СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ – СОФИЯ
ДОБРУДЖАНСКИ ЗЕМЕДЕЛСКИ ИНСТИТУТ
ГЕНЕРАЛ ТОШЕВО

Соня Николова Донева

Характеристика на резервните белтъци при синтетични пшеници във връзка с използването им като изходен материал за селекцията

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен «Доктор»

по докторска програма

«Селекция и семепроизводство на културните растения»

Професионално направление 6.1. Растениевъдство

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:

Проф. д.с.н. Пенко Петров Спецов

Официални рецензенти:

1. Проф. д.с.н. Димитър Дойнов Генчев

2. Доц. д.с.н. Иван Димитров Тодоров

2017 г.

Дисертационният труд е написан на 160 страници. Съдържа 62 таблици, 59 фигури и 6 приложения от таблици и фотографии. Списъкът на използваната литература включва 300 източника, от които 24 на кирилица, 275 на латиница и един интернет адрес.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на отдел «Селекция и семепроизводство на зърнено-житни култури» (Протокол от 01.03.2017г.) и от Научен съвет към ДЗИ – Г. Тошево (Протокол №4 от 02.03.2017г.).

Материалите по защита на дисертацията са на разположение на интересуващите се в ДЗИ– Г. Тошево.

Използваната номерация на таблиците, фигурите и приложенията в автореферата не съответства на номерацията в дисертацията.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:
СХП-синтетични хексаплоидни пшеници;
ЕСР-елитни синтетични растения;
ВМГ–високомолекулни глутенини;
НМГ -нискомолекулни глутенини;
SDS-PAGE-натриево-додецилсулфатна полиакриламидна гелна електрофореза;
A-PAGE-кисела полиакриламидна гелна електрофореза;
mg/100g а.с.в.-милиграми /100 грама абсолютно сухо вещество;
ml-мililитра;
% -процент;

** Забележка: Останалите съкращения са посочени под таблици и заглавия на фигури.*

Защитата на дисертационния труд ще се състои на.....от .....часа в ДЗИ-Г.Тошево на заседание на специализирано научно жури, назначено със заповед на ССА № НП-..... в състав:

1. Проф. д.с.н. Пенко Петров Спецов – ДЗИ-Г.Тошево–Председател
2. Проф. д.с.н. Димитър Дойнов Генчев –ДЗИ-Г.Тошево
3. Доц. д.с.н. Иван Димитров Тодоров – ДЗИ-Г.Тошево
4. Доц. д-р Божин Максимов Божинов – АУ-Пловдив
5. Проф. д-р Нася Борисова Томлекова –АУ-Пловдив

УВОД

Пшеницата е едно от първите култивирани растения. Счита се, че това е станало преди повече от 10 000 години по времето на Неолита в югозападна Азия. В днешно време културните голозърнести пшеници се разделят основно на две групи, от които с икономическо значение са: обикновената пшеница, *Triticum aestivum* L. (2n=6x=42, AABBDD), обхващаща около 95% от световното производство на пшеница, и твърдата (тетраплоидна) пшеница - *T. turgidum* ssp. *durum* (2n=4x=28, AABB), обхващаща останалите 5%.

След 60-те години на XX век усилията на изследователите са насочени към генетични промени в хлебната пшеницата, така че да се осигури повече и по-качествена храна на бързо нарастващото население на планетата. През следващите години в резултат на подобряване на технологията на отглеждане са създадени редица високопродуктивни сортове с добра адаптация към абиотичен и биотичен стрес. Въпреки това, интензивната селекция на обикновена пшеница на базата на ограничен набор от сортове е причина за загубата на редица ценни гени в реализираните кръстоски и за регистриран застой в добивния й потенциал. Разнообразието от алели е силно редуцирано в сравнение с местните популации и диви житни видове, които са важен генетичен ресурс. Подобряването на белтъчния състав и повишаването на добивите налага съчетаването на конвенционалните методи на селекция с методите на отдалечената хибридизация (междувидова и междуродова). В резултат на приложения подход се създават синтетични, добавени, заместени и транслокационни линии, предлагащи възможности за интрогресия на нов спектър от гени, кодиращи полезни признаци в голозърнестите (4x и 6x) пшеници.

Получаването на синтетични хексаплоидни растения копира втория етап в еволюцията на обикновената зимна пшеница, при който към генома на тетраплоидната пшеница се добавя и D-генома от *Aegilops tauschi* (Mujeeb-Kazi et al., 1996; Спецов и др., 2008; Спецов и др., 2009, Talbot, 2011). Получените хибридни растения се обработват с колхицинов разтвор, с чиято помощ генетичният материал се удвоява (2n=21→42). През следващите години растенията (C_1 генерация) се кръстосват с хлебна пшеница за отглеждане на хибриди (F_1, BC_1 растения). Чрез прилагане на беккросовия метод се получават синтетични беккросови растения от BC_2 генерация (Coghlan, 2006; Стоянов и др. 2010; Даскалова, 2014).

Синтетичните хексаплоидни пшеници са носители на ценни проламинови алели (глутенинови и глиадинови), наследени от родителските форми - *Aegilops tauschii* и *Triticum turgidum* (Wieser et al., 2003; Lage et al., 2006; Yang et al., 2009; Hu et al., 2013).

Необходима е генетична, биохимична и структурна характеристика на ендоспермовите протеини на амфидиплоидите с оглед на ефективното им използване в селекцията.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на настоящото изследване е да проучи алелното вариране на запасните белтъци в диплоидни и тетраплоидни видове пшеница от група *Triticenae*, както и в новополучени с тяхно участие синтетични хибриди и линии пшеница. Изследванията по отношение на резервните белтъци в семената на амфидиплоиди и линии, създадени в ДЗИ - Генерал Тошево, ще бъдат от значение за по-пълната им селекционна характеристика като потенциални нови източници на гени, свързани с подобряване на качеството на обикновената пшеница (*Triticum aestivum* L.).

За постигане на посочената цел са формулирани **следните задачи:**

1. Идентифициране на глутенини и глиадини от диви и културни житни за установяване на генотипове в тясна връзка със селекцията на синтетични и висококачествени сортове пшеница.
2. Проучване на фракционния състав и алелното вариране на запасните белтъци в синтетични хексаплоидни пшеници.
3. Изследване на резервните протеини, биометричен анализ и качествени показатели на нови линии пшеница, получени с участието на синтетични форми.
4. Оценка на качествени показатели на синтетични и новополучени линии пшеница.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. По първа задача: Идентифициране на глутенини и глиадини в диплоидни и тетраплоидни пшеници (група *Triticenae*) за установяване на генотипове в тясна връзка със селекцията на синтетични и висококачествени сортове пшеница.

Обект на изследване са образци от видовете: *Aegilops tauschii, Aegilops speltoides, Dasypyrum villosum (H. villosa), Triticum urartu, Triticum boeoticum, Triticum dicoccum, Triticum turanicum, Triticum polonicum, Triticum timopheevii*, представени в Таблици 1 и 2. Някои от посочените ди- и тетраплоидни пшеници са родителски компоненти, участващи в създаването на синтетични хексаплоидни пшеници (СХП), анализирани във втора задача.

Таблица 1. Произход и геномна формула на изследваните диплоидни видове от *Triticenae*

Образец, №	Геномна формула	Произход на семената
Aegilops tauschii: 149	2n=14, DD	Германия
Aegilops tauschii: 1914 , 1915, 1916, 1917, 1918	2n=14, DD	ДЗИ - Г. Тошево
Aegilops tauschii: 19088, 30452, 19089	2n=14, DD	ИРГР - Садово
Aegilops tauschii: 22744	2n=14, DD	Русия
Aegilops tauschii: 26991, 30421, 30422, 30423, 30425, 31488	2n=14, DD	Азербайджан
Aegilops speltoides	2n=14, SS	ДЗИ - Г. Тошево
Dasypyrum villosum (H. villosa)	2n=14, VV	ДЗИ - Г. Тошево
Triticum urartu: №18333	2n=14, A^uA^u	ДЗИ - Г. Тошево
Triticum boeoticum: №001, 56, 62, 64, 6734, 110-8	2n=14, A^bA^b	ДЗИ - Г. Тошево
Triticum monococcum: №45126	2n=14, A^bA^b	Германия
Triticum sinskajae: №18397, 18401	2n=14, A^bA^b	Германия

Таблица 2. Произход, геномна формула и характерен признак на тетраплоидни видове от род *Triticum*

Образец, №	Геномна формула	Произход на семената	Характерен признак
T. dicoccum: №45390, 45398, 45432,44961	2n=28, BBA^uA^u	ИКАРДА Сирия	Покритозърнеста пшеница
T. turanicum: №11019, 12398	2n=28, BBA^uA^u	ИРГР-гр.Садово	Голозърнеста пшеница
T. polonicum	2n=28, BBA^uA^u	ИРГР-гр.Садово	Голозърнеста пшеница
T. timopheevii: 19031, 19032, 26967, 30009, 30012, 31245, 31246, 31248, 31249,19033, 26761, 26762, 30013, 30010, 30011, 30014, 31247, 34176	2n=28, GGA^uA^u	ИРГР-гр.Садово	Покритозърнеста пшеница

1.2. По втора задача: Проучване на фракционния състав и алелното вариране на запасните белтъци в синтетични хексаплоидни пшеници.

Като материал служат синтетични пшеници, създадени в ДЗИ - Генерал Тошево (Табл. 3). С изключение на №69/36, получен чрез хибридизация между две тераплоидни пшеници (*T. timopheevii* като опрашител и *T. turanicum* като майчин компонент), всички останали синтетични амфидиплоиди са резултат от хибридизация между диви житни (2n=14) (Табл. 5) като опрашители и тетраплоидни образци и сортове от род *Triticum* или хибридни форми (2n=28) като майчини компоненти.

Таблица 3. Синтетични пшеници, създадени в ДЗИ - Генерал Тошево

Селекционен №	Кръстоска	Геномна формула[1]
32	F_1 (44961х Загорка х 45432) х *Ae. tauschii* №19089	2n=42, BBA^uA^uDD
106	F_2 (44961х Загорка х 45432) х *Ae. tauschii* №22744	2n=42, BBA^uA^uDD
107	№45398 х *Ae. tauschii* №22744	2n=42, BBA^uA^uDD
530	510 F_1 (45390 х 45398) х *Ae. tauschii* №19088	2n=42, BBA^uA^uDD
531	510 F_1 (45390 х 45398) х *Ae. tauschii* № 30422	2n=42, BBA^uA^uDD
532	510 F_1 (45390 х 45398) х *Ae. tauschii* №22744	2n=42, BBA^uA^uDD
Н-69/36	*T. turanicum* х *T. timopheevii*	2n=56, $BBA^uA^uA^uA^uGG$
Н-83/27	*T. dicoccum Khapli-III* х *Ae. tauschii*	2n=42, BBA^uA^uDD
Н-68/44	*T. timopheevii v. typica* х *Ae. tauschii*	2n=42, GGA^uA^uDD
Н-85/19	*T. polonicum* х *T. boeoticum*	2n=42, $BBA^uA^uA^bA^b$
$41^к$	*T. durum* сорт Загорка х *Aegilops speltoides*	2n=42, BBA^uA^uSS
1dv	Гергана х *Dasypyrum villosum*	2n=42, BBA^uA^uVV

1, Геномните формули са представени по Goncharov et al. 2009 (Breeding Science 59: 492-498).

1.3. По трета задача: Изследване на резервните протеини и анализ на данните от биометричните измервания и качествените показатели на нови линии, получени на основата на синтетични форми.

В Таблица 4 са представени кръстоските, от които са отбрани елитни синтетични растения (ЕСР) в F_6, BC_1F_5 и BC_2F_2 генерации, а в Таблица 5 са посочени сортовете хлебна пшеница, използвани за създаване и изследване на синтетични потомства.

