

УДК 633.111.1:575.113.2

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ КАЧЕСТВ ЗЕРНА И АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ *waxy*-ГЕНОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2021 г. А. А. Галимова<sup>1</sup>, \*, Б. Р. Кулуев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, Россия

\*e-mail: aiz.galimova@yandex.ru

Поступила в редакцию 04.12.2020 г.

После доработки 22.03.2021 г.

Принята к публикации 22.03.2021 г.

Мягкая пшеница является наиболее востребованной пищевой культурой в мире и занимает огромные посевные площади. Хлебопекарные качества данной культуры определяют пищевую и коммерческую ценности ее сортов. Улучшение качества зерна по хлебопекарным показателям – важнейший приоритет как для классической, так и для маркер-ориентированной селекции мягкой пшеницы. Данные качества определяются большим числом генов и к тому же подвержены влиянию агроэкологических факторов. Средовые условия, усиливая либо ослабляя наследственный компонент, часто затрудняют выделение генетического фактора по конкретному признаку. Однако средовая изменчивость нивелируется при наличии какого-либо лимитирующего фактора (продолжительные низкие и высокие температуры, засуха, обилие осадков, недостаток минерального питания и т.д.), при котором раскрывается генетический потенциал признака и определяет генетические факторы в качестве основных детерминант развития признака. В начале обзора вкратце описаны некоторые гены, вовлеченные в реализацию хлебопекарных качеств зерна мягкой пшеницы, которые в большинстве своем зависят от белкового и углеводного компонентов, ферментного состава. Основная часть статьи посвящена генам углеводного компонента, а именно *waxy*-генам, определяющим амилозо-амилопектиновый состав зерна мягкой пшеницы, который, в свою очередь, является одним из важных факторов высоких хлебопекарных качеств зерна. В обзоре описаны аллели генов *waxy*, обуславливающие соотношение амилозы и амилопектина в крахмале зерна мягкой пшеницы. Для наиболее известных аллелей гена *waxy* приведены функциональные SNP-маркеры (single nucleotide polymorphism) с подобранными к ним праймерами и эндонуклеазами рестрикции. Эти данные будут полезны при маркер-ориентированной селекции, поскольку селекционерам весьма трудно контролировать хлебопекарные качества мягкой пшеницы без применения современных методов молекулярной генетики. Вследствие чего при классической селекции некоторые сорта пшеницы могут терять свои высокие хлебопекарные качества. Это определяет актуальность работ по поиску и изучению SNP-маркеров хлебопекарных качеств мягкой пшеницы в генах *waxy*, в том числе по уже известным функциональным маркерам хлебопекарных качеств.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum*, SNP-маркеры, функциональные ДНК-маркеры, маркер-ориентированная селекция

**DOI:** 10.31857/S004213242106003X

### ВВЕДЕНИЕ

Хлебопекарные качества зерна являются важнейшими хозяйственно-ценными признаками мягкой пшеницы и зависят от функционирования большого числа генов. Геном мягкой пшеницы, несмотря на то, что это одна из самых востребованных продовольственных культур, до сих пор остается малоизученным. Трудоемкость геномных исследований мягкой пшеницы обусловлена сложностью ее генома, состоящего из геномов трех разных организмов (BBAADD). Аллогексаплоидный геном пшеницы образован в ходе естественной гибридизации трех геномов близкородственных видов трибы пшеницевых Triticeae.

*Triticum urartu* Thum. – донор субгенома А; *Aegilops tauschii* Coss. – донор субгенома D. Наиболее вероятным донором субгенома В является *Aegilops speltoides* Tausch (Marcussen et al., 2014). Таким образом, доноры субгеномов А, В и D – родственные виды, что обуславливает присутствие большинства генов в геноме мягкой пшеницы в виде так называемых гомеологичных копий. Многокопийность генов, большой размер и сложная организация генома пшеницы значительно затрудняют как полногеномное секвенирование, так и идентификацию нуклеотидных последовательностей отдельных генов. На настоящий момент большинство работ по исследованию генома пшеницы посвя-

щены функциональному описанию секвенированных нуклеотидных последовательностей, составлению физических и генетических карт хромосом диплоидных и полиплоидных видов пшениц, изучению филогенетики и составлению родословных (Yan et al., 2000; Zhang et al., 2004; Zimin et al., 2017). Как результат, аннотированы многие важнейшие гены пшеницы, в том числе потенциально вовлеченные в реализацию хлебопекарных качеств; в целом накоплен большой объем знаний по данной тематике. Известно, что наибольший вклад в обеспечение высоких хлебопекарных качеств зерна мягкой пшеницы вносят гены белков клейковины – глиадинов и глютенинов (Чеботарь и др., 2012; Обухова, Шумный, 2018; Wang et al., 2017). Наряду с генами запасных белков немаловажными являются гены, определяющие качественный состав крахмала. Проведено множество исследовательских работ, в которых выявлены различные аллельные состояния генов *waxy*, определяющих качество крахмала (Guzmán, Alvarez, 2012; Yamamori, Guzmán, 2013; Ayala et al., 2015). Вместе с тем, обзорные работы, охватывающие весь объем имеющихся в настоящее время знаний по генам *waxy*, отсутствуют. Имеется лишь одна работа 2016 г. (Guzmán, Alvarez, 2016). Но с тех пор уже было получено множество новых результатов в этой области. Поэтому главной целью обзора стала систематизация накопленных знаний по генам *waxy*, а также описание известных функциональных SNP-маркеров генов *waxy* разных субгеномов.

#### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ СВОЙСТВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Для успешной маркер-ориентированной селекции мягкой пшеницы по хлебопекарным качествам необходимы знания о соответствующих генах, аллелях и мутациях в генах. В обеспечении хлебопекарных качеств зерна мягкой пшеницы среди множества факторов наибольшее значение имеют гены белкового компонента (гены *gli-1*, *gli-2*, *glu-1*, *glu-3* и др.), гены углеводного компонента (*waxy*-гены и др.) и гены комплекса ферментов амилаз (гены  $\alpha$ -*amy-1*,  $\alpha$ -*amy-2*,  $\beta$ -*amy-1*,  $\beta$ -*amy-2* и др.) (табл. 1).

Клейковина белкового компонента состоит в основном из двух белков – глиадина и глютенина. Деление на эти группы основано на их способности растворяться в спирте (Gupta, Shepherd, 1990): глиадины – спирторастворимые соединения, простые, мономерные белки с молекулярной массой 30–78 кДа; глютенины – не растворимые в спирте высокомолекулярные белки с массой до нескольких десятков миллионов дальтон (D’Ovidio, Masci, 2004). Глиадины подразделяют на  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\omega$ -глиадины в соответствии с их электро-

форетической подвижностью, глютенины – на высокомолекулярные HMW (high molecular weight) и низкомолекулярные LMW (low molecular weight) (Shewry, Halford, 2002). Глиадины кодируются мультигенным семейством генов в трех гомологичных локусах хромосомы 1 – *gli-A1*, *gli-B1*, *gli-D1* и хромосомы 6 – *gli-A2*, *gli-B2*, *gli-D2* (Ozuna et al., 2015). Гены глютенинов располагаются на хромосомах первой гомеологичной группы. При этом гены высокомолекулярных глютенинов обозначаются как *glu-1* (*glu-A1*, *glu-B1*, *glu-D1*), а гены низкомолекулярных – как *glu-3* (*glu-A3*, *glu-B3*, *glu-D3*) (Zhang et al., 2004). Для генов глиадинов и глютенинов характерны аллели, определяющие высокие и низкие показатели продуктивности, качества зерна, адаптивного потенциала (Конарев и др., 2000).

