10122947).
8. Shevchenko S.N., Mal'chikov P.N., Myasnikova M.G., Vinchentso N., Paskuale D.V., Dzhuliyani M. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2018, 20(2-2), 220-230 (in Russ.).
9. Shevchenko S.N., Mal'chikov P.N., Myasnikova M.G., Natoli V., Chakheeva T.V. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2019, 33(12): 38-42 (doi: 10.24411/0235-2451-2019-11207) (in Russ.).
10. Edwards N.M., Mulvaney S.J., Scanlon M.G., Dexter J.E. Role of gluten and its components in determining durum semolina dough viscoelastic properties. *Cereal Chemistry*, 2003, 80(6): 755-763 (doi: 10.1094/CCHEM.2003.80.6.755).
11. Sissons M.J., Soh H.N., Turner M.A. Role of gluten and its components in influencing durum wheat dough properties and spaghetti cooking quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(10): 1874-1885 (doi: 10.1002/jsfa.2915).
12. Fois S., Schlichting L., Marchylo B., Dexter J., Motzo R., Giunta F. Environmental conditions affect semolina quality in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum* L.) cultivars with different gluten strength and gluten protein composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(14): 2664-2673 (doi: 10.1002/jsfa.4509).
13. Gianibelli M.C., Larroque O., MacRitchie F., Wrigley C.W. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chemistry*, 2001, 78(6): 635-646 (doi: 10.1094/CCHEM.2001.78.6.635).
14. Vorotyntseva M.V. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i seleksii*, 2021, 182(1): 168-185 (doi: 10.30901/2227-8834-2021-1-168-185) (in Russ.).
15. Pogna N.E., Autran J.C., Mellini F., Lafiandra D., Feillet P. Chromosome 1B-encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength. *Journal of Cereal Science*, 1990, 11(1): 15-34 (doi: 10.1016/S0733-5210(09)80178-1).
16. Subira J., Peca R.J., Álvaro F., Ammar K., Ramdani, A., Royo C. Breeding progress in the pasta-making quality of durum wheat cultivars released in Italy and Spain during the 20th Century. *Crop and Pasture Science*, 2014, 65(1): 16-26 (doi: 10.1071/CP13238).
17. Ruiz M., Bernal G., Giraldo P. An update of low molecular weight glutenin subunits in durum

- wheat relevant to breeding for quality. *Journal of Cereal Science*, 2018, 83: 236-244 (doi: 10.1016/j.jcs.2018.09.005).
18. Raciti C.N., Doust M.A., Lombardo G.M., Boggini G., Pecetti L. Characterization of durum wheat Mediterranean germplasm for high and low molecular weight glutenin subunits in relation with quality. *European Journal of Agronomy*, 2003, 19(3): 373-382 (doi: 10.1016/S1161-0301(02)00091-6).
 19. Roncallo P.F., Guzmán C., Larsen A.O., Achilli A.L., Dreisigacker S., Molfese E., Astiz V., Echenique V. Allelic variation at glutenin loci (*Glu-1*, *Glu-2* and *Glu-3*) in a worldwide durum wheat collection and its effect on quality attributes. *Foods*, 2021, 10(11): 2845 (doi: 10.3390/foods10112845).
 20. Al-Khayri J.M., Alshegaihi R.M., Mahgoub E.I., Mansour E., Atallah O.O., Sattar M.N., Al-Mssallem M.Q., Alessa F.M., Aldaej M.I., Hassanin A.A. Association of high and low molecular weight glutenin subunits with gluten strength in tetraploid durum wheat (*Triticum turgidum* spp. *durum* L.). *Plants*, 2023, 12(6): 1416 (doi: 10.3390/plants12061416).
 21. Kroupin P.Y., Bespalova L.A., Kroupina A.Y., Yanovsky A.S., Korobkova V.A., Ulyanov D.S., Karlov G.I., Divashuk M.G. Association of high-molecular-weight glutenin subunits with grain and pasta quality in spring durum wheat (*Triticum turgidum* spp. *durum* L.). *Agronomy*, 2023, 13(6): 1510 (doi: 10.3390/agronomy13061510).
 22. Giraldo P., Ruiz M., Ibba M.I., Morris C.F., Labuschagne M.T., Igrejas G. Durum wheat storage protein composition and the role of LMW-GS in quality. In: *Wheat quality for improving processing and human health*. G. Igrejas, T.M. Ikeda, C. Guzmán (eds.) Springer International Publishing, Cham, Switzerland, 2020: 73-108 (doi: 10.1007/978-3-030-34163-3_5).
 23. Kroupina A.Y., Yanovsky A.S., Korobkova V.A., Bespalova L.A., Arkhipov A.V., Bukreeva G.I., Voropaeva A.D., Kroupin P.Y., Litvinov D.Y., Mudrova A.A., Ulyanov D.S., Karlov G.I., Divashuk M.G. Allelic variation of *Glu-A1* and *Glu-B1* genes in winter durum wheat and its effect on quality parameters. *Foods*, 2023, 12(7), 1436 (doi: 10.3390/foods12071436).