Таблица 4. Кръстоски с участието на СХП530, 532 и Н-83/27

Кръстоска, №	Генерация на ЕСР	Педигре
128	BC_2F_2	Корона х 72F_1 (Полена х № 530-4-0 C_1) х Аглика
136	-//--//-	Кристора х 74F_1 (Полена х 530-4-0 C_1) х Аглика
146	-//--//-	Мерилин х 80F_1 (Власта х 530-2 C_1) х Аглика
166	-//--//-	(Полена х 530-4-0 C_1) х Тодора х Аглика
167а	-//--//-	74F_1(Славея х 530-4 C_1) х Аглика х Горица
168	-//--//-	74F_1(Славея х 530-4 C_1) х Енола х Кристора
168а	-//--//-	74F_1(Славея х 530-4 C_1) х Енола х Енола

177	-//--//-	$90F_1$ (530-4-0 C_1 х Аглика) х Перла-2 х Енола
181	-//--//-	$98F_1$ (532-1-4 C_1 х Аглика) х Алана х Кристора
206б	-//--//-	$125aF_1$(Кристора х Аглика) х 66 F_1(Антица х 530-3C_1) х Свилена
109	BC_1F_5	Алана х $75F_1$ (Славея х 532-2 C_1)
110	-//--//-	Аглика х $75F_1$(Славея х 532-2C_1)
111	-//--//-	Алана х $86F_1$ (530-1-2 C_1 х Карат)
112	-//--//-	Албена х $76F_1$ (Славея х 530-3 C_1)
115	-//--//-	Голд х $86F_1$ (530-1-2 C_1 х Карат)
118	-//--//-	Енола х $74F_1$(Славея х 530-4 C_1)
119	-//--//-	Енола х $75F_1$ (Славея х 532-2 C_1)
121	-//--//-	Енола х $89F_1$ (530-3 C_1 х Мерилин)
125	-//--//-	Карат х $72F_1$ (Полена х 530-4 C_1)
134	-//--//-	Кристора х $72F_1$ (Полена х 530-4 C_1)
143	-//--//-	Мерилин х 74 F_1 (Славея х 530-4 C_1)
146	-//--//-	Мерилин х $80F_1$ (Власта х 530-2 C_1) х Аглика
149	-//--//-	Мерито х 95 F_1 (532-1-1 C_1 х Полена)
155	-//--//-	Олимпиада х 82 F_1 (Власта х 532-1-1C_1)
92	F6	530-4-2-2 C_1 х Аглика
95	-//--//-	532-1-1 C_1 х Полена
57	-//--//-	Н-83/27 х Победа х Олимпиада

Таблица 5. Сортове пшеница (обикновена и твърда), участващи в кръстоски със синтетични хексаплоидни пшеници за получаване и изследване на хибридни популации

Произход	Сорт пшеница	Вид пшеница
ДЗИ	16 сорта	Зимна, обикновена
ИРГР	Победа	Зимна, обикновена
Чехия	Алана, Власта, Гоулд, Мерито	Зимна, обикновена
ИПК	Гергана, Загорка	Твърда

ДЗИ – Добруджански земеделски институт – гр. Генерал Тошево; ИПК – Институт по полски култури – гр. Чирпан; ИРГР – Институт по растителни и генетични ресурси – гр. Садово

Сортовете обикновена и твърда пшеница, използвани като стандарти в електрофоретичните методи са представени в Таблица 6.

Таблица 6. Характерен признак и произход на сортове пшеница, използвани като стандарти в биохимичните проучвания

Стандарт	Характерен признак	Произход
Безостая 1	Зимна, обикновена пшеница	Русия
Cheyenne	Зимна, обикновена пшеница	Америка
Gabo	Зимна, обикновена пшеница	Австралия
Hope	Зимна, обикновена пшеница	Америка
Chinese spring	Пролетна, обикновена пшеница	Китай
Agridur	Твърда пшеница	Франция

1.4. По четвърта задача: Оценка на качествени показатели при синтетични и новополучени линии пшеница.

Качествените показатели - суров протеин, лизин и седиментация се определят в:

а/ потомства на синтетичните хексаплоидни пшеници (СХП) №106, 107 и 32, отгледани при полски условия през 2013 и 2014 реколтни години заедно със стандартни сортове обикновена пшеница (Табл. 7). Засяти са 80 семена в две повторения като потомства от четири растения на СХП106, 140 семена от седем - на СХП107, 160 семена от осем - на СХП32 и сортове хлебна пшеница, използвани като стандарти (Садовска ранозрейка-4, M. amber, №301, Русалка, Сан Пасторе, Безостая-1 и Мироновская-808). Растенията са отгледани в лехи широки 1.5 m с дистанция между редовете от 40 cm и вътре в реда-5 cm. Общо 30 семена са засяти в ред. Не е приложено минерално торене, като полският участък се ползва след бобова култура.
б/ потомства (нови линии) от кръстоска №112 (BC_1F_6, BC_1F_7) и стандарти обикновена пшеница, отгледани на поле през 2014 и 2015 реколтни години (Табл. 8) (описани са в 2.4. Полски методи).

Таблица 7. Реколтирани СХП №106, 107 и 32 и стандарти за анализ на качествени показатели

Селекционен №	Кръстоска №	Огледани потомства	Огледани растения
107	№45398 x *Ae. tauschii* 22744	7	112
106	F_2 (44961x Загорка x 45432) x *Ae. tauschii* 22744	4	72
32	F_1 (44961x Загорка x 45432) x *Ae. tauschii* 19089	8	136
T. aestivum:	Сан Пасторе, M. amber, сорт №301, Русалка, Сад. ранозрейка-4, Мироновская-808, Безостая-1	по 2 реда от сорт в две повторения	

Таблица 8. Потомства/линии от кръстоска №112{Албена x 76F_1(Славея x СХП530-3)} и стандарти за анализ на качествени показатели

Полски № в две повторения	Произход на ЕСР	Полски № в две повторения	Произход на ЕСР
38	112-2-1/7	43	112-4-1/1
38a	112-2-1/2 112-2-1/5	43a	112-4-1/1 112-4-1/2
39	112-2-2/8	44	112-4-2/9
39a	112-2-2/2 112-2-2/5	44a	112-4-2/4 112-4-2/9
40	112-2-1/3 112-2-1/8	45	112-5-1/2 112-5-1/5
40a	112-2-1/2	45a	112-5-1/3
41	112-2-2/2	46	112-1-2/5 112-1-2/7 112-1-2/8
41a	112-2-2/4 112-2-2/5		
42	112-2-4/4	*T. aestivum:*	Аглика, Сад. ранозрейка-4, Сан Пасторе, M. amber, сорт №301, Русалка, Мироновска-808, Безостая-1
42a	112-2-4/4 112-2-4/5		

ЕСР, отбрани елитни синтетични растения; а, второ повторение

2. Методи

2.1. Лабораторни методи

<u>По първа и втора задача:</u> Извършен е електрофоретичен анализ за установяване на фракционния състав и алелното вариране на запасните белтъци (високомолекулни глутенини (ВМГ), нискомолекулни глутенини (НМГ) и глиадини) на диплоидни и тетраплоидни образци и получени с тяхно участие синтетични хексаплоидни пшеници.

<u>По трета задача:</u> От ЕСР (BC_1F_5, BC_1F_6 и BC_1F_7 генерации) на кръстоска №112 в три поредни реколтни години – 2013, 2014 и 2015 е извършена електрофореза на високомолекулни глутенини (ВМГ) за установяване наличието на алел от *Aegilops tauschii* в D генома, кодиращ субединици, различни от тези при обикновената пшеница. Със същата цел в две поредни реколтни години – 2014 и 2015 са анализирани и ЕСР (BC_2F_2 и BC_2F_3) от 27 кръстоски (Табл. 4). Половинките зърна с установен ген за ВМГ от дивия вид, покълнват в блюда и се разсаждат за отглеждане (изолиране на класове преди цъфтеж и отчитане на фертилност) в оранжерия. Биометричен анализ на изолирани класове се провеждат върху индивидуални растения от кръстоска.

2.1.1. Електрофоретични методи: Електрофоретичните методи, използвани в настоящото проучване се извършват по следния начин:

а/ ***Подготовка на пробите за анализ***

От всеки вид, образец и синтетик се анализират по три зърна, а от хибрид и потомство с посочена генерация - между 5 и 100 зърна, за да бъде установена степента на тяхната хомогенност. Зърната се стриват на фино брашно (с пестик в порцеланов хаван), като предварително се отстраняват зародишите им с помощта на скалпел. За анализ и отбор на ЕСР използваме половинка. За целта зърното се разделя на две равни части, като частта със зародиша се използва за репродукция (получаване на растение), а другата - за изследване на запасните белтъци. Първо се екстрахират глиадините, а утайката след тази екстракция се използва за анализ на глутенините.

б/ ***Екстракция и електрофореза (A-PAGE) на глиадини***

Екстракцията на глиадините е извършена със 70% етилов алкохол, а самото разделяне на белтъчните фракции е направено с помощта на едномерна кисела вертикална електрофореза (A-PAGE) по Khan et al. (1983) с известни модификации, направени в ЛБХЗЖК на ДЗИ – Генерал Тошево. Електрофорезата е осъществена на 8% разделящ гел (вместо 6%), а дебелината на гелната плака е 2 mm при постоянна сила на тока от 60 mA , която след 1 час се увеличава на 120 mA. Продължителността на електрофорезата при тези условия е около 5 часа при постоянна температура от 10 °C. След това геловете се фиксират и оцветяват с 0,15 % кумаси брилянт блу (CBB) R250, 20 % етанол и 12 % трихлороцетна киселина за 24 часа. Следва обезцветяване с дестилирана вода и сканиране.

С помощта на тази гелна система се разделят до 20 – 25 белтъчни фракции на базата на тяхната молекулна маса и електрически заряд.

в/ ***Екстракция и електрофореза (SDS-PAGE) на глутенини***

Екстракцията на високомолекулните глутенини се осъществява по метода на Singh et al. (1991). С помощта на тази екстракционна процедура, която се осъществява на четири етапа, се постига максимално отстраняване на остатъчните глиадини, които съвпадат по молекулна маса с нискомолекулните глутенини и се оказват пречка за точното им идентифициране. Още по-ясна електрофореграма се получава след допълнително алкилиране на белтъчнте молекули преди да бъдат обработени със SDS.

Основното предимство на SDS-PAGE електрофорезата е, че тя дава възможност за едновременно разделяне на високо- и нискомолекулните глутенини. Извършва се при постоянна сила на тока от 20 mA на гел при стайна температура за 18 – 20 часа. Оцветяването на геловете се осъществява с 1 % разтвор на кумаси брилянт блу (CBB) R 250 в оцетна киселина, метанол и вода в съотношение (1:5:4) за една нощ. Обезцветяването на гелните плаки се извършва с разтвор: оцетна киселина, метанол, дестилирана вода (1:2:7). Обезцветяващият разтвор се сменя многократно до изчистване на фона, след което гелните плаки се сканират. Електрофорезата се осъществява на вертикален апарат по метода на Laemmli (1970) в два варианта: а) класическа едномерна полиакриламидна гелна електрофореза на 8% и 12% гел, и б) едномерна SDS-PAGE на 12% гел с добавка на 4М урея в разтворите на разделящия и концентриращия гел (Lafiandra et al., 1993).

При тераплоидните образци се наблюдава значителен полиморфизъм на В-НМГ в сравнение с нискомолекулните глутенини на хексаплоидните пшеници. На много от алелите (особено в *Glu-B3* локуса) съответстват по няколко близкоразположени бенда, които не могат да бъдат добре разделени чрез SDS-PAGE по метода на Laemmli и впоследствие създават трудности за точната им идентификация. Това наложи фракционирането на НМГ на тетраплоидните пшеници да се осъществи чрез едномерна SDS-PAGE електрофореза по метода на Payne et al. (1980), която се извършва на 35% акриламидни гелове за разлика от класическата Laemmli система, където концентрацията на разделящия гел е 12%. Продължителността на анализа е около 3-4 часа при постоянен ток от 60mA на гел. Оцветяването и обезцветяването на

полиакриламидните плаки се извършва със същите реактиви и за същото време, както при класическата SDS-PAGE електрофореза.

<u>По четвърта задача:</u> Съдържанието на суров протеин и лизин и стойността на седиментационното число се определят по възприетите методики в лабораторията по БХЗЖК и в лабораторията по технологични качества на ДЗИ – Генерал Тошево, които се основават на:

- Класически метод на Келдал за определяне на общ азот на апарат Келтек (Cohen, 1910);
- Нинхидринов метод на Мусейко и Сысоев (1970) за определяне съдържанието на лизин;
- Метод на Пумпянский (1971) за определяне на седиментационно число (седиментация).

2.1.2. Апаратура и реактиви за осъществяване на анализите

Електрофорезата на запасните белтъци е извършена на вертикални апарати, произведени по японски образец от българската фирма "Технопласт" - Плевен. За източници на постоянен ток са използвани токоизправители EPS 301 и EPS 601, производство на фирма Amersham, Pharmacia Biotech. Съдържанието на суров протеин се определя на апарат Kjeltec Auto 1030 Analyzer (Келтек), производство на шведската фирма Tecator.Анализите са осъществени с висококачествени химикали, производство на фирмите Merk, Sigma, Fluka и AppliChem.