Крахмал – базовая составляющая углеводного компонента – состоит из амилозы и амилопектина, соотношение которых в составе зерна влияет на хлебопекарные качества муки. Ключевой фермент синтеза амилозы эндосперма – гранулозвязанная крахмальная синтаза GBSS (granule-bound starch synthase) – кодируется генами, получившими название *waxy*. Аллогексаплоидная природа мягкой пшеницы обуславливает наличие трех изоформ *waxy*-белка (*wx-A1*, *wx-B1*, *wx-D1*) (Nakamura et al., 1993). Данные изоформы кодируются гомеологичными генами *wx-A1*, *wx-B1*, *wx-D1*, расположенными на коротком плече седьмой хромосомы субгенома А (7AS), на длинном плече четвертой хромосомы субгенома А (4AL) и на коротком плече седьмой хромосомы субгенома D (7DS) соответственно (Nakamura et al., 1993, 1995). Гены *wx-A1*, *wx-B1*, *wx-D1* имеют аллели, кодирующие функционально активные *wx*-белки, и нуль-аллели, блокирующие синтез *wx*-белка (Delwiche, Graybosch, 2002). Крахмал *waxy*-мутантных пшениц, имеющих нуль-аллели по всем трем *waxy*-генам, полностью состоит из амилопектина.

Для этих мутантных растений характерно снижение показателя качества хлеба – числа падения, или индекса Хагберга, а также чрезмерная повреждаемость крахмальных гранул, что приводит к снижению выхода муки при размоле (Yasui et al., 1997).

Амилолитические ферменты относят к группе белков с высокой степенью полиморфизма. Известно, что  $\alpha$ -амилаза контролируется локусами, расположенными в шести и семи хромосомах всех гомеологичных групп (Mrva, Mares, 1999). При этом гены, находящиеся в шести хромосомах соответствующих геномов, обозначают символами  $\alpha$ -*amy-A1*,  $\alpha$ -*amy-B1*,  $\alpha$ -*amy-D1*, а локусы семи хромосом –  $\alpha$ -*amy-A2*,  $\alpha$ -*amy-B2*,  $\alpha$ -*amy-D2* (Gale et al., 1983). Синтез  $\beta$ -амилазы кодируется тремя локусами (Рыбалка, Созинов, 1980), которые от-

**Таблица 1.** Основные гены, вовлеченные в реализацию хлебопекарных качеств зерна мягкой пшеницы

Ген	Локализация	Белок	Функция	Источник
<i>waxy</i>	7AS ( <i>wx-A1</i> ) 4AL ( <i>wx-B1</i> ) 7DS ( <i>wx-D1</i> )	<i>waxy</i> -белок	Синтез амилозы	Nakamura et al., 1993
<i>gli-1</i>	1AS ( <i>gli-A1</i> ) 1BS ( <i>gli-B1</i> ) 1DS ( <i>gli-D1</i> )	$\gamma$ -, $\delta$ - и $\omega$ -глиадины	Входит в состав клейковины	Anderson et al., 2012
<i>gli-2</i>	6AS ( <i>gli-A2</i> ) 6BS ( <i>gli-B2</i> ) 6DS ( <i>gli-D2</i> )	$\alpha$ -глиадины		Li et al., 2013
<i>glu-1</i>	1AL ( <i>glu-A1</i> ) 1BL ( <i>glu-B1</i> ) 1DL ( <i>glu-D1</i> )	Высокомолекулярные глутенины		Zhang et al., 2004
<i>glu-3</i>	1AS ( <i>glu-A3</i> ) 1BS ( <i>glu-B3</i> ) 1DS ( <i>glu-D3</i> )	Низкомолекулярные глутенины		
<i><math>\alpha</math>-amy-1</i>	6AL ( <i><math>\alpha</math>-amy-A1</i> ) 6BL ( <i><math>\alpha</math>-amy-B1</i> ) 6DL ( <i><math>\alpha</math>-amy-D1</i> )	Ферменты группы $\alpha$ -амилаз	Расщепление крахмала до декстринов	Mrva, Mares, 1999; Gale et al., 1983
<i><math>\alpha</math>-amy-2</i>	7AL ( <i><math>\alpha</math>-amy-A2</i> ) 7BL ( <i><math>\alpha</math>-amy-B2</i> ) 7DL ( <i><math>\alpha</math>-amy-D2</i> )			
<i><math>\beta</math>-amy-1</i>	4AL ( <i><math>\beta</math>-amy-A1</i> ) 4DL ( <i><math>\beta</math>-amy-D1</i> )	Ферменты группы $\beta$ -амилаз	Расщепление амилозы до мальтозы	Ainsworth et al., 1985
<i><math>\beta</math>-amy-2</i>	5AL ( <i><math>\beta</math>-amyA2</i> )			

несены в две группы и обозначены как  *$\beta$ -amy-1* и  *$\beta$ -amy-2*. Лocus  *$\beta$ -amy-1* расположен в хромосомах 4A ( *$\beta$ -amy-A1*) и 4D ( *$\beta$ -amy-D1*); locus  *$\beta$ -amy-2* – в хромосоме 5A ( *$\beta$ -amy-A2*). Для каждого локуса идентифицированы по несколько аллелей (Ainsworth et al., 1983).

#### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АЛЛЕЛИ *waxy*-ГЕНОВ

Качество крахмала, фракция которого составляет около 70% от общего количества сухого вещества зерна, определяется соотношением амилозы и амилопектина – двух его основных макромолекул. Присутствие полимеров в пшенице варьирует в пределах: 22–35% для амилозы и 68–75% для амилопектина. Крахмал синтезируется внутри амилопласта и хранится в гранулах, в которых обнаружено несколько белков, называемых белками крахмальных гранул SGP (starch granule protein). Было описано десять SGP: пять поверхностных SGP с молекулярной массой 5–30 кДа и пять интегральных SGP с молекулярной массой 59–149 кДа (Schofield, Greenwell, 1987). Основные ферменты синтеза крахмала относятся ко второй