 24. He C., Holme J., Anthony J. SNP genotyping: the KASP assay. In: *Crop breeding: methods and protocols*. D. Fleury, R. Whitford (eds.). Humana New York, NY, 2014: 75-86 (doi: 10.1007/978-1-4939-0446-4_7).
 25. Nikitina E.A., Arkhipov A.V., Min'kova Ya.V., Yanovskiy A.S., Korobkova V.A., Samarina M.A., Chernook A.G., Krupin P.Yu., Karlov G.I., Divashuk M.G. *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii*, 2022, 1(6): 79-93 (doi: 10.26897/0021-342X-2022-6-79-93) (in Russ.).
 26. Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding*, 2014, 33: 1-14 (doi: 10.1007/s11032-013-9917-x).
 27. Allen A.M., Barker G.L.A., Wilkinson P., Burrige A., Winfield M., Coghill J., Uauy C., Griffiths S., Jack P., Berry S., Werner P., Melichar J.P.E., McDougall J., Gwilliam R., Robinson P., Edwards K.J. Discovery and development of exome-based, co-dominant single nucleotide polymorphism markers in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 11(3): 279-295 (doi: 10.1111/pbi.12009).
 28. Rasheed A., Wen W., Gao F., Zhai S., Jin H., Liu J., Guo Q., Zhang Y., Dreisigacker S., Xia X., He Z. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129: 1843-1860 (doi: 10.1007/s00122-016-2743-x).
 29. Ravel C., Faye A., Ben-Sadoun S., Ranoux M., Dardevet M., Dupuits C., Exbrayat F., Poncet C., Sourdille P., Branlard G. SNP markers for early identification of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GSs) in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133: 751-770 (doi: 10.1007/s00122-019-03505-y).
 30. Korobkova V.A., Bespalova L.A., Yanovskiy A.S., Voropaeva A.D., Arkhipov A.V., Shirnin S.Yu., Chernook A.G., Nikitina E.A., Ulyanov D.S., Mudrova A.A., Bukreeva G.I., Karlov G.I., Divashuk M.G. *Kormoproizvodstvo*, 2023, 4: 25-31 (doi: 10.25685/KRM.2023.4.2023.004) (in Russ.).
 31. Singh N., Shepherd K., Cornish G. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 1991, 14(3): 203-208 (doi: 10.1016/S0733-5210(09)80039-8).
 32. *Perten Glutomatic-PERGM. PerkinElmer*. Available: <https://www.matt.nz/Products/Grain/Grain-Applications/Flour-Milling/Glutomatic/>. Accessed: 19.05.2023.
 33. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4326 (doi: 10.1093/nar/8.19.4321).
 34. Ragupathy R., Naeem H. A., Reimer E., Lukow O.M., Sapirstein H.D., Cloutier S. Evolutionary origin of the segmental duplication encompassing the wheat *GLU-B1* locus encoding the overexpressed Bx7 (Bx7^{OE}) high molecular weight glutenin subunit. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 116: 283-296 (doi: 10.1007/s00122-007-0666-2).
 35. Warton D.I., Hui F.K. The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology*, 2011, 92(1): 3-10 (doi: 10.1890/10-0340.1).
 36. Gregová E., Medvecká E., Jomová K., Šliková S. Characterization of durum wheat (*Triticum durum*

- Desf.) quality from gliadin and glutenin protein composition. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021: 610-615.
37. Nazco R., Peca R.J., Ammar K., Villegas D., Crossa J., Moragues M., Royo C. Variability in glutenin subunit composition of Mediterranean durum wheat germplasm and its relationship with gluten strength. *The Journal of Agricultural Science*, 2014, 152(3): 379-393 (doi: 10.1017/S0021859613000117).
 38. Sissons M.J., Ames N.P., Hare R.A., Clarke J.M. Relationship between glutenin subunit composition and gluten strength measurements in durum wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85(14): 2445-2452 (doi: 10.1002/jsfa.2272).
 39. Moragues M., Zarco-Hernández J., Moralejo M.A., Royo C. Genetic diversity of glutenin protein subunits composition in durum wheat landraces [*Triticum turgidum* ssp. *turgidum* Convar. *durum* (Desf.) MacKey] from the Mediterranean Basin. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2006, 53: 993-1002 (doi: 10.1007/s10722-004-7367-3).
 40. Ammar K., Kronstad W.E., Morris C.F. Breadmaking quality of selected durum wheat genotypes and its relationship with high molecular weight glutenin subunits allelic variation and gluten protein polymeric composition. *Cereal Chemistry*, 2000, 77(2): 230-236 (doi: 10.1094/CCHEM.2000.77.2.230).
 41. Chegdali Y., Ouabbou H., Essamadi A., Cervantes F., Ibba M.I., Guzmán C. Assessment of the glutenin subunits diversity in a durum wheat (*T. turgidum* ssp. *durum*) collection from Morocco. *Agronomy*, 2020, 10(7): 957 (doi: 10.3390/agronomy10070957).
 42. Brites C., Carrillo J.M. Influence of high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) glutenin subunits controlled by *Glu-1* and *Glu-3* loci on durum wheat quality. *Cereal Chemistry*, 2001, 78(1): 59-63 (doi: 10.1094/CCHEM.2001.78.1.59).