2.2. Методи за идентификация на запасните белтъци и определяне на Glu-1 скора

● Използвана е универсална система за подреждане и номериране на високомолекулните алели и субединици в обикновената пшеница (Payne and Lawrence, 1983) (Фиг. 3).
● Алелите в *Glu-D1* локуса на пшеници - 2x и 4x са идентифицирани по William et al. (1993). Гените и кодираните от тях субединици в локуси *Glu-S1, Glu-V1* и *Glu-G1* са идентифицирани най-често спрямо алелите от съответните им хомеоложни локуси (*Glu-B1* и *Glu-D1*) на обикновената пшеница поради липсата на възприети номенклатури за тяхното отчитане.
● Нискомолекулните алели и субединици в материалите са отчетени по Gupta and Shepherd (1988, 1990) (Фиг. 4).
● Приложен е комбиниран метод за идентифициране на нискомолекулните глутенини и глиадините в обикновената пшеница (Jackson et al., 1996) (Табл. 1) и каталог за идентифициране на глиадиновите белтъци в обикновената пшеница (Metakovsky et al., 1991) (Фиг. 5) .
● Други методи за идентифициране на високомолекулни субединици и алели в твърдата пшеница (Yan et al., 2003[d]; McIntosh et al., 2013), както и номенклатура на нискомолекулните алели и субединици в твърдата пшеница (Nieto-Taladriz et al., 1997):

- Съответствия между LMW-моделите, γ-глиадините и алелния състав в твърдата пшеница (Payne et al., 1984; Carrillo et al., 1990);

- Метод за определяне на качествен Glu-1 скор като числена мярка, изразяваща специфичната връзка между отделните фракции и качеството. Изчислява се чрез сумиране на индивидуалните скорове на отделните високомолекулни глутенинови субединици от локуси *Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1* на *T. aestivum* (Payne et al., 1987[a]);

- Метод за изчисляване на генетичното разнообразие в локусите чрез индекс на Nei. Извършва се по формулата: $H = 1- \sum Pi^2$, където H и Pi означават индекса на генетично вариране и съответно честотата на броя на алелите в локуса. Алелните честоти се изчисляват чрез сумиране на честотите на алелите на отделните образци, и се разделят на получения сбор от броя на образците (Nei, 1973; Hintum and Elings, 1991**).**

2.3. Оранжерийни методи

<u>По първа и втора задача:</u> След отчитане на лабораторната кълняемост, растенията от вида *Aegilops speltoides* и СХП32, 106, 41[k], Н-68/44, Н-85/19 и 1dv се отглеждат в оранжерия за репродукция. Разсаждат се по 4 растения в саксия (в две повторения) с вместимост от 2.5 kg почва от района на ДЗИ – Генерал Тошево. Яровизацията и растежът преминават в нерегулируема стъклена оранжерия.
<u>По трета задача:</u> След отчитане на лабораторна кълняемост на отбраните чрез електрофореза половинки зърна с гени за ВМГ от дивия вид, растенията от общо 27 кръстоски се отглеждат в саксии, както по първите две задачи. Кръстоски №146, 167а, 206б и др. отпадат по различни причини; например в №146 не са намерени зърна с гени за ВМ протеини от дивия вид; отделни половинки зърна не покълват или загиват в ранен стадий, до начало на братене. Растенията от кръстоска №112 са разсаждани в саксии и на леха в оранжерия през 2014/15 г. След изкласяване се изолират класове в растение (чрез хартиени изолатори), с цел избягване на кръстосано

опрашване. Завръзът се отчита в изолираните класове, чийто зърна се използват за биохимичен анализ и последващ отбор на генотипове.

2.4. Полски методи

През 2014 и 2015 реколтни години са отгледани потомства (BC_1F_6 и BC_1F_7) от кръстоска №112 при полски условия. СХП са описани в 1.4. по четвърта задача.
Извършена е ръчна сеитба в средата на месец октомври, в редове на леха с вътрешно разстояние от 5 cm и междуредово - 40 cm. Предшественикът е бобов, без използване на азотно торене. Сеитбата е в две повторения за всеки номер от общо 20 засяти семена (потомство от ECP) в ред. На три места в лехата са засяти стандарти: Аглика, Сан Пасторе, №301, Русалка, Безостая-1, Мироновская-808, Садовска ранозрейка-4 и М. амбер.

2.5. Биометричен анализ на материалите, отгледани при полски условия

След жътвена зрялост е извършен биометричен анализ на всяко растение от номер/линия по редица признаци. Анализът включва показатели, отнасящи се до главния клас на всяко растение и частично по отношение на братята му.

1. Височина (от основата на растението до върха на класа в главния брат, без осилите, в cm)
2. Брой класоносни братя в растение
3. Дължина (cm) на главен клас (гк)
4. Брой класчета в гк
5. Тегло на класа, гк (g)
6. Брой зърна в гк
7. Тегло на зърното в гк (g)
8. Маса на зърното в гк, (g)
9. Маса на зърното от растение (g)

2.6. Статистически методи

<u>По трета задача:</u> За обработка на данните от биометричните измервания е използвана статистическа програма ASSISTAT Version 7.7 beta. Приложени са дисперсионен и вариационен анализ. Изчислени са елементите на вариационната статистика: средна аритметична (Mean), вариационен коефициент (VC%), минимална гранична разлика ($GD_{5\%}$), размах (D), минимална и максимална стойност на изследвания признак (min и max), доказаност на разликата (F-експериментално), критерий на Фишер (F-krit- таблично), варианс между изследваните групи (S^2_v), варианс вътре в групите (S^2_e), средно квадратно отклонение (S) (Генчев и др. 1975).

<u>По четвърта задача:</u> За оценка на влиянието на новите фракционни двойки 1.5+10 и 4+10.1 от *Glu-D1* локуса върху качествените показатели (протеин, лизин и седиментация) при синтетични и новополучени линии пшеница са използвани статистически пакети SPSS 17.0 и Биостат. Приложени са методите на дискриптивната статистика, t-критерий (критерий на Стюдънт), корелационен и регресионен анализ. Изчислени са елементите на вариационната статистика: средни стойности (Mean ± Standard Error), средно квадратично отклонение (Standard Deviation), вариационен коефициент (VC%), доказаност на разликите между средните стойности на качествените показатели (t-критерий), корелационни коефициенти на Пиърсън. Постулирани са тринадесет регресионни модела, които са ранжирани по четири критерия (Пенчев, 1998). Най-адекватен за обработка на данните в настоящото проучване е линеен регресионен модел, чрез който са съставени регресионни уравнения от вида: $Y= b*X + a$, където a е свободен член (регресионна константа), а b е регресионен коефициент. Тези уравнения отразяват функционалната връзка между двете променливи – протеин (X) и седиментация (Y). Тя е представена и чрез регресионни линии, даващи възможност чрез стойностите на протеина, разположени на абцисата да се определят тези на седиментацията, разположени на ординатата.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Идентифициране на глутенини и глиадини в диплоидни и тетраплоидни пшеници за установяване на генотипове в тясна връзка със селекцията на синтетични и висококачествени сортове пшеница.

1.1. Идентифициране на запасните белтъци в диплоидния вид *Aegilops tauschii*

1.1.1. SDS-PAGE анализ на високомолекулни глутенини

През последните 50-60 години е установено, че с най-ниско алелно разнообразие от трите генома на *T. aestivum* е D-геномът, който влияе най-съществено върху крайните хлебопекарни показатели. В тази връзка с развитието на отдалечената хибридизация (междувидова и междуродова) са създадени нови синтетични форми пшеница с участието на вида *Aegilops tauschii*. Ето защо вниманието се концентрира върху изучаване генетичното разнообразие на дивия вид и включване на цените форми в селекцията. В настоящото изследване са проучени 15 образеца от *Ae. tauschii* с различен произход. На Фигура 1 са предствени три от анализираните форми на вида, №1914, 1916 и 1918.

Фигура 1. Образци от *Aegilops tauschii*, отгледани в оранжерията на Добруджански земеделски институт през 2013 г.: 1, 4 - №1914; 2, 5 - №1916; 3, 6 - №1918.

Наличието на голям брой нови, високомолекулни субединици в D-генома на *Ae. tauschii* с близка електрофоретична подвижност наложи тяхното фракциониране да бъде осъществено на 8% и 12% SDS-PAGE гелове. За да се отстранят всякакви съмнения относно наличието на отделни алели и тяхната идентичност, както и за подобряване на разделянето, е използван модифициран SDS-PAGE метод, с добавка на 4M урея (Lafiandra et al., 1993).

Идентифицирани са единадесет различни високомолекулни глутенинови субединици, които формират девет ВМГ комбинации, срещащи се с различни честоти в *Glu-D*^{t} локуса (Табл. 9, Фиг. 2). Фракции 1^t, 2.1^t, 1.5^t, 2^t, 4^t и 5^t са с по-високо молекулно тегло и по-ниска електрофоретична подвижност и се наричат x-субединици, докато 10^t, 10.1^t, 11^t, 12^t и 12.4^t са с ниско молекулно тегло и висока електрофоретична подвижност и се наричат y-субединици (Фиг. 2). Не са установени образци с null (N) субединици (x-, или y-тип), които се срещат с много ниска честота при дивия вид (Yan et al., 2003[b]; Gianibelli et al., 2001). X-субединиците 1^t, 2^t, 4^t и 5^t и y-субединиците 10^t и 12^t са характерни и за обикновената пшеница, докато фракции 1.5^t, 2.1^t, 10.1^t, 11^t и 12.4^t принадлежат единствено на дивия вид. Те не са открити в D-генома на хлебната пшеница (Tahernezhad et al., 2012). Направеният биохимичен анализ потвърждава резултатите от други проучвания (Payne et al., 1984; Lagudah and Halloran, 1988; Peña et al., 1995; Yan et al., 2003[b], Gianibeli et al., 2001) и доказва по-голямото разнообразие на ВМГ в *Glu-D1* локуса на *Ae. tauschii* в сравнение с обикновената пшеница.

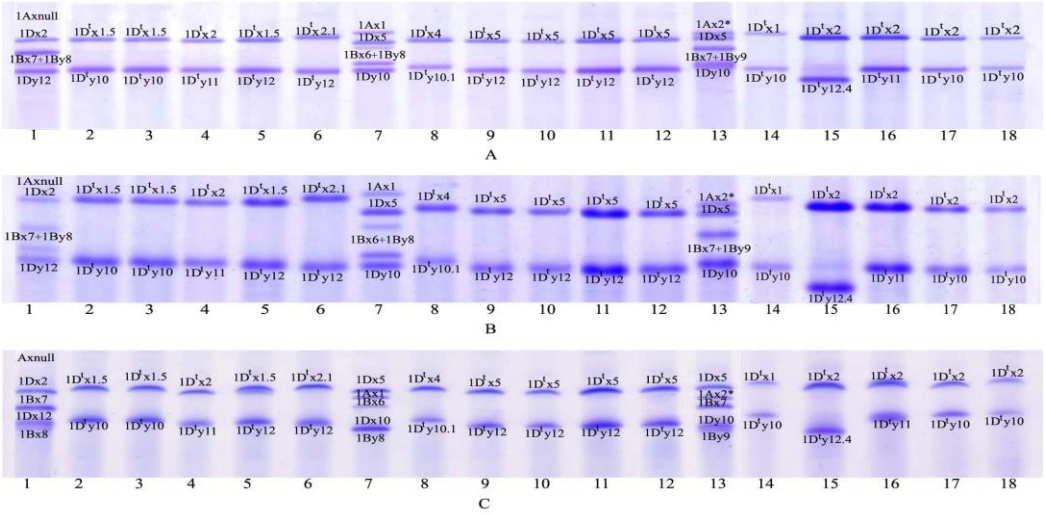
1.1.2. SDS-PAGE анализ на нискомолекулни глутенини

Резултатите от редица проучвания (Gupta et al., 1995; Тодоров, 2006) показват, че нискомолекулните глутенини (НМГ) са необходими компоненти на качеството на *T. aestivum*, макар че ефектът на ВМГ е значително по-голям от този на НМГ. Установено е

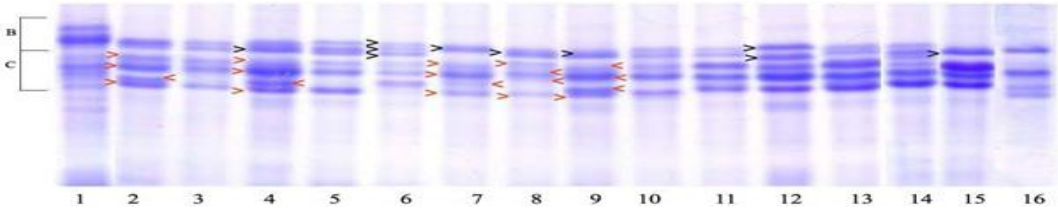
също, че съществено влияние върху хлебопекарните показатели оказват не само алелите от *Glu-D1* локуса, но и тези, локализирани в *Glu-D3*. В тази връзка е извършен SDS-PAGE електрофоретичен анализ на НМГ на всички образци. Като стандарт е използван сортът хлебна пшеница Gabo (Фиг. 3). Установено е алелно разнообразие в диплоидния вид, изразяващо се в експресията на по-голям брой нискомолекулни фракции с различна електрофоретична подвижност в сравнение с тези на алелите от *Glu-D3* локуса на обикновената пшеница. Получените резултати потвърждават данните от изследванията на Pflüger et al. (2001[b]).