группе: гранулосвязанная крахмальная синтаза I (GBSSI, или *waxy*), крахмальная синтаза I (SSI, или SGP-3), крахмальная синтаза II (SSII, или SGP-1) и фермент, разветвляющий крахмал I (SBEI, starch-branching enzymes, или SGP-2). В синтезе амилопектина задействованы, по меньшей мере, три крахмал-синтазы (SSI, SSII, SSIII), несколько ферментов, увеличивающих и уменьшающих ветвление. Напротив, синтез амилозы в эндосперме пшеницы осуществляется только с помощью GBSSI, или *waxy*-белка, что продемонстрировано при создании первых не содержащих амилозу форм пшениц (*waxy*-пшениц), или содержащих ее в очень низких количествах (менее 3%) (Nakamura et al., 1995). Первое исследование гена *waxy* проведено на кукурузе, в которой обнаружены его нуль-аллели, произошедшие из-за вставки мобильных генетических элементов внутрь гена (Shure et al., 1983). Позднее исследованы гены *waxy* других видов культурных растений: ячменя (Rohde et al., 1988), картофеля (Visser et al., 1989), гороха посевного (Dry et al., 1992). В первых исследованиях данного гена у пшеницы (Clark et al., 1991) определена последовательность кДНК *waxy*-гена, однако принадлежность

изученного гена к определенному субгеному *T. aestivum* в то время не была установлена. Позднее удалось осуществить дифференциацию и характеристику трех *waxy*-генов (Murai et al., 1999), сходство нуклеотидных последовательностей между тремя гомеологичными генами *wx-A1*, *wx-B1* и *wx-D1* составило 95.6–96.3%, каждый из этих генов состоит из 12 экзонов и 11 интронов (Yan et al., 2000). Каждый из *waxy*-генов имеет несколько аллелей: аллель (*a*), кодирующий синтез активного белка *waxy*; нуль-аллель (*b*), при котором синтез функционального белка *waxy* отсутствует; аллели, кодирующие наработку белков *waxy* с разной степенью ферментативной активности. В табл. 2 приведен перечень наиболее известных аллелей генов *waxy*, праймеры и рестриктазы для их идентификации на основе SNP-маркеров.

При наличии мутации *waxy* в одном из гомеологичных генов, оставшиеся функциональные гены частично компенсируют дисфункцию мутантного нулевого аллеля. Хотя *waxy*-нулевые аллели вызывают относительно небольшое снижение амилозы крахмала (при наличии одного нуль-аллеля *waxy*-гена доля амилозы в составе крахмала снижается до 22.2–23.6%, при наличии двух нуль-аллелей – до 17.0–18.5%), их наличие приводит к заметным различиям в степени набухания крахмальных гранул и склеивания крахмала и к изменениям других физических и реологических свойств (Graybosch, 1998; Morris et al., 2020).

К настоящему времени наибольшее количество аллелей найдено для гена *wx-A1* (табл. 2). За аллель дикого типа принят аллель *wx-A1a*, который кодирует синтез функционально активного *waxy*-белка. Нуль-аллель *wx-A1b* содержит делецию 23 п.н. в первом экзон-интронном переходе (Vrinten et al., 1999) и приводит к отсутствию белка *wx-A1*. Для идентификации аллелей *wx-A1a* и *wx-A1b* часто используют пару праймеров, подбирая один из праймеров таким образом, чтобы он был комплементарен deletированному участку и не отжигался на матричной ДНК. В результате, в случае аллеля *wx-A1a* целевой продукт ПЦР нарабатывается, а в случае аллеля *wx-A1b* – отсутствует. В популяциях мексиканских сортов хлебной пшеницы был выявлен еще один нуль-аллель гена *wx-A1*, при котором имеется делеция 738 п.н. Данный аллель был каталогизирован с предварительным названием *wx-A1o* (Guzmán et al., 2015). Приведенная в табл. 2 пара праймеров для выявления аллеля *wx-A1o* способна образовывать продукты реакции двух размеров: ампликон размером 709 п.н. соответствует искомому аллелю *wx-A1o*, ампликон размером 1447 п.н. – аллелю дикого типа *wx-A1a*. В исследованиях, проводимых на популяциях турецкой хлебной пшеницы, обнаружено наличие вставки из 173 п.н. в четвертом экзоне гена *wx-A1*. Данная вставка приводит к наруше-

нию рамки считывания, генерирует преждевременный стоп-кодон и, вероятно, приводит к образованию усеченного белка. Этот аллель известен как *wx-A1f* (Saito et al., 2004). Аллель, каталогизированный как *wx-A1h*, обнаружен в геноме твердой пшеницы *Triticum durum*. Он приводит к отсутствию белка *wx-A1* и связан с делецией одного нуклеотида, которая приводит к сдвигу рамки считывания и появлению преждевременного стоп-кодона (Vanzetti et al., 2010). Идентификация аллеля *wx-A1h* возможна с использованием пары праймеров *Wx-A2L/Wx-A2R* (табл. 2). В ходе ПЦР образуются ампликоны размером 489 п.н., что характерно как для аллеля *wx-A1h*, так и для аллеля *wx-A1a*. Точное выявление аллеля возможно посредством обработки рестриктазой *Sau96I*: аллель *wx-A1h* не расщепляется данной рестриктазой, в случае аллеля *wx-A1a* образуются фрагменты размером 252 и 238 п.н. Описанные аллели *wx-A1b*, *wx-A1f*, *wx-A1h* и *wx-A1o* являются нуль-аллелями, приводящими к отсутствию *waxy*-белка.

В случае аллелей *wx-A1b*, *wx-A1h* и *wx-A1o* это связано с делецией участка гена, в случае аллеля *wx-A1f* – со вставкой нуклеотидной последовательности. Данная вставка имеет характеристики мобильных генетических элементов, которые могут повлиять на посттранскрипционное созревание генов и, следовательно, на их экспрессию (Cai et al., 1998). Описан (Caballero et al., 2008) аллель гена *wx-A1* с пониженной экспрессией и низким уровнем белка *wx-A1*, каталогизированный как *wx-A1g* и имеющий вставку длиной 160 п.н. Выявление данного аллеля возможно с использованием праймеров *wx-A1 DiagF/wx-A1 DiagR* с последующей обработкой рестриктазой *ApoI* (табл. 2). Фенотипическое проявление данного аллеля выражается в уменьшении конечного количества белка *wx-A1* в зерне. Предполагается, что вставка влияет на созревание первичных транскриптов из-за абберантного сплайсинга. Относительно недавно охарактеризованный аллель *wx-A1i* также связан с наличием транспонируемых элементов. Однако необходимо отметить, что в случае этого аллеля вставка длиной 376 п.н. находится в 3'-нетранслируемой области и, возможно, приводит к снижению экспрессии гена *wx-A1*. Пара праймеров 3'FR2/3'FR1 для идентификации аллеля *wx-A1i* дает продукты ПЦР двух размеров, включая как искомую аллель, так и *wx-A1a* (табл. 2). Аллель *wx-A1c* характеризуется наличием двух SNP: первая SNP – в положении 1804 восьмого экзона, вторая SNP – в позиции 2042 девятого экзона. Данные изменения могут быть связаны с пониженной ферментативной активностью белка *wx-A1* (Yamamoto, Guzmán, 2013). Выявление аллеля *wx-A1c* также возможно с помощью рестриктазного анализа при помощи фермента *BseRI*: в случае искомого аллеля *wx-A1c* образуются 4