Таблица 9. ВМГ конфигурации и честоти в *Glu-D^{t}1* локуса на *Aegilops tauschii*

Брой на ВМГ конфигурации	Състав на ВМГ ($1D^t$ x + $1D^t$y)	Образци	
		Брой	Честота (%)
1	1^t+10^t	1	6.67
2	1.5^t+10^t	2	13.33
3	1.5^t+12^t	1	6.67
4	2^t+10^t	2	13.33
5	2^t+11^t	2	13.33
6	2^t+12.4^t	1	6.67
7	2.1^t+12^t	1	6.67
8	4^t+10.1^t	1	6.67
9	5^t+12^t	4	26.67
9		15	100



Фигура 2. ВМГ в *Glu-D^{t}1* на *Ae. tauschii* чрез 12 % SDS-PAGE (A), 8 % SDS-PAGE (B), урея 10 % SDS-PAGE (C): 1. К. пролетна, 2. 22744, 3. 19089, 4. 30421, 5. 30425, 6. 1918, 7. Норе (стандарт), 8. 19088, 9. 31488, 10. 1914, 11. 1916, 12. 149, 13. Безостая 1, 14. 1917, 15. 26991, 16. 30423, 17. 30452, 18. 1915

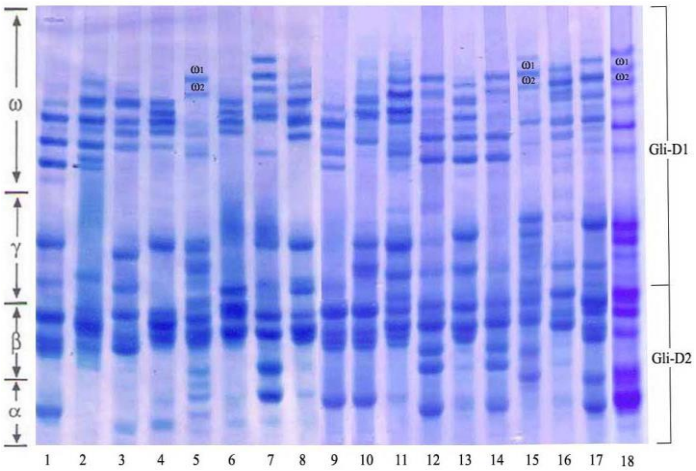


Фигура 3. SDS-PAGE на НМГ субединици (B- и C-) на образци от *Ae. tauschii* чрез 12 % SDS-PAGE: 1. Gabo, 2. 19088, 3. 30421, 4. 30423, 5. 30452, 6. 1915, 7. 1918, 8. 1917, 9. 22744, 10. 31488, 11. 1914, 12. 1916, 13. 149, 14. 30425, 15. 26991, 16. 19089; B-субединиците са посочени с черни стрелки, а C- с червени

1.1.3. A-PAGE анализ на глиадини

Мономерните глиадини се групират в блокове, принадлежащи към *Gli–1* локуса (Metakovsky et al., 1984) и обхващат ω- и γ- зоните (Фиг. 4). В обрзаците от *Ae.tauschii* са установени 15 различни глиадинови блока (Фиг. 4). В осем образеца (№19088, 30423, 30452, 1915, 1917, 22744, 19089, 1916) липсват бавноподвижните ω-глиадини, които са характерни за *T. aestivum* (Фиг. 4). Други четири (№31488, 1914, 149 и 26991) притежават два бавноподвижни бенда, означени като ω_1 и ω_2, както при обикновената пшеницата (Фиг. 4). Тези два компонента са един от двата основни протеинови типа в хлебната пшеница, известен като Chinese spring (CS)-тип на ω-глиадините (Masci et al., 1991). Този тип се кодира от *Gli-D1d* алела. В №30421 (спектър 2) е установен бенд със същата електрофоретична подвижност като тази на ω_1 в К. пролетна и Безостая 1. Той е в комбинация с друг бенд с по-ниско молекулно тегло от ω_2. В съответствие с проучването на Masci et al. (1991) глиадиновите спектри на два от образците - №30425 и 1918 са подобни на другия основен глиадинов тип, известен като Cheyenne–тип на ω-глиадините, който се кодира от *Gli-D1l* алела в обикновената пшеница (Фиг. 4).

Gli-D2 блоковете обхващат глиадинови компоненти, които се намират в β- и α-зоните (Фиг. 4). Повечето от бендовете в тези зони са по-интензивно оцветени в сравнение с компонентите на *Gli–D1*. Наблюдава се слабо припокриване на *Gli–D1* и *Gli–D2* групите в региона между γ- и β- зоните, което до известна степен затруднява класификацията на тези протеини. α-глиадините са частично или слабо експресирани, а при някои от формите напълно липсват.



Фигура 4. A-PAGE на глиадини на образци от *Ae. tauschii*: 1. 19088, 2. 30421, 3. 30423, 4. 30452, 5. К.пролетна, 6. 1915, 7. 1918, 8. 1917, 9. 22744, 10. 19089, 11. 31488, 12. 1914, 13. 1916, 14. 149, 15. Безостая 1, 16. 26991, 17. 30425, 18. Cheyenne

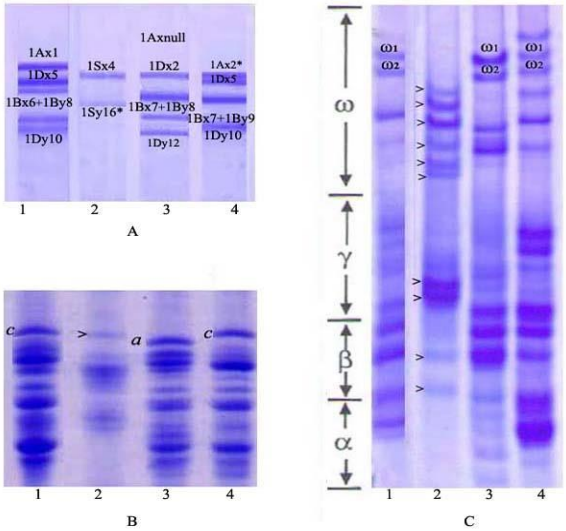
1.2. Идентифициране на запасните белтъци в други диплоидни видове

1.2.1. Анализи в диплоидния вид *Aegilops speltoides*

Редица проучвания сочат, че B-геномът е много сходен със S-генома на видовете от секция *Sitopsis* в род *Aegilops* (Huang et al., 2010) и един от тях, *Aegilops speltoides*, се счита за най-вероятният донор на този геном в полиплоидните пшеници.

В настоящото проучване чрез SDS-PAGE електрофореза е идентифициран глутениновия алелен състав на един образец *Aegilops speltoides.* Две високомолекулни глутенинови фракции (x- и y-) присъстват в S-генома на вида (Фиг. 5A). Мажорната субединица 1Sx е експресирана между субединици 1 и 2* от *Glu-A1* локуса на стандартите. Съгласно номенклатурата на Payne and Lawrence (1983) установената фракция има сходна електрофоретична подвижност с тази на субединица 4 от *Glu-D1* локуса на обикновената пшеница. Минорната субединица 1Sy е локализирана между субединици 7 и 8 от *Glu-B1* на К. пролетна, където вече е идентифицирана субединица 16* от Wang et al. (2013). По отношение на нискомолекулните глутенини е установена минорна фракция, намираща се на нивото на алел *c* от *Glu-A3* локуса на обикновената пшеница (означена със стрелка на фигура 5B). Различаваме шест мажорни бенда в областта на ω-глиадините и два в областта на γ-глиадините (означени със стрелки на фигура 5C). В зоните, съответстващи на *Gli-A1* и *Gli-B2* в *T. aestivum*, присъстват две минорни субединици в

областта на β-глиадините (означени със стрелки на фигура 5С). В областта на α-глиадините няма експресия на протеини.

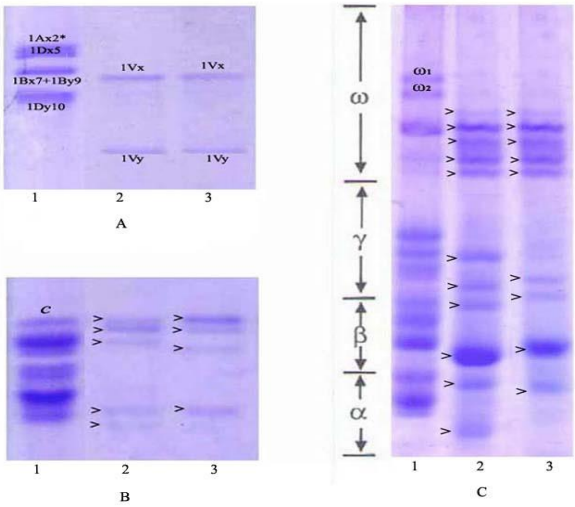


Фигура 5. ВМГ(А) и НМГ (В) чрез SDS-PAGE и глиадини (С) чрез 8% А-PAGE на *Ae. speltoides*: 1. Hope, 2. *Ae. speltoides*, 3. К. пролетна, 4. Безостая 1

1.2.2. Анализи в диплоидния вид *Dasypyrum villosum*

Електрофоретичните и цитологичните проучвания сочат диплоидния вид *D. villosum* (2n=2x=14, VV) като друг предполагаем донор на В-генома в хексаплоидната пшеница (Montebove et al., 1987; Zhong and Qualset, 1993; Haider, 2012). Идентифицирани са голям брой високомолекулни субединици, кодирани от *Glu-V1* локуса, като алелите в този локус продуцират по две субединици (х- и у-), подобно на двойките ВМГ субединици, кодирани от *Glu-B1* в хексаплоидната пшеница (De Pace et al., 2001

В настоящото проучване са установени 1Vx субединица, локализирана между бендове 7 и 8 или 7 и 9 от В-генома на пшеницата и 1Vy фракцията с по-висока електрофоретична подвижност в сравнение със субединици 10 и 12 от профила на стандартите (Фиг. 6А). По отношение на нискомолекулните глутенини са идентифицирани два биотипа, които се характеризират с различен брой и електрофоретична подвижност на отбелязаните фракции и с бенд на нивото на алел *c* от спектъра на обикновената пшеница (Фиг. 6В, НМГ субединиците са означени със стрелки). Резултатите от А-PAGE анализа показват наличието и на две различни конфигурации на глиадиновите спектри в дивия вид. Те са еднакви в областта на ω-глиадините, където са установени четири мажорни и един минорен бенд. Различават се по броя на субединиците в регионите на γ-, β и α-глиадините (Фиг. 6С, субединиците са посочени със стрелки).



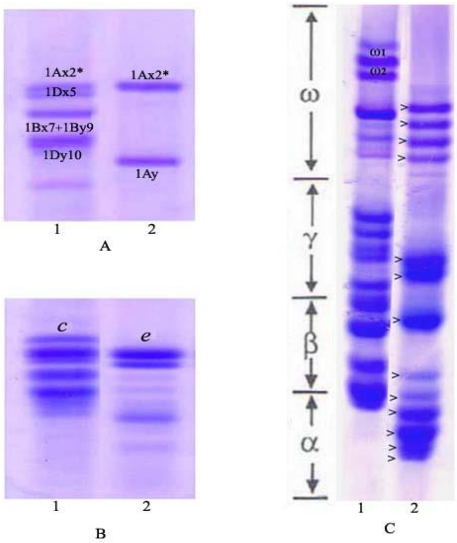
Фигура 6. ВМГ (А) и НМГ (В) чрез SDS-PAGE и глиадини (С) чрез 8% А-PAGE на *D. villosum*: 1. Безостая 1, 2-3. *D. villosum*.

1.2.3. Анализи на глутенини и глиадини в други диплоидни пшеници

Дивите диплоидни видове *T. boeoticum* и *T. urartu* и култивираният диплоиден *T. monococcum* са донори на А-генома на полиплоидната пшеница (Kimber and Feldman, 1987; Spetsov et al., 2006; Goncharov et al., 2009; Li et al., 2015).

Проучен е фракционният състав и алелното вариране на запасните белтъци в един образец от *T. urartu* №18333 и други девет от три вида (Табл. 1).

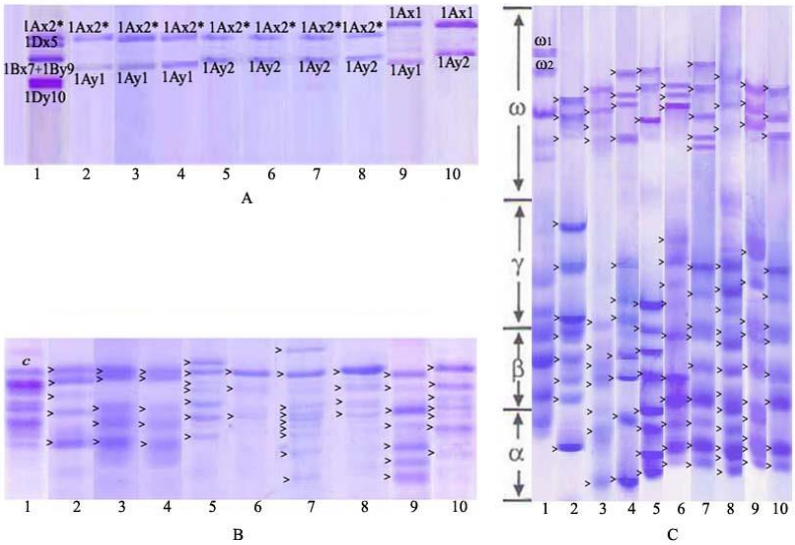
В глутениновия спектър на *T. urartu* е установено наличието на субединица A1x2*, която се позиционира на едно и също ниво със субединица 2* от спектъра на Безостая 1. Идентифицираната A1y фракция показва по-висока електрофоретична подвижност от тази на субединици 10 и 12 от спектъра на *T. aestivum* (Фиг. 7A). В *Glu-A3* на диплоидния вид е идентифициран бенд, кодиран от алел *e*, отнасящ се към "мълчащите алели" (Фиг. 7B). По отношение на глиадиновите спектри е установена липсата на характерните за хексаплоидната пшеница бавноподвижни ω_1 и ω_2 бендове. Идентифицирани са четири мажорни бенда в областта на ω и два в областта на γ-глиадините. В областта на β-глиадините са експресирани три бенда, единият от които е много интензивен. α-глиадините са представени от 4 интензивни фракции (Фиг. 7C; бендовете са посочени със стрелки).



Фигура 7. ВМГ (A) и НМГ (B) чрез SDS-PAGE и глиадини (C) чрез 8% A-PAGE на един образец от *T. urartu*: 1. Безостая 1, 2. №18333.

ВМГ в образци от останалите диплоидни пшеници (*Triticum boeoticum*, *Triticum monococcum*, *Triticum sinskajae*) са представени от общо четири субединици – две x и две y (*Glu-A1x*1, *Glu-A1x*2* и *Glu-A1y*1, *Glu-A1y*2) (Фиг. 8A). Тяхната идентификация е извършена в съответствие с Keskin Şan et al. (2015), които характеризират и номерират *Glu-A1y* фракциите, сравнявайки позицията им спрямо субединици 7 и 8 или 7 и 9 от *Glu-B1* на стандартни сортове пшеница. Субединиците, които имат електрофоретична подвижност между 7 и 8 са означени като *Glu-A1y*1 (y-тип 1). ВМГ, които имат една и съща електрофоретична подвижност с тази на субединица 7 са означени като *Glu-A1y*2 (y-тип 2), а тези с по-ниска електрофоретична подвижност от субединица 7 са означени като *Glu-A1y*3 (y-тип 3). В настоящото проучване не са идентифицирани образци от 2x-пшеница с *Glu-A1x*null и *Glu-A1y*null субединици. Експресираните бендове в *Glu-A1x* и *Glu-A1y* са комбинирани в четири фракционни двойки: (*Glu-A1x*1, *Glu-A1y*1), (*Glu-A1x*1, *Glu-A1y*2), (*Glu-A1x*2*, *Glu-A1y*1) и (*Glu-A1x*2*, *Glu-A1y*2) (Фиг. 8A). НМГ се характеризират със значително алелно разнообразие в сравнение с Безостая 1. Установените бендове в *Glu-A3* локуса (Фиг. 8B, означени със стрелки) са с различна интензивност и техният брой варира от три (№45126) до девет (№62). Всеки образец се характеризира със специфичен глиадинов профил. Най-голямо е алелното разнообразие в областта на ω-глиадините, където са идентифицирани от три до пет бенда, формиращи алелни комбинации, различни от тези в *Gli-A1* локуса на Безостая 1. Във всички форми (подобно на диплоидния вид *T. urartu*) липсват бавноподвижните ω_1- и ω_2- бендове, характерни за спектъра на обикновената пшеница (Фиг. 8C).

Karagöz et al. (2006) изследват образци *T. boeoticum* и *T. urartu* и установяват, че те са много подобни по морфология, но се различават по електофоретичните спектри на високомолекулните глутенини, което е доказано и от други автори (Waines and Payne, 1987; Ruiz et al., 2012). Идентифицираната 1Ay субединица е с по-висока електрофоретична подвижност в *T. boeoticum,* докато в *T. urartu* същата субединица е на нивото на субединица 12, установена в спектъра на обикновената пшеница K. пролетна (Waines and Payne, 1987). 1Ax субединицата в *T. boeoticum* е малко по-бърза от тази в *T. urartu* и субединица 2 в обикновената пшеница (Waines and Payne, 1987; Hu et al., 2012).



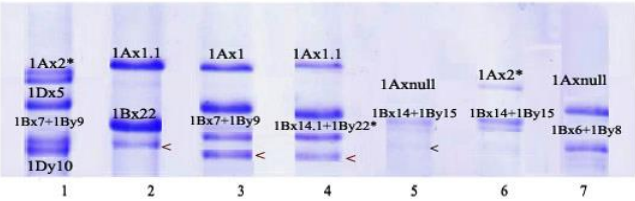
Фигура 8. ВМГ (А) и НМГ (В) чрез SDS-PAGE и глиадини (С) чрез 8% А-PAGE на диплоидни пшеници: 1. Безостая 1, 2. 18397; 3. 001; 4. 6734; 5. 56; 6. 45126; 7. 62; 8. 64; 9. 110-8; 10. 18401.

1.3. Идентифициране на запасните белтъци в тетраплоидни пшеници

1.3.1. Анализи в *Triticum dicoccum*

Двузърнестият лимец е културна плевеста пшеница, която се характеризира със значително вариране на запасните ендоспермови протеини (Vallega and Waines, 1987; Pflüger et al., 2001[b], Yan et al., 2003[c]). Това определя вида като ценен източник на полезни гени за повишаване на алелното разнообразие в обикновената пшеница.

Анализирани са ВМГ на четири образеца (Фиг. 9). Идентифицираните алели в *Glu-A1* и *Glu-B1* и честотата, с която се срещат в изследваните форми са представени в Таблица 10.



Фигура 9. ВМГ чрез SDS-PAGE електрофореза на двузърнест лимец: 1. Безостая 1, 2. 45390, 3. 45398, 4. 45432, 5. 44961, 6. Загорка, 7. Agridur; стрелките показват 1Ay субединиците.

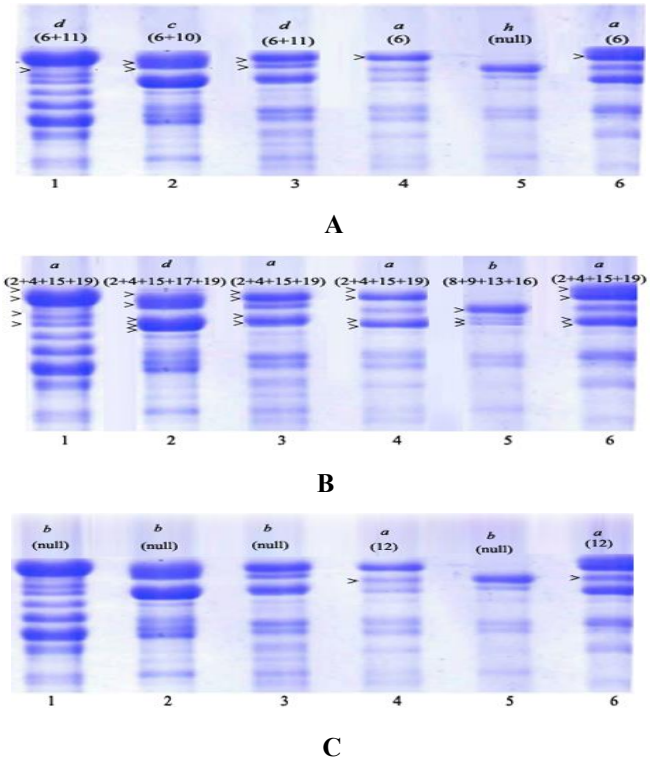
С най–голяма честота (50.0 %) се среща субединица 1Ax1.1 от *Glu-A1* локуса. Тя се позиционира между 1 и 2.1* и за първи път е установена при проучване на 205 образеца от Li et al. (2006). Тук субединицата (алел *Glu-A1x*) присъства в №45390 и №45432. Други алели (*Glu-A1c* и *Glu-A1a*), отговорни за експресията на null и 1, са характерни и за 4x- и 6x-пшеници. Установени са 4 алела в *Glu-B1*. Три от тях - *Glu-B1b*, *Glu-B1h* и *Glu-B1k* са идентифицирани за първи път в електрофоретичните спектри на хексаплоидни пшеници (McIntosh et al., 2013). Образец №45432 притежава алел *Glu-B1bl*, кодиращ фракционна двойка 14.1+22*, в която субединица 14.1 е малко по-бързоподвижна от субединица 14. Този алел, който не се среща в *Glu-B1* локуса на обикновената пшеница, е установен и от други автори в двузърнестия лимец (Li et al., 2006). Установените субединици формират 4 алелни комбинации: null, 14+15; 1, 7+8; 1.1, 22 и 1.1, 14.1+22* (Фиг. 9). В спектрите на анализираните пшеници са установени допълнителни бендове (мажорни и минорни) освен описаните ВМГ субединици (Фиг. 9;

бендовете са означени със стрелки). Тези фракции са с по-голяма подвижност и са локализирани на една и съща позиция с 1By- и 1Dy-субединици. Предполага се, че допълнителните протеинови компоненти са 1Ay-субединици, кодирани от *Glu-A1* локуса (Waines and Payne, 1987; Li et al., 2015) или 1Bz-субединици, кодирани от хромозома 1B (Holt et al., 1981). Известно е, че Ay-алелите са ” мълчащи алели” в обикновената пшеница. Въпреки, че генетиката и функционалните свойства на тези субединици все още не са добре изяснени, редица изследвания показват, че генотиповете с наличие на x- и y-тип субединици в *Glu-A1* локуса са по-качествени в сравнение с тези, които притежават само x-тип (1 или 2*) (Johansson et al., 1993).

Таблица 10. Алелен състав и честота на ВМГ в *Triticum dicoccum*

Локус	Субединица/ Фракционна двойка	Алел	Образци	
			Брой	Честота, %
Glu-A1	null	*c*	1	25.0
	1	*a*	1	25.0
	1.1	*x*	2	50.0
Glu-B1	7+8	*b*	1	25.0
	14+15	*h*	1	25.0
	14.1+22*	*bl*	1	25.0
	22	*k*	1	25.0

Установени са НМГ спектри, като всеки образец притежава от 4 до 8 бенда с различна електрофоретична подвижност (Фиг. 10). В Таблица 11 е представен алелния състав в *Gli-B1*, *Glu-A3*, *Glu-B3* и *Glu-B2* на анализираните тетраплоидни пшеници.

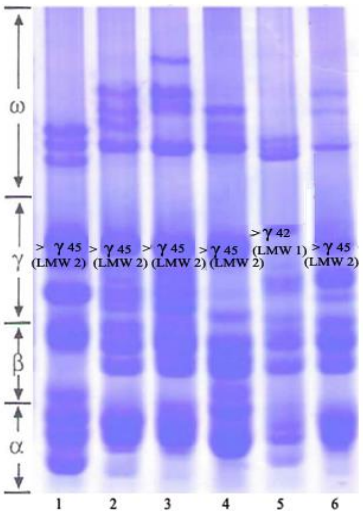


Фигура 10. НМГ в *Glu-A3* (A), *Glu-B3* (B) и *Glu-B2* (C) локуса: 1. 45390, 2. 45398, 3. 45432, 4. 44961, 5. Загорка, 6. Agridur; алелите са означени с букви, а субединиците-с цифри и стрелки.