Таблица 2. Аллели генов *wxw*, праймеры и рестриктазы для их идентификации

Аллель	№ доступа GenBank	Праймеры, 5' → 3'	Длина ампликона, п.н.	Рестриктаза (размеры фрагментов, п.н.)	Источник
<i>wx-A1a</i>	AB019622 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-7A-F1 GTAAGCTTGGCCSACTGC Wx-7A-R1a GGATGCAGAATGCCACCTA	950	—	Huang, Brútlé-Babel, 2010
<i>wx-A1b</i>	AF113843 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-7A-F1 GTAAGCTTGGCCSACTGC Wx-7A-R1a GGATGCAGAATGCCACCTA	0	—	
<i>wx-A1c</i>	AB737981 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-7A-F2 CGCTCTGCATATCAATTTTGC Wx-7A-R2a ATATGCAAAAGGAGTGAAGAAAC	1038	BseRI (291, 395, 166, 187)	
<i>wx-A1d</i>	AB737982 ( <i>T. dicoccum</i> )	Wx-7A-F2 CGCTCTGCATATCAATTTTGC Wx-7A-R2a ATATGCAAAAGGAGTGAAGAAAC	1038	BspHI (665 и 373)	Huang, Brútlé-Babel, 2010; Yamamori, Guzmán, 2013
<i>wx-A1e</i>	AB737983 ( <i>T. durum</i> )	Wx-7A-F2 CGCTCTGCATATCAATTTTGC Wx-7A-R2a ATATGCAAAAGGAGTGAAGAAAC	1038	TaqI (120, 48, 9, 138, 390, 74, 259)	
<i>wx-A1f</i>	AY376310 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-A1 DiagF GTAAGCTTGGCCSACTGCCT Wx-A1 DiagR TGTGCCAGTCGTTGCACACA	943	ApoI	Guzmán et al., 2012
<i>wx-A1g</i>	HQ625382 ( <i>T. spelta</i> )	Wx-A1 DiagF GTAAGCTTGGCCSACTGCCT Wx-A1 DiagR TGTGCCAGTCGTTGCACACA	930	Не расщепляется ApoI	
<i>wx-A1h</i>	GQ120523 ( <i>T. durum</i> )	Wx-A2L CGCAGGGGAAGACGTTGGT Wx-A2R CGTTGACCGATGCCGGTGATC	489	Не расщепляется Sau96I	Игнатьева и др., 2009
<i>wx-A1i</i>	AB737984 ( <i>T. durum</i> )	3'FR2 GCGGGCTCGTGACACTATC 3'FR1 TACCACACCAAAATGCAAGCAC	1226 850 ( <i>wx-A1a</i> )*	—	Yamamori, Guzmán, 2013
<i>wx-A1j</i>	AB737985 ( <i>T. aestivum</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	
<i>wx-A1n</i>	JN935600 ( <i>T. dicoccum</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	Guzmán, Alvarez, 2016
<i>wx-A1o</i>	KF861807 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-3Fwa GGCATCGTCAACGGCATGGA SUN1RbATAGGCACAAACCCCTAAC	709 1447 ( <i>wx-A1a</i> )*	—	Guzmán et al., 2015; Guzmán, Alvarez, 2012
<i>wx-B1a</i>	AB019623 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-4A-F2 TCAACAACACCCAGCAGCTA Wx-4A-R2 GGTTGGGTCGATGACGTA	943	—	Huang, Brútlé-Babel, 2010
<i>wx-B1b</i>	— ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-4A-F2 TCAACAACACCCAGCAGCTA Wx-4A-R2 GGTTGGGTCGATGACGTA	0	—	Vrinten et al., 1999
<i>wx-B1c</i>	LC379880 ( <i>T. aestivum</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	Yamamori, 2009
<i>wx-B1d</i>	LC379884 ( <i>T. durum</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	
<i>wx-B1e</i> [ <i>B1c'</i> ]	CQ205418 ( <i>T. durum</i> )	Wx-B1L CGCAGGGGAAGACGTTGGT Wx-B1R CGTTGACCGATGCCGGTGATG	495 461 ( <i>wx-B1a</i> )*	—	Yanzetti et al., 2009

Таблица 2. Окончание

Аллель	№ доступа GenBank	Праймеры, 5' → 3'	Длина ампликона, п.н.	Рестриктаза (размеры фрагментов, п.н.)	Источник
wx-Blg	GQ205417 ( <i>T. dicoccum</i> )	Wx-VT1F CATCGTCAACGGCATGGACGTTCCAGC Wx-VTR CCSAGAAGCAGCTCTCCSAGTTCTTG	1154 (wx-B1)* 1168 (wx-A1)*	BglIII (848 и 306)	Guzmán et al., 2011
wx-Blh [Blc*]	GQ205418 ( <i>T. dicoccum</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	Guzmán et al., 2011
wx-Bli	HQ338721 ( <i>T. spelta</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	Guzmán, Alvarez, 2016
wx-Blj	JN935595 ( <i>T. spelta</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	Guzmán, Alvarez, 2016
wx-Blk	KP726909 ( <i>T. aestivum</i> )	BDFL CTGGCCTGTACCTCAAGAGCAACT BRD CTGACGTCCATGCCGTTGACGA	429 425 (wx-B1a)*, 455 (wx-A1)*, 497 (wx-D1)*	—	Ayala et al., 2015
wx-Bll	KF861808 ( <i>T. aestivum</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	Guzmán et al., 2015
wx-Blm	KP726910 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-1FwTTGCTGCAGGTAGCCACACC Wx-1.3RvTAGCGCGGGGAGATGACCAT	488 492 (wx-B1a)*, 480 (wx-D1a)*, 472 (wx-A1a)*	—	Ayala et al., 2015
wx-Dla	AB019624 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-7D-F3 CCAGATCGTTCTCTGGTACA Wx-7D-R3a CTCGCTCCCTCGACA	861	—	Murai et al., 1999
wx-Dlb	AF113844 ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-7D-F3 CCAGATCGTTCTCTGGTACA Wx-7D-R3a CTCGCTCCCTCGACA	0	—	Vrinten et al., 1999
wx-Dlc	LC373577 ( <i>T. aestivum</i> )	Информация по праймерам отсутствует	—	—	Yanagisawa, 2001
wx-Dld**	— ( <i>T. aestivum</i> )	Forward1 GAAGGTGACSAAGTTCATGCTGTGGAGGGGGGCGAAGATCAACTGG Forward2GAAAGTCCGGAGTCAACGGATTGTGGAGGGGGCGCAAGATCAACTGA Reverse1 CGCGTAGTAGGGGCTCACCGTCA	—	—	Yasui et al., 1997; Yi et al., 2017
wx-Dle (wx-Dlf)***	— ( <i>T. aestivum</i> )	Forward 1 GACGGCGAGGAACCTTGCTCTGG Forward 2 CTCTCTCTCGACGACTCCG dCAPS Reverse 2 GTCGAGCTCGCAGCCACCCGG	208	AgeI (192 и 16)	Yanagisawa et al., 2003
wx-Dlh	— ( <i>T. aestivum</i> )	Wx-VT1FCATCGTCAACGGCATGGACGTCAGC Wx-VTR CCSAGAAGCAGCTCTCCSAGTTCTTG	701 1425 (wx-D1a)*	—	Monari et al., 2005; Guzmán, Alvarez, 2016

Примечание: \* — для некоторых пар праймеров характерно образование нескольких продуктов реакции (несколько аллелей), для которых образуются нецелевые продукты реакции; \*\* — приведены праймеры для конкурентной аллель-специфической ПЦР; \*\*\* — приведены праймеры для dCAPS-анализа (derived cleaved amplified polymorphic sequence).