В глиадиновите спектри на всички образци е идентифициран бенд, съответстващ по своята електрофоретична подвижност на γ-глиадин 45, кодиран от локус *Gli-B1* (Фиг. 11, Табл. 11). Установената фракция е маркер за добро качество.

Таблица 11. Алелен състав на анализираните образци от *T. dicoccum*

Образец	*Gli-B1*	НМГ модел	*Glu-A3*	*Glu-B3*	*Glu-B2*
45390	γ_{45}	НМГ2	*d*	*a*	*b*
44961	γ_{45}	НМГ2	*a*	*a*	*a*
45398	γ_{45}	НМГ2	*c*	*d*	*b*
45432	γ_{45}	НМГ2	*d*	*a*	*b*
Загорка(стандарт)	γ_{42}	НМГ1	*h*	*b*	*b*
Agridur(стандарт)	γ_{45}	НМГ2	*a*	*a*	*a*



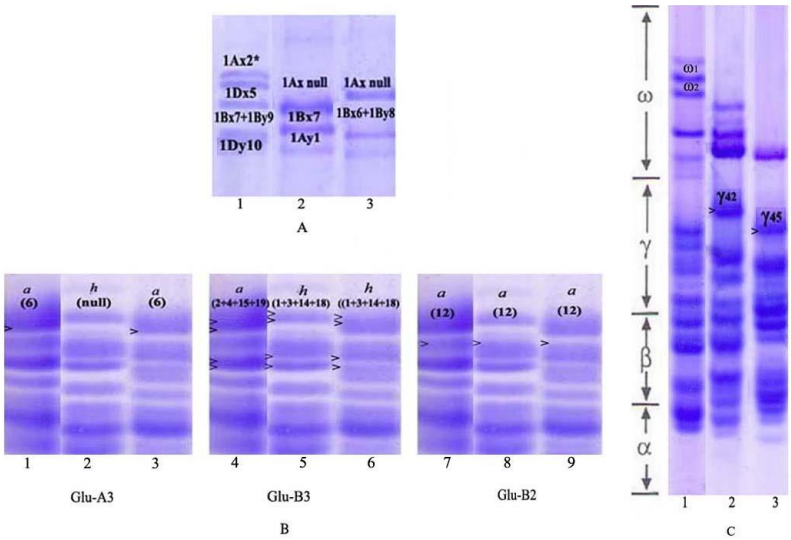
Фигура 11. Глиадини на *T. dicoccum*: 1. 45390, 2. 45398, 3. 45432, 4. 44961, 5. Загорка, 6. Agridur; със стрелки са посочени γ-глиадиновите фракции и са означени НМГ модели.

1.3.2. Анализи в *Triticum turanicum*

Видът *T. turanicum* притежава висока устойчивост към неблагоприятните климатични въздействия и болести, едро зърно, големи класове и добрите хлебопекарни качества, които го определят като ценен генетичен източник за подобряване на културната пшеница.

В настоящото проучване е извършен електрофоретичен анализ на резервните белтъци в два образеца, №11019 и 12389. В областта на ВМГ е идентифицирана субединица null, кодирана от алел в *Glu-A1* (Фиг. 12А), която е характерна за повече от 89% от образците на *T. turanicum* (Xu et al., 2007) ВМГ състав в *Glu-B1* локуса е различен при двата образеца (Фиг. 12А). В спектъра на №12389 е установена фракционната двойка 6+8 (алел *Glu-B1d*), докато алелния състав на №11019 може да бъде интерпретиран по различни начини. Първоначалното предположение е, че само единият от двата мажорни бенда е от *Glu-B1* локуса и съответства на х-тип ВМГ субединица 7 (алел *Glu-B1a*). Другият мажорен бенд е идентифициран като субединица *Glu-A1y*1 (у-тип1) (Keskin Şan et al., 2015). От друга страна, тази фракция е и на нивото на субединица *Glu-B1y*18 от спектъра на обикновената пшеница (Payne and Lawrence, 1983), където може да се комбинира единствено със субединица 17 (алел *Glu-B1i*). В такъв случай, ако експресираният бенд не е 1Ау субединица, а по-скоро съответства на *Glu-B1y*18, то в *Glu-B1* се формира нова фракционна двойка – 7+18. Тя не е характерна за *T. aestivum*, но се среща в образци хексаплоидно тритикале, където в комбинация със субединица *Glu-A1x*1 влияе положително върху крайните хлебопекарни показатели (Peña et al., 1998). За да се твърди със сигурност дали се касае за Ау или Ву субединица е необходимо да се определи точното молекулно тегло на белтъчната съставка спрямо молекулен маркер. Ето защо на този етап е прието, че става въпрос за *Glu-A1y*1 субединица с електрофоретична подвижност, която е между субединици 1Вх7 и 1Ву8. Този резултат е в съответствие с проучванията на Hu et al. (2012) и Keskin Şan et al. (2015) за наличието на алел *Glu-A1y*, който не е активен в 4х- и 6х-пшеници, но обуславя 1Ау-фракция в някои пшеници, притежаващи геном А. Такива бендове са с по-голяма подвижност и са локализирани на една и съща позиция с 1Вх, 1Ву или 1Dy (Waines and Payne, 1987, Hu et al, 2012). В спектъра на другия образец №12389 не присъства *Glu-A1y* субединица. В резултат на проведеното изследване са установени две ВМГ комбинации:

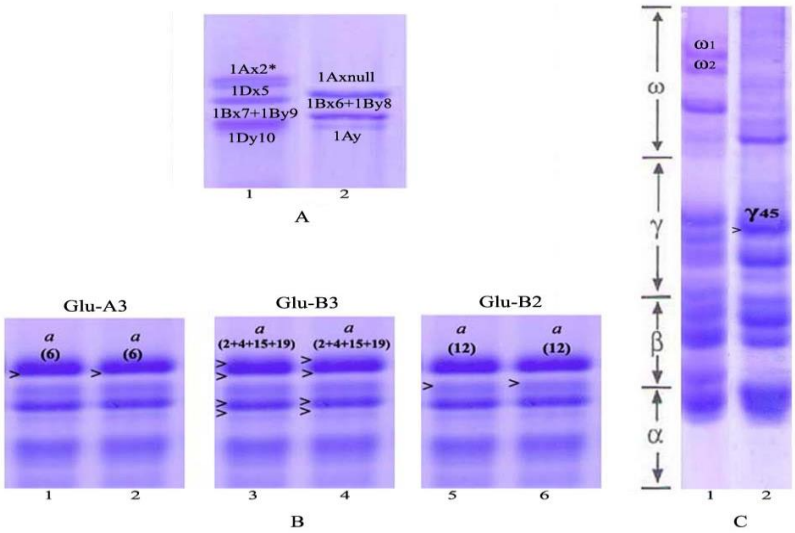
*GluA1x*null+*GluA1y*1,*GluB1x*7 и *GluA1x*null, *GluB1x*6+*GluB1y*8 (Фиг. 12А). Нискомолекулният алелен състав (Фиг. 12В) е идентифициран по номенклатурата на Nieto-Taladriz et al. (1997) спрямо стандарт Agridur. Установените биотипове са: *GluA3h*, *GluB3h*, *GluB2a* в №11019 и *GluA3a*, *GluB3h*, *GluB2a* в №12389. Отчетени са около 14 глиадинови бенда, които са с различна електрофоретична подвижност в спектрите на двата образеца (Фиг. 12С). В №12389 липсват високомолекулните ω-глиадини, характерни за хлебната пшеница, като е идентифициран един мажорен ω-бенд с по-голяма подвижност. В областта на γ-глиадините е експресирана фракция, съответстваща по своята електрофоретична подвижност на γ-глиадин 45, който е маркер за добро качество (Тодоров, 2006). В спектъра на №11019 са установени три мажорни и една минорна ω-фракции с по-висока подвижност от тези на *T. aestivum*. В локус *Glu-B1* е отчетен γ-глиадин 42, който е маркер за лошо качество.



Фигура 12. Фракционен състав на *T. turanicum* чрез: SDS-PAGE на ВМГ (А): 1. Безостая 1, 2. 11019, 3. 12389; НМГ (В) в *Glu-A3*, *Glu-B3* и *Glu-B2* локуси: 1, 4, 7-Безостая 1; 2, 5, 8-11019; 3, 6, 9-12389; А-PAGE на глиадини (С): 1. Безостая 1, 2. 11019, 3. 12389.

1.3.3. Анализи в *Triticum polonicum*

T. polonicum в сравнение с *T. aestivum*, притежава някои специфични агрономически признаци като по-едро зърно и по-висока способност за братене.



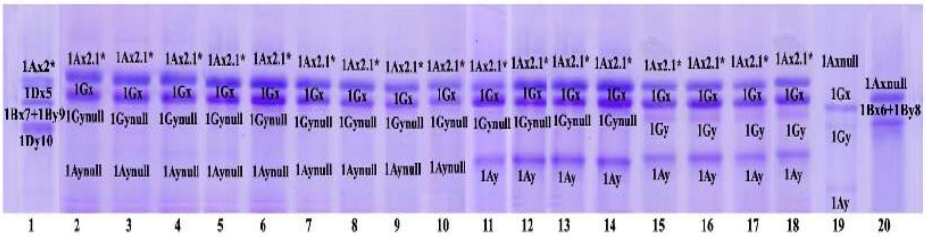
Фигура 13. Алелен състав на *T. polonicum*, ВМГ (А): 1. Безостая 1 2. *T. polonicum*; НМГ (В) в *Glu-A3*, *Glu-B3* и *Glu-B2* локуси: 1, 3, 5. Безостая 2, 4, 6. *T. polonicum*; Глиадини (С): 1. Безостая 1, 2. *T. polonicum*

В настоящото изследване са разграничени две субединици: A1xnull (алел *c*) и 1Ay с електрофоретична подвижност, подобна на тази на *1Dy*10 от спектъра на *T. aestivum* (Фиг. 13A). Dong et al. (2007) проучват 72 образеца от *T. polonicum* с различен произход, като установяват, че фракция Glu-A1x null се среща с най-голяма честота (84.7 %), а 1Ay – с по-малка. В *Glu-B1* локуса е идентифициран алел *Glu-B1d*, кодиращ експресията на фракционна двойка 6+8 (Фиг. 13A). Установените алели в анализирания образец *T. polonicum* формират една ВМГ комбинация: null, 6+8 (Фиг. 13A). Този генотип е установен и при анализ на различни форми от *T. polonicum* с произход от Австралия, докато в образците с произход от източна Африка и западна Азия най-характерна е комбинацията null, 20. Макар и с по-ниска честота, генотипът 1Axnull, 6+8, 1Ay е идентифициран в образци *T. polonicum* от Европа, за които по-типични са ВМГ комбинации: (null, 20) и (null, 7) (Dong et al., 2007; Hu et al., 2012). В областта на нискомолекулните глутенини алелният профил е: *GluA3a, GluB3a, GluB2a* (Фиг. 13B). В зоните на ω-, γ-, β- и α- глиадините се разграничават 13 фракции с различна интензивност. Образецът съдържа маркера за добро качество γ-глиадин 45, чийто ген е локализиран в *Gli-B1* (Фиг. 13C).

1.3.4. Анализи в *Triticum timopheevii*

Друг древен родственик на пшеницата с широко приложение в отдалечената хибридизация е тетраплоидният вид *T. Timopheevii*. Той притежава A- и G- геноми, които се считат за хомеоложни на A- и B- геномите в културната пшеница (Brown-Guedira et al., 1996), защото са носители на ВМГ субединици, сходни с тези в *T. aestivum* (Wan et al., 2002; Li et al., 2002). От A- и G- генома на *T. timopheevii* са изолирани два гена, кодиращи x- и y-тип фракции (Wan et al., 2002) и е доказана експресията на 1Ax, 1Ay, 1Gx и 1Gy субединици (Obukhova et al., 2009; Li et al., 2007). Характерни за този пшеничен вид са високото протеиново съдържание (19-22%) и наличието на нови ВМГ y-тип субединици, с доминиращ ефект върху хлебопекарните качества (Johansson et al., 1993), което го определя като важен източник на ценни гени за инкорпориране в генома на културната пшеница (Li et al., 2007; Wan et al., 2002).