фрагмента (291, 395, 166, 187), а в случае аллеля *wx-A1a* – 5 фрагментов (291, 343, 52, 166 и 187 п.н.). Аллель *wx-A1d* несет SNP в позиции 1848 восьмого экзона. Предварительные исследования прогнозируют небольшое воздействие аллеля *wx-A1d* на содержание амилозы в зерне. В аллеле *wx-A1e* обнаружены четыре SNP в составе 5, 8, 9 и 12 экзонов. Среди них только одна (в позиции 2123 девятого экзона) приводит к замене глутаминовой кислоты на лизин в последовательности белка (Yamamoto, Guzmán, 2013). Выявление данного аллеля возможно с помощью праймеров Wx-7A-F2/Wx-7A-R2a и рестриктазы TaqI (табл. 2): ампликон расщепляется на 7 фрагментов в случае аллеля *wx-A1e* (120, 48, 9, 138, 390, 74, 259) и на 8 фрагментов в случае аллеля *wx-A1a* (120, 48, 9, 138, 390, 74, 160, 99 п.н.). Четыре SNP обнаружены в аллеле *wx-A1j*, два из них вызвали изменения в аминокислотной последовательности белка: SNP в положении 482 третьего экзона приводит к замене глутаминовой кислоты на лизин, SNP в положении 2042 девятого экзона идентичен SNP в аллеле *wx-A1c* (замена триптофана в положении 453 на аргинин). Предварительные исследования показали, что содержание амилозы в образцах с аллелем *wx-A1j* сходно с содержанием амилозы в диком типе (Yamamoto, Yamamoto, 2011). Кроме идентифицированных, охарактеризованных и каталогизированных аллелей гена *wx-A1* имеются ряд известных и описанных, но не каталогизированных аллелей, приводящих к отсутствию белка или выработке белка со сниженной ферментативной активностью. Таким образом, из описанных и каталогизированных аллельных вариантов гена *wx-A1* максимальное количество амилозы в зерне содержится в растениях дикого типа, то есть с генотипом *wx-A1a*; в растениях с нуль-аллельными генотипами *wx-A1b*, *wx-A1f*, *wx-A1h*, *wx-A1o* белок *wx-A1* отсутствует; снижение количества белка наблюдается в растениях с генотипами *wx-A1c*, *wx-A1e*, *wx-A1g*, *wx-A1i*; небольшое воздействие на количество амилозы в зерне имеют аллели *wx-A1d*, *wx-A1j*. Итак, приблизительное содержание амилозы в зернах растений с разными генотипами выглядит следующим образом: *wx-A1e* (2.9% = *wx-A1b*) << *wx-A1i* (8.0%) < *wx-A1c* (16.8%) < *wx-A1j* (22.6% = *wx-A1a*) (Yamamoto, Guzmán, 2013).

Для гена *wx-B1* охарактеризовано небольшое количество аллелей (табл. 2). В целом, необходимо отметить, что в настоящее время данные по этому гену только пополняются, и классификация его аллельных вариантов находится на начальной стадии формирования. Однако, несмотря на это, имеется мнение, что ген *wx-B1* оказывает большее влияние на содержание амилозы, чем два других гомеологичных гена *waxy* (Yamamoto, Quynh, 2000). Аллель *wx-B1a* этого гена принят за дикий тип, при котором показана наработка максимального количества амилозы в зерне. В

нуль-аллеле *wx-B1b* произошла делеция всего кодирующего участка, и, как следствие, в зернах растений с генотипом *wx-B1b* отсутствует белок *wx-B1* (Vrinten et al., 1999). Для аллеля *wx-B1c* известно, что он содержит четыре SNP в 3, 9 и 10 экзонах. Аллель *wx-B1d* характеризуется делецией трех нуклеотидов в восьмом экзоне, в результате которой происходит делеция одной аминокислоты в последовательности белка *wx-B1* (Yamamoto, 2009). Аллели *wx-B1e* и *wx-B1h* содержат по несколько SNP в экзонах и интронах и одну аминокислотную замену в последовательности белка (Guzmán et al., 2011). Аллель *wx-B1e* связан с более высоким содержанием амилозы в грануле крахмала (Nieto-Taladriz et al., 2000; Ortega et al., 2015). Его идентификация возможна посредством амплификации праймерами Wx-B1L/Wx-B1R (табл. 2). Аллель *wx-B1g* характеризуется некоторым снижением содержания амилозы, выявление которого возможно с помощью пары праймеров Wx-VT1F/WxVTR и рестриктазы BglII (табл. 2). Аллели *wx-B1i* и *wx-B1j* также имеют по несколько SNP в экзонах и интронах и приводят к заменам двух (аллель *wx-B1i*) и одной (аллель *wx-B1j*) аминокислоты в составе белка *wx-B1* (Guzmán, Alvarez, 2012). Обнаружены также нуль-аллели *wx-B1k*, *wx-B1l* и *wx-B1m*, которые, в отличие от аллеля *wx-B1b*, имеют делеции не полноразмерного гена, а нескольких нуклеотидов (Ayala et al., 2015; Guzmán et al., 2015). Идентификация аллеля *wx-B1k* возможна с помощью пары праймеров BDFL/BRD (табл. 2). При этом образуются продукты реакции разных размеров: 425 п.н. для аллеля дикого типа субгена B (*wx-B1a*), 455 п.н. для субгена A (*wx-A1*) и 497 п.н. для субгена D (*wx-D1*). Искомый аллель *wx-B1k* имеет более низкую подвижность, чем *wx-B1a*. Аллель *wx-B1m* выявляется с использованием праймеров Wx-1Fw/Wx-1.3Rv (табл. 2). При этом также образуется несколько продуктов реакции: 492 п.н. (*wx-B1a*), 480 п.н. (*wx-D1a*) и 472 п.н. (*wx-A1a*). Для искомого аллеля *wx-B1m* характерна более высокая подвижность по сравнению с *wx-B1a*.

Для гена *wx-D1* описано наименьшее число аллелей (табл. 2). Аллель *wx-D1a* является аллелем дикого типа (Murai et al., 1999). Нулевой *wx-D1b* аллель имеет делецию в 3'-кодируемой области длиной 588 п.н. (Vrinten et al., 1999). В аллеле *wx-D1c* имеются две SNP: трансверсия (C/G) внутри второго экзона и транзиция (A/G) в пределах третьего интрона (Yamamoto, 2009). Мутантную нулевую форму в *waxy*-линии K107Wx1 обозначили как *wx-D1d* (Yasui et al., 1997), в которой имеется замена G/A в шестом экзоне в положении 1484, в результате чего появляется преждевременный стоп-кодон (Yi et al., 2017). Для выявления данного аллеля был подобран комплект праймеров для dCAPS-анализа из двух аллель-специфических прямых праймеров, несущих

стандартные FAM-/HEX-меченые хвосты (F1 и F2) и общий обратный праймер (R1) (Yi et al., 2017) (табл. 2). Точечная мутация в аллеле *wx-D1e* (впоследствии названная *wx-D1f*) вызывает аминокислотную замену в зрелом белке *wx-D1* (McIntosh et al., 2013). Идентификацию данного аллеля проводили с использованием двух пар праймеров с помощью вложенной ПЦР (Yanagisawa et al., 2003) (табл. 2). В случае аллеля *wx-D1h* происходит делеция 724 п.н., охватывающая 7–10 экзоны и приводящая к отсутствию белка *wx-D1* (Monari et al., 2005; Guzmán, Alvarez, 2016).

Нулевые мутации генов *waxy* блокируют экспрессию функционального белка *waxy*, что приводит к снижению количества амилозы по отношению к амилопектину у частичных мутантов *waxy* (нулевые аллели в одном или двух локусах гена *waxy*) и полному отсутствию амилозы в составе крахмала у полных *waxy*-мутантов (нулевые аллели в трех локусах *waxy*). Исследования мировых коллекций пшеницы показали, что нуль-аллели по локусу *wx-A1* несут порядка 15% сортов корейской, японской, турецкой и аргентинской селекций; по локусу *wx-B1* – около 20% сортов индийской и австралийской селекций (Климушина и др., 2012); нуль-аллели по локусу *wx-D1* обнаруживаются крайне редко (сорта *Vai Hуо*, *Vai Hуо Mai*) (Nakamura et al., 1995). Выявлено, что только сочетание всех трех нуль-аллелей приводит к критически низкому содержанию амилозы. В случае присутствия в генотипе одиночных нуль-аллелей содержание амилозы крахмала различается для аллелей из разных субгеномов: наиболее мощным фактором снижения процента амилозы является наличие нуль-аллеля из субгенома В. На сегодня известен следующий регрессионный ряд содержания амилозы в составе крахмала: *wx-A1B1D1* > *wx-B1D1* > *wx-A1B1* > *wx-A1D1* > *wx-B1* > *wx-D1* > *wx-A1* (Климушина и др., 2012). Известно также, что разные комбинации аллелей *waxy* приводят к различным соотношениям амилозы и амилопектина. Это способствует появлению различий в химических и физических свойствах крахмала и, следовательно, влияет на качество потребляемого продукта (Guzmán, Alvarez, 2016; Zi et al., 2018). С целью исследования влияния разных комбинаций аллелей *waxy* на состав и свойства крахмала с помощью индуцированного мутагенеза (Lan et al., 2020; Li et al., 2020), многократных возвратных скрещиваний с частично мутантными формами (Davoyan et al., 2019; Graybosch et al., 2019; Morris et al., 2020) были искусственно созданы аллельные варианты генов *waxy* с разными эффектами в синтезе амилозы. Кроме того, различные комбинации аллелей генов *waxy* могут возникать в результате естественной изменчивости пшеницы и родственных ей видов (Guzmán et al., 2015; Klimushina et al., 2020).

Линии пшениц с идентифицированными в них аллелями гена *waxy* представляют интерес для селекционных программ, направленных на улучшение технологических качеств зерна и получение сортов мягкой пшеницы с новыми крахмальными свойствами. Так, линии пшениц, содержащие нулевой аллель *wx-B1b*, перспективны для производства специальных видов лапши, таких как удон или рамэн. Это связано с тем, что мука из пшениц с низким содержанием амилозы обладает высокой степенью вязкости теста и способностью к сильному набуханию. Свойства крахмала *waxy*-пшениц (несущие нулевые аллели *wx-A1b*, *wx-B1b* и *wx-D1b*) не подходят для производства лапши, но могут быть выгодно использованы в промышленных целях. Использование *waxy*-пшениц в обычных мучных смесях увеличивает выход массы продукта и объема выпеченного хлеба. Мука, полученная только из сортов *waxy*-пшениц, имеет низкий удельный объем, липкую структуру крошки и не подходит для выпечки хлебобулочных изделий. Максимальное содержание *waxy*-пшеничной муки без значительных отрицательных изменений качества хлебобулочной продукции составляет 30%. Однако при этом мука *waxy*-пшениц может служить улучшителем, так как способствует длительному хранению готовой продукции (Hayakawa et al., 2004).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сложность маркер-ориентированной селекции сортов мягкой пшеницы обусловлена большим размером, многокопийностью и сложной организацией генома пшеницы, что также значительно затрудняет как полногеномное секвенирование, так и идентификацию нуклеотидных последовательностей отдельных генов. Тем не менее, научное сообщество успешно исследует и локализует различные функциональные маркеры, которые имеют очевидные преимущества перед случайными ДНК-маркерами, так как они диагностируют желательный аллель признака и могут значительно облегчить селекцию этой культуры.

Для успешной маркер-ориентированной селекции мягкой пшеницы по хлебопекарным качествам необходимы знания о соответствующих генах, аллелях и мутациях в генах. Так, в обеспечении высоких хлебопекарных качеств зерна мягкой пшеницы наряду с генами глиадинов и глютеинов, важную роль играют гены, обуславливающие наработку достаточного количества амилозы в составе крахмала зерна, поскольку уменьшение процентного содержания амилозы приводит к ухудшению хлебопекарных качеств зерна. Кроме того, известно, что мутации в одних и тех же генах разных субгеномов мягкой пшеницы приводят к неоднозначным фенотипическим эффектам. Наиболее мощным фактором снижения процен-



та амилозы в зерне является наличие нуль-аллеля из субгенома В.