Обект на настоящото изследване са 18 образеца от вида. Чрез SDS-PAGE са установени четири ВМГ конфигурации. Първата се характеризира с два мажорни бенда, които са идентифицирани като субединици 1Ax 2.1* в *Glu-A1* и 1Gx, контролирана от ген в *Glu-G1* локуса. Втората ВМГ комбинация е представена от три бенда. Един мажорен и един минорен бенд (субединици 1Ax 2.1* и 1Ay в *Glu-A1*), и бенд 1Gx в *Glu-G1* локуса. Не е установена експресия на 1Gy субединица. Третата идентифицирана ВМГ конфигурация се характеризира с четири бенда. Два от тях (мажорен и минорен) отговарят на субединици 1Ax 2.1* и 1Ay, а останалите два (мажорен и минорен) са x- и y- фракции от *Glu-G1* локуса. С най-ниска честота е четвъртата комбинация на ВМГ, която е предствена от 1Ay субединица и два бенда, съответстващи на 1Gx и 1Gy субединици от *Glu-G1* локуса. В този случай не е идентифицирана 1Ax фракция. Субединица 1Ax2.1* (алел *w*), характерна за трите високомолекулни глутенинови конфигурации (Фиг. 14), е установена за първи път от Yan et al. (2003[a]) и се позиционира между 1Ax1 и 1Ax2* при SDS-PAGE електрофореза. Установената минорна 1Ay субединица в *Glu-A1* локуса на анализираните тераплоидни образци е с по-висока електрофоретична подвижност от тази на субединица 1Dy10 от спектъра на стандарт Безостая 1. Този резултат е в съответствие и с изследванията на други автори, според които електрофоретичната подвижност на 1Ay от видовете на род *Triticum* е сходна с тази на 1Bx7, 1By8, 1Dy10, 1Dy12, а в много от случаите и по-висока от тази на 1Dy12 на обикновената пшеница (Wan et al., 2002; Hu et al., 2012).

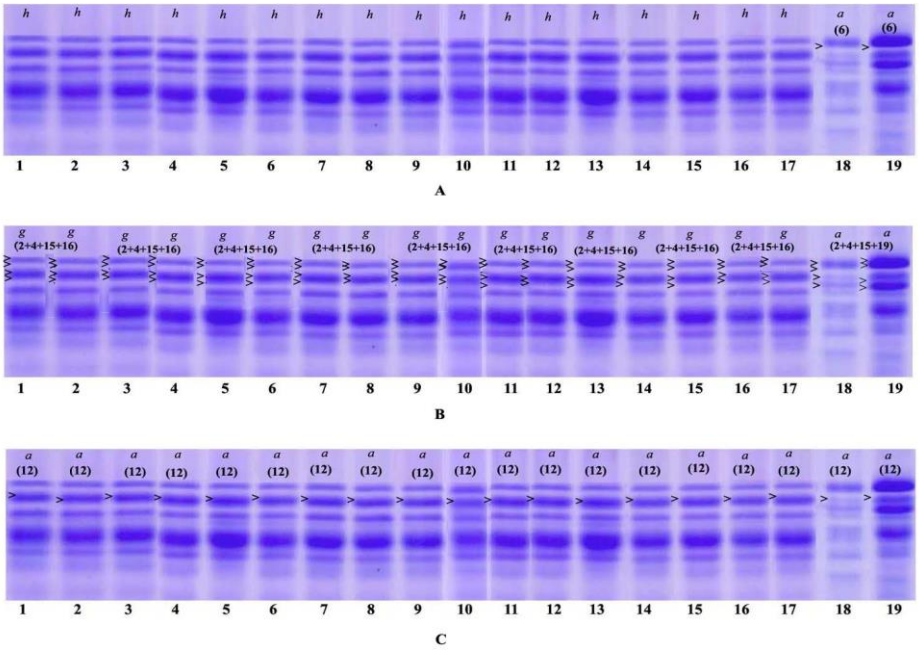


Фигура 14. ВМГ в *T. timopheevii*: 1. Безостая 1 2. 19031, 3. 19032, 4. 26967, 5. 30009, 6. 30012, 7. 31245, 8. 31246, 9. 31248, 10. 31249, 11. 19033, 12. 26761, 13. 26762, 14. 30013, 15. 30010, 16. 30011, 17. 30014, 18. 31247, 19. 34176, 20. Agridur

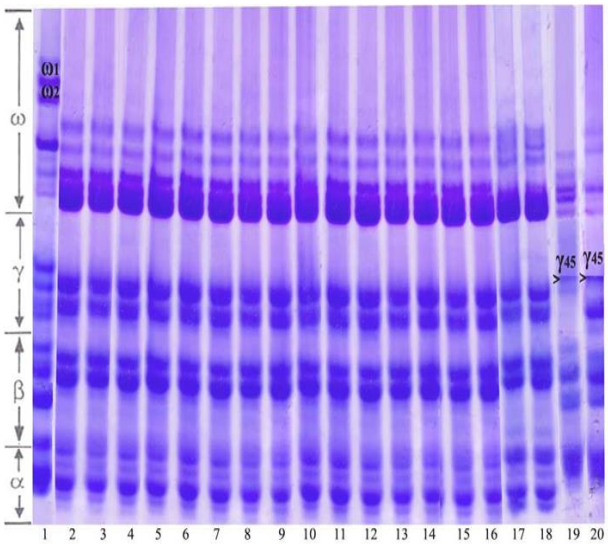
1Gx субединицата, характерна за три от ВМГ конфигурации (Фиг. 14) е установена в 17 образеца на вида. Тя е локализирана на нивото на 1Bx6 в твърдата пшеница, сорт Agridur, като

притежава по-високо молекулно тегло от 1Bx7 и има сходна електрофоретична подвижност с 1Dx5 на стандарт Безостая 1. Този резултат се потвърждава от изследването на Wan et al. (2002). За разлика от описаната 1Gx субединица, фракция x-, експресирана в *Glu-G1* на BGR 34176 (Фиг. 14) има различно молекулно тегло и електрофоретична подвижност. Тя е позиционирана почти на нивото на 1Bx7 от спектъра на хлебната пшеница и има по-ниско молекулно тегло от 1Bx6 на стандарта Agridur. В пет от образците е идентифицираната и 1Gy субединица, разположена между 1Bx7 и 1By9 от спектъра на стандарт Безостая 1 (Фиг. 14).

Идентификацията на НМГ алели е извършена спрямо стандарт Agridur. Установен е *Glu-A3* алел в №34176 на нивото на алел *a* от спектъра на *T. durum*, кодиращ субединица 6. Тя липсва в останалите образци, които съдържат алел *h* (Фиг. 15A). НМГ в *Glu-B3* на BGR34176 дават профил 2+4+15+19 (алел *a*) за разлика от останалите 17 образеца с фракционен състав 2+4+15+16, кодиран от алел *g*. Всички образци имат фракция 12, контролирана от алел *a* в локус *Glu-B2* (Фиг. 15B; Фиг. 15C).



Фигура 15. НМГ в *Glu-A3* (A), в *Glu-B3* (B) и *Glu-B2* (C) локуси чрез SDS-PAGE електрофореза в *T.timopheevii*: 1. 19031, 2. 19032, 3. 26967, 4. 30009, 5. 30012, 6. 31245, 7. 31246, 8. 31248, 9. 31249, 10. 19033, 11. 26761, 12. 26762, 13. 30013, 14. 30010, 15. 30011, 16. 30014, 17. 31247, 18. 34176, 19. Agridur.



Фигура 16. Глиадини в *T.timopheevii*: 1. Безостая1, 2. 19031, 3. 19032, 4. 26967, 5. 30009, 6. 30012, 7. 31245, 8. 31246, 9. 31248, 10. 31249, 11. 19033, 12. 26761, 13. 26762, 14. 30013, 15. 30010, 16. 30011, 17. 30014, 18. 31247, 19. 34176, 20. Agridur.

Глиадиновият спектър на образец BGR34176 е различен от този на останалите тетраплоидни форми. Идентифицирани са четири фракции в областта на ω-глиадините (две мажорни и две минорни). γ-глиадините са представени от два интензивни бенда, единият от които (посочен със стрелка на Фиг. 16) е на нивото на маркера за добро качество γ-глиадин 45, кодиран от *Gli-B1* локуса. В областта на β-глиадините са експресирани два мажорни и три минорни бенда, а в областта на α-глиадините - три много интензивни бенда, които не са достатъчно добре разделени. Глиадиновите спектри на останалите образци се различават помежду си единствено по броя на фракциите в областта на ω-глиадините, които варират от 5 до 7 (Фиг. 16).

2. Проучване на фракционния състав и алелното вариране на запасните белтъци в синтетични пшеници.

Единадесет синтетични пшеници: №32, 106, 107, 530, 531, 532, 83/27, 68/44, 85/19, 41^{к} и 1dv, са хексаплоидни (2n=42). Те са получени чрез хибридизация между диви житни (2n=14) (Табл. 1), като опрашители и тетраплоидни образци и сортове от род *Triticum* или хибридни форми (2n=28), като майчини компоненти (Табл. 2). За разлика от тях №69/36 е октаплоид (2n=56), произхождащ от кръстоска на две тетраплоидни пшеници - *T. timopheevii* (2n=28) и *T. turanicum* (2n=28) (Табл. 3). В зависимост от бащината родителска форма амфидиплоиди №32, 106, 107, 530, 531, 532, 83/27 и 68/44 притежават D-геном, наследен от *Aegilops tauschii*, а №41^{к}, 1dv, 69/36 и 85/19 – S-, V-, G- и A^{b}-, наследени от *Aegilops speltoides, Dasypyrum villosum, T. timopheevii* и *T. boeoticum*, съответно. С изключение на СХП 68/44, всички останали синтетици са носители на A^{u}- и B- геноми от тетраплоидни форми, участващи като майки в кръстоските.

2.1. Анализ на високомолекулни глутенини (ВМГ)

В спектрите на синтетичните пшеници са идентифицирани двадесет алелни варианта на ВМГ (Табл. 12 , Фиг. 17-22). Анализът диференцира четири линии в №530 (530-1, 530-2, 530-3, 530-4) и три в №532 (532-1, 532-2, 532-3) поради присъствието на различни алели в локуси *Glu-B1* и *Glu-D1*, което води до увеличаване на броя на синтетичните линии до 17.

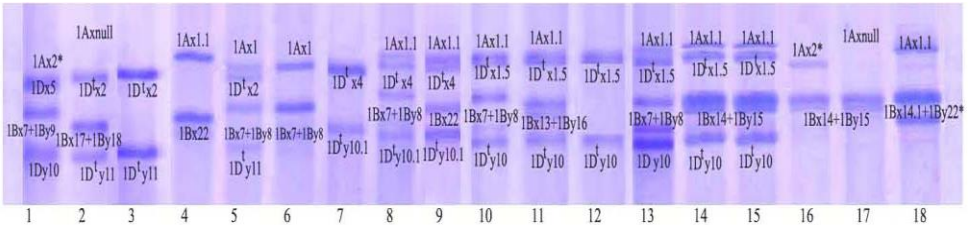
В *Glu-A1* и *Glu-B1* са установени по шест алела; в *Glu-D1*-четири, в *Glu-G1*-два, в *Glu-S1* и *Glu-V1*-по един алел. Локус *Glu-A1* се отличава със сравнително високо генетично разнообразие-H=0.71 (Табл. 12). В генетичният му потенциал участват шест алела, които са представени от четири х-тип и две у-тип субединици. Х-тип субединиците са: 1Ax1, 1Ax2*, 1Ax1.1 и null (N), които са кодирани от алели *Glu-A1a, Glu-A1b, Glu-A1c* и *Glu-A1x*. Алелът *x* се среща с най-голяма честота, в осем генотипа, следван от алели *c* и *a*. Алелът *c* се характеризира с нулева синтеза на белтък и обуславя ниски хлебопекарни качества (скор 1) за разлика от алел *a*, който е свързан с високо качество. Y-тип субединиците са установени в *Glu-A1* на амфидиплоиди №85/19 (Фиг. 18) и №69/36 (Фиг. 19A-B). Ау-бендът в спектъра на №69/36 е в комбинация с *1Ax*2* субединица, а в №85/19 – с *1Ax*null. Във вторият синтетик у-фракцията е с по-ниска електрофоретична подвижност (по-високо молекулно тегло) от субединица 7 от *Glu-B1* на хлебната пшеница (стандарти Безостая 1 и К. пролетна), и мястото й съответства на *1Ay*3 (у-тип 3) субединица според номенклатурата на Keskin Şan et al. (2015). Наличието на у-тип субединици в А-генома на синтетичните форми е предпоставка за добри хлебопекарни качества на пшеницата според Rasheed et al. (2012[a]). Идентифицирани са шест алелни варианта в локус *Glu-B1*, което е свързано с повишено генетично разнообразие-H=0.77 (Табл.12). Наследственият потенциал на този локус е представен във висока степен от фракционни двойки 7+8 и 14+15, които са установени с една и съща честота (31.3 %). Алел *b* (7+8) обуславя високо качество. Алел *h* (14+15) има добър качествен скор, но поради не неговото значителното присъствие в пшеничните сортове и линии липсват конкретни данни за влиянието му върху силата на глутена (Payne et al., 1987[a]). Всяка от рядко срещащите се субединици (7, 22, 13+16 и 17+18) е установена да присъства в отделен образец. От всички ВМГ най-важни за хлебопекарните показатели на пшеничното брашно са алелите, установени в D-генома. Локусът *Glu-D1* е представен от четири алела, които са комбинация от три х-тип и четири у-тип субединици (Табл. 12). Х-тип са *1Dx*1.5, *1Dx*2 и *1Dx*4, а у-тип - *1Dy*10, *1Dy*10.1, *1Dy*11 и *1Dy*12.4. И четирите установени фракционни двойки в този локус са непознати за вида *T. aestivum*. Техен донор е *Ae. tauschii*. Високата концентрация в наследствения потенциал от фракционната двойка *1Dx*1.5+*1Dy*10, кодирана от алел *Glu-D1ah*, е причина за по-ниското генетично разнообразие-

H=0.63. Двойката е идентифицирана за първи път от Wiliam et al. (1993) и е доказано, че има съществен, положителен ефект върху крайните хлебопекарни качества (Tang et al., 2008).