Описанные в обзоре функциональные SNP-маркеры мягкой пшеницы могут быть использованы при планировании работ по маркер-ориентированной селекции сортов мягкой пшеницы и по оценке мирового генофонда мягкой пшеницы.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119021190011-0 при поддержке грантов Президента РФ МД-2304.2020.4 и Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-549).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо материалов исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Игнатьева Н.Г., Васюшкина Н.Е., Кравченко Н.С. и др.* Генетический полиморфизм амилолитических ферментов зерна пшеницы и генетика ферментов биосинтеза крахмала // *Зерн. хоз. России*. 2009. Т. 4. С. 23–27.
- Климушина М.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г. и др.* Распределение аллелей генов *wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // *Вавилов. журн. генет. селекц.* 2012. Т. 16 (1). С. 187–192.
- Конарев А.В., Конарев В.Г., Губарева Н.К., Пенева Т.И.* Белки семян как маркеры в решении проблем генетических ресурсов растений, селекции и семеноводства // *Цитол. генет.* 2000. Т. 34 (2). С. 91–104.
- Обухова Л.В., Шумный В.К.* Состав высокомолекулярных субъединиц глютеина у сортов и перспективных линий мягкой пшеницы // *Генетика*. 2018. Т. 54 (3). С. 316–325.
- Рыбалка А.И., Созинов А.А.* Генетический анализ  $\beta$ -амилазы зерна пшеницы // *Генетика*. 1980. Т. 16 (6). С. 1059–1067.
- Чеботарь С.В., Благодарова Е.М., Куракина Е.А. и др.* Генетический полиморфизм локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы // *Вавилов. журн. генет. селекц.* 2012. Т. 16 (1). С. 87–98.
- Ainsworth C.C., Gale M.D., Baird S.* The genetics of  $\beta$ -amylase isozymes in wheat. 1. Allelic variation among hexaploid varieties and intrachromosomal gene locations // *Theor. Appl. Genet.* 1983. V. 66 (1). P. 39–49.
- Ainsworth C.C., Doherty P., Edwards K.G. et al.* Allelic variation at  $\alpha$ -amylase loci in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1985. V. 70 (4). P. 400–406.
- Anderson O.D., Dong L., Huo N., Gu Y.Q.* A new class of wheat gliadin genes and proteins // *PLoS One*. 2012. V. 7 (12). P. e52139.
- Ayala M., Alvarez J.B., Yamamori M., Guzmán C.* Molecular characterization of waxy alleles in three subspecies of hexaploid wheat and identification of two novel *wx-B1* alleles // *Theor. Appl. Genet.* 2015. V. 128 (12). P. 2427–2435.
- Caballero L., Bancel E., Branlard G., Debiton C.* Granule-bound starch synthase (GBSS) diversity of ancient wheat and related species // *Plant Breed.* 2008. V. 127 (6). P. 548–553.
- Cai X., Wang Z., Xing Y. et al.* Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5'UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content // *Plant J.* 1998. V. 14 (4). P. 459–465.
- Clark J., Robertson M., Ainsworth C.C.* Nucleotide sequence of a wheat (*Triticum aestivum* L.) cDNA clone encoding the waxy protein // *Plant Mol. Biol.* 1991. V. 16 (6). P. 1099–1101.
- Davoyan E.R., Bespalova L.A., Davoyan R.O. et al.* Allelic variants for *waxy* genes in common wheat lines bred at the Lukyanenko National Grain Center // *Вавилов. журн. генет. селекц.* 2019. V. 23 (7). P. 910–915.
- Delwiche S., Graybosch R.* Identification of waxy wheat by near-infrared reflectance spectroscopy // *J. Cereal Sci.* 2002. V. 35 (1). P. 29–38.
- D'Ovidio R., Masci S.* The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten // *J. Cereal Sci.* 2004. V. 39 (3). P. 321–339.
- Dry I., Smith A., Edwards E. et al.* Characterisation of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato // *Plant J.* 1992. V. 2 (2). P. 193–202.
- Gale M., Law C., Chojecky A., Kempton R.A.* Genetic control of  $\alpha$ -amylase production in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1983. V. 64 (4). P. 309–316.
- Graybosch R.A.* Waxy wheats: origin, properties, and prospects // *Tr. Food Sci. Technol.* 1998. V. 9. P. 135–142.
- Graybosch R.A., Baenziger S.P., Santra D., Regassa T.* Registration of 'Matterhorn' hard white waxy winter wheat // *J. Plant Regist.* 2019. V. 13 (2). P. 207–211.
- Gupta R.B., Shepherd K.W.* Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats // *Theor. Appl. Genet.* 1990. V. 80 (1). P. 65–74.
- Guzmán C., Alvarez J.B.* Molecular characterization of a novel *waxy* allele (*wx-Au1a*) from *Triticum urartu* Thun. ex Gandil. // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2012. V. 59 (6). P. 971–979.
- Guzmán C., Alvarez J.B.* Wheat waxy proteins: polymorphism, molecular characterization and effects on starch properties // *Theor. Appl. Genet.* 2016. V. 129 (1). P. 1–16.
- Guzmán C., Caballero L., Alvarez J.B.* Molecular characterization of the *wx-B1* allelic variants identified in cultivated emmer wheat and comparison with those of durum wheat // *Mol. Breed.* 2011. V. 28 (3). P. 403–411.
- Guzmán C., Caballero L., Yamamori M., Alvarez J.B.* Molecular characterization of a new *waxy* allele with partial

- expression in spelt wheat // *Planta*. 2012. V. 235 (6). P. 1331–1339.
- Guzmán C., Ortega R., Yamamori M., Peña R.J. Molecular characterization of two novel null *waxy* alleles in Mexican bread wheat landraces // *J. Cereal Sci.* 2015. V. 62. P. 8–14.
- Hayakawa K., Tanaka K., Nakamura T. et al. End use quality of waxy wheat flour in various grain-based foods // *Cereal Chem.* 2004. V. 81 (5). P. 666–672.
- Huang X., Brûlé-Babel A. Development of genome-specific primers for homoeologous genes in allopolyploid species: the *waxy* and starch synthase II genes in allohexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) as examples // *BMC Res. Notes*. 2010. V. 3 (1). P. 140.
- Klimushina M.V., Kroupin P.Y., Bazhenov M.S., Karlov G. *Waxy* gene-orthologs in Wheat × *Thinopyrum* amphidiploids // *Agron.* 2020. V. 10 (7). P. 963.
- Lan J., Li Y., Xu K., Zhang X. EMS induced SNP changes led to mutation of *wx* protein in common wheat // *Cereal Res. Commun.* 2020. V. 48. P. 233–238.
- Li J., Wang S., Cao M. et al. Cloning, expression, and evolutionary analysis of  $\alpha$ -gliadin genes from *Triticum* and *Aegilops* genomes // *J. Appl. Genet.* 2013. V. 54 (2). P. 157–167.
- Li S., Zhong X., Zhang X. et al. Production of waxy tetraploid wheat (*Triticum turgidum durum* L.) by EMS mutagenesis // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2020. V. 67 (2). P. 433–443.
- Marcussen T., Sandve S., Heier L. et al. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat // *Science*. 2014. V. 345 (6194). P. 1–4.
- McIntosh R., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat // *Proc. 12th Int. Wheat Genetics Symp.* (Yokohama, 8–13 september 2013). Yokohama, 2013. 31 p.
- Monari A., Simeone M., Urbano M. et al. Molecular characterization of new *waxy* mutants identified in bread and durum wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 110 (8). P. 1481–1489.
- Morris C.F., Kiszonas A.M., Beecher B.S., Peden G.L. Registration of six partial *waxy* near-isogenic hexaploid wheat genetic stock lines lacking one or two granule bound starch synthase I genes // *J. Plant Regist.* 2020. V. 14 (2). P. 217–220.
- Mrva K., Mares D. Regulation of high pI alpha-amylase synthesis in wheat aleurone by a gene(s) located on chromosome 6B // *Euphytica*. 1999. V. 109 (1). P. 17–23.
- Murai J., Taira T., Ohta D. Isolation and characterization of the three *waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat // *Gene*. 1999. V. 234 (1). P. 71–79.
- Nakamura T., Yamamori M., Hirano H., Hidaka S. Identification of three *wx* proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Biochem. Genet.* 1993. V. 31 (1–2). P. 75–86.
- Nakamura T., Yamamori M., Hirano H. et al. Production of waxy (amylose-free) wheats // *Mol. Gen. Genet.* 1995. V. 248 (3). P. 253–259.
- Nieto-Taladriz M., Rodriguez-Quijano M., Carrillo J. Polymorphism of waxy proteins in Spanish durum wheats // *Plant Breed.* 2000. V. 119 (3). P. 277–279.
- Ortega R., Guzmán C., Alvarez J. Molecular characterization of several *Wx* alleles in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum* Desf.) // *Biol. Plant.* 2015. V. 59 (2). P. 220–226.
- Ozuna C.V., Jehisa J.C., Giménez M.J. et al. Diversification of the celiac disease  $\alpha$ -gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization // *Plant J.* 2015. V. 82 (5). P. 794–805.
- Rohde W., Becker D., Salamini F. Structural analysis of the *waxy* locus from *Hordeum vulgare* // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16 (14B). P. 7185–7186.
- Saito M., Konda M., Vrinten P. et al. Molecular comparison of *waxy* null alleles in common wheat and identification of a unique null allele // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 108 (7). P. 1205–1211.
- Schofield J.D., Greenwell P. Wheat starch granule proteins and their technological significance // *Cereal in a European context* / Ed. I.D. Morton. Chichester: Ellis Horwood, 1987. P. 407–420.
- Shewry P.R., Halford N.G. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53 (370). P. 947–958.
- Shure M., Wessler S., Fedoroff N. Molecular identification and isolation of the *waxy* locus in maize // *Cell*. 1983. V. 35 (1). P. 225–233.
- Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez-Quijano M. et al. Genetic variability for *waxy* genes in Argentinean bread wheat germplasm // *Electr. J. Biotechnol.* 2009. V. 12 (1). P. 4–5.
- Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Bainotti C., Jensen C. Identification of a null allele at the *wx-A1* locus in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum* Desf.) // *Plant Breed.* 2010. V. 129 (6). P. 718–720.
- Visser R., Hergersberg M., van der Leij F. et al. Molecular cloning and partial characterization of the gene for granule-bound starch synthase from a wildtype and an amylose-free potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Plant Sci.* 1989. V. 64 (2). P. 185–192.
- Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of *waxy* mutations in wheat // *Mol. Gen. Genet.* 1999. V. 261 (3). P. 463–471.
- Wang D., Zhang K., Dong L. et al. Molecular genetic and genomic analysis of wheat milling and end-use traits in China: progress and perspectives // *Crop J.* 2017. V. 6. P. 68–81.
- Yamamori M. Amylose content and starch properties generated by five variant *wx* alleles for granule-bound starch synthase in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Euphytica*. 2009. V. 165. P. 607–614.
- Yamamori M., Quynh N. Differential effects of *wx-A1*, -B1 and -D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2000. V. 100 (1). P. 32–38.
- Yamamori M., Yamamoto K. Effects of two novel *wx-A1* alleles of common wheat (*Triticum aestivum* L.) on amylose and starch properties // *J. Cereal Sci.* 2011. V. 54 (2). P. 229–235.
- Yamamori M., Guzmán C. SNPs and an insertion sequence in five *wx-A1* alleles as factors for variant *wx-A1* protein in wheat // *Euphytica*. 2013. V. 192 (3). P. 325–338.

- Yan L., Bhavé M., Fairclough R. et al. The genes encoding granule-bound starch synthases at the *waxy* loci of the A, B, and D progenitors of common wheat // *Genome*. 2000. V. 43 (2). P. 264–272.
- Yanagisawa T., Kiribuchi-Otobe C., Yoshida H. An alanine to threonine change in the Wx-D1 protein reduces GBSS I activity in *waxy* mutant wheat // *Euphytica*. 2001. V. 121. P. 209–214.
- Yanagisawa T., Kiribuchi-Otobe C., Hirano H. et al. Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the *waxy* character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 107 (1). P. 84–88.
- Yasui T., Sasaki T., Matsuki J., Yamamori M. *Waxy* endosperm mutants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and their starch properties // *Breed. Sci.* 1997. V. 47 (2). P. 161–163.
- Yi X., Jiang Z., Hu W., Zhao Y. Development of a competitive allele-specific PCR marker for selection of the mutated *wx-D1d* allele in wheat breeding // *Plant Breed.* 2017. V. 136 (4). P. 460–466.
- Zhang W., Gianibelli M., Rampling L., Gale K.R. Characterisation and marker development for low-molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 108 (7). P. 1409–1419.
- Zi Y., Ding J., Song J. et al. Grain yield, starch content and activities of key enzymes of *waxy* and non-*waxy* wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Sci. Rep.* 2018. V. 8 (1). P. 1–12.
- Zimin A.Z., Puiu D., Hall R. et al. The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum* // *GigaScience*. 2017. V. 6 (11). P. 1–7.

## Genetic Determinants of Grain Baking Qualities and Allelic State of *waxy* Genes of Soft Wheat

A. A. Galimova<sup>a, \*</sup> and B. R. Kuluev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia*

\*e-mail: aiz.galimova@yandex.ru

Common wheat is the most demanded food crop in the world which occupies huge sown areas. The baking qualities of this culture determine the nutritional and commercial value of its varieties. Improving the baking quality of grain is an important priority for both classical and marker-oriented selection of common wheat. These qualities are determined by a large number of genes and also can be influenced by agroecological factors. The review discusses the main genes involved in the implementation of the baking qualities of common wheat grain, which mostly depend on the protein and carbohydrate components, the enzyme composition. Particular attention is paid to the genes of the carbohydrate component, namely, the *waxy* genes that determine the amylose-amylopectin composition of common wheat grain, which is one of the important factors of high grain baking parameters. This review describes the alleles of *waxy* genes that determine the ratio of amylose and amylopectin in starch of common wheat grain. Functional SNP markers (single nucleotide polymorphism) with primers and restriction endonucleases selected for them are shown for the most studied alleles of the *waxy* gene. These data will be useful in marker-oriented selection, since it is very difficult for breeders to control the baking qualities of common wheat without the use of modern methods of molecular genetics. As a result, during classical breeding, some wheat varieties may lose their high baking qualities, which determine the relevance of the search and study of SNP markers of baking qualities of common wheat, including the already known functional markers.

*Keywords:* *Triticum aestivum*, SNP markers, functional DNA markers, marker-oriented selection