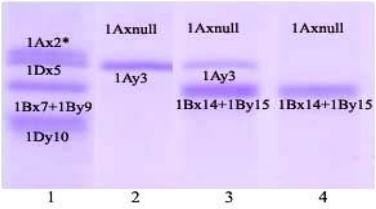
Таблица 12. Алелен състав на ВМГ в локус *Glu-1* на седемнадесет синтетични пшеници (включително и четири линии в №530 и три в №532)

Локус	Алели	Субединици	Glu-1 скор	Брой линии	Честота, %
Glu-A1	*a*	1	3[a], 2[b]	3	17.6
H* = 0.71	*b*	2*	3	1	5.9
	c	null	1	3	17.6
	x	1.1	-	8	47.1
	-	2*+Ay	-	1	5.9
	-	null+Ay		1	5.9
*Glu-B1***	*a*	7	1	1	6.2
H* = 0.77	*b*	7+8	3	5	31.3
	f	13+16	3	2	12.5
	i	17+18	3[d]	1	6.2
	h	14+15	3[c], 2[d]	5	31.3
	k	22	1	2	12.5
*Glu-D1****	*ah*	1.5+10	-	7	53.8
H* = 0.63	-	2+11	-	2	15.4
	-	4+10.1	-	3	23.1
	-	2+12.4	-	1	7.7
*Glu-S1*****	-	4+16*	-	1	-
*Glu-G1*****	-	G_x	-	1	-
	-	G_x+G_y	-	1	
*Glu-V1*****	-	$Vx+V_y$	-	1	-

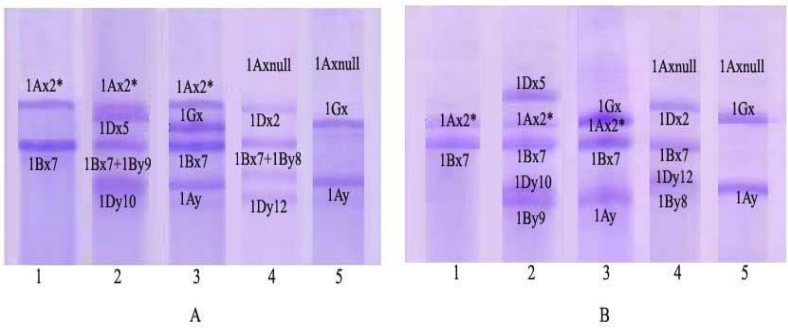
[a] Payne et al, 1987[a]; [b] Тодоров, 2006; [c] Branlard and Dardevet, 1985; [d] Bahraei et al., 2004; * Индекс на генетично разнообразие (Nei, 1973; Hintum and Elings, 1991); ** В *Glu-B1* честотите на алелите и индекса на Nei са изчислени спрямо 16 линии (68/44 не притежава B-геном); *** В *Glu-D1* честотите на алелите и индекса на Nei са изчислени спрямо 13 линии (69/36, 85/19, 41[к] и 1dv не притежават D-геном); **** В *Glu-S1*, *Glu-G1* и *Glu-V1* честотите на алелите и индекса на генетично разнообразие не са изчислени поради малкия брой анализирани синтетици със S-, V- и G- геноми.



Фигура 17. SDS-PAGE на ВМГ на девет СХП, получени чрез кръстосване на *T. dicoccum* (включително и хибридни тетраплоидни родители) с *Ae. tauschii*: 1. Безостая 1 , 2. СХП83/27 (*T. turgidum* ssp. *dicoccum* Khapli-III/№001), 3. №30422 (*Ae. tauschii*), 4. 45390 (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*), 5. СХП 531 (45390/45398/30422), 6. №45398 (*T.turgidum* ssp. *dicoccum*), 7. 19088 (*Ae. tauschii*), 8. СХП530-1 (45390/45398/19088), 9. СХП530-2 (45390/45398/19088), 10. СХП532-1 (45390/45398/22744), 11. СХП 532-2 (45390/45398/22744), 12. №22744 (*Ae. tauschii*), 13. СХП107 (45398/22744), 14. СХП106 (44961/Загорка/45432/22744), 15. СХП32 (44961/Загорка/45432/19089), 16. Загорка (*T.durum*), 17. 44961 (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*), 18. №45432 (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*).



Фигура 18. SDS-PAGE на ВМГ на СХП85/19, получена с участието на *T. boeoticum*: 1. Безостая 1, 2. *T. boeoticum*, 3. 85/19, 4. *T. polonicum*.



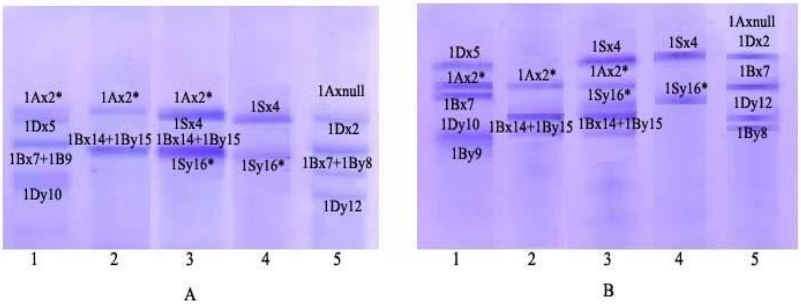
Фигура 19. ВМГ чрез 12% SDS-PAGE (А) и 10% SDS-PAGE с урея (В) на синтетик №69/36, получен с участието на *T. timopheevii*: 1. *T. turanicum*, 2. Безостая 1, 3. 69/36; 4. К. пролетна, 5. *T. timopheevii*.

Отчетен е един алелен вариант в локус *Glu-S1*, който е комбинация от 1Sx и 1Sy субединици (Фиг. 20А-В). Двете фракции са наследени в синтетик $41^{к}$ от дивия диплоиден вид *Aegilops speltoides* (2n=14, SS), считан за най-вероятният донор на В-генома в полиплоидните пшеници. Х-тип субединицата е експресирана между 1 и 2* от *Glu-A1* на обикновената пшеница, където се намира субединица 4 съгласно системата на Payne and Lawrence (1983). Означава се като *1Sx*4. Y-тип фракцията е локализирана между субединици 7 и 8 от *Glu-B1* на К. пролетна, на нивото на бенд 16*, който е характерен за спектъра на различни образци от *Aegilops speltoides*. За по-доброто разделяне и идентифициране на 1S-бендовете е използвана 10% SDS-PAGE електрофореза с добавка на 4М урея в състава на разделящия гел.

Диплоидният вид *Dasypyrum villosum* (2n=14, VV) е източник на V-генома в синтетичния хексаплоид №1dv. Добре диференцирани чрез 10% SDS-PAGE с 4М урея са две фракции, съответстващи на х- и у- субединици. Относителната електрофоретична подвижност на фракция *1V*х съответства на тази на субединиците от В-генома на обикновената пшеница, докато *1V*у е по-бързо подвижна от *1Dy*10 и *1Dy*12, характерни за *T. aestuvum* (Фиг. 21А-В).

В състава на №68/44 и 69/36 влиза тетраплоидният вид *Triticum timopheevii* (2n=28, $GGA^{u}A^{u}$), от който синтетичните форми са наследили геном G-, носител на гени, кодиращи ВМГ субединици, нетипични за зърнените протеини в хлебната пшеница (Табл. 12).

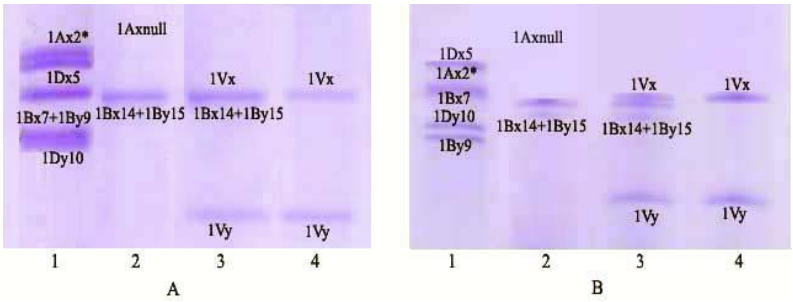
В *Glu-G1* на амфидиплоид №69/36 резултатите от електрофоретичния анализ показват наличието на алел, кодиращ експресията на една х-тип субединица (Фиг. 19А-В), докато в синтетик №68/44 са установени две глутенинови фракции – х- и у-. Те са по-високомолекулни от субединица *1Bx*7 от *Glu-B1* на стандартните сортове Безостая 1 и К. пролетна. Чрез класическата Laemmli система (12% SDS-PAGE; Laemmli, 1970) не могат да бъдат добре диференцирани. Отлично разделяне е постигнато чрез 10% SDS-PAGE с 4М урея благодарение на способността на уреята да променя позициите на белтъчните субединици върху гела (Фиг.22А-В; Lafiandra et al., 1993).



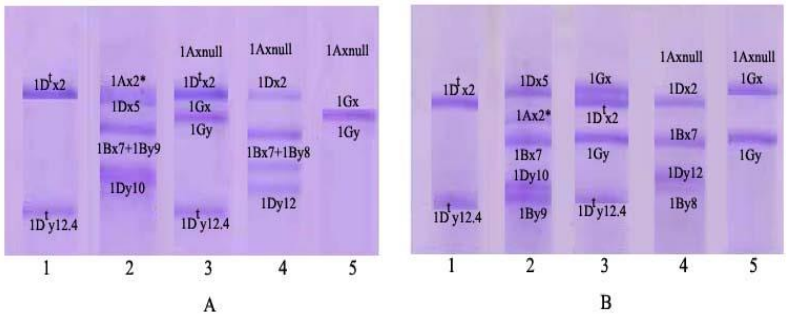
Фигура 20. ВМГ чрез 12% SDS-PAGE (А) и 10% SDS-PAGE с урея (В) на СХП $41^{к}$, получена с участието на *Ae. speltoides*: 1. Безостая 1, 2. Загорка (*T. durum*), 3. $41^{к}$, 4. *Aegilops speltoides*, 5. К. пролетна

Ефектът на ВМГ, наследени в синтетичните форми от дивите видов *Ae. speltoides*, *D. villosum* и *T. timopheevii* върху хлебопекарните показатели не е добре проучен, но експресията

едновременно и на двата гена – x- и y- в СХП41^{к}, 1dv и 68/44 е предпоставка за очакван, положителен ефект върху параметрите на тестото.



Фигура 21. ВМГ чрез 12% SDS-PAGE (A) и 10% SDS-PAGE с урея (B) на СХП 1dv, получена с участието на *D. villosum*: 1. Безостая 1, 2. Гергана (*T. durum*), 3. 1dv, 4. *D. villosum.*



Фигура 22. ВМГ чрез 12% SDS-PAGE (A) и 10% SDS-PAGE с урея (B) на синтетик 68/44, получен чрез кръстосване на *T. timopheevii* с *Ae. tauschii*: 1. *Ae. tauschii*, 2. Безостая 1, 3. 68/44; 4. К. пролетна, 5. *T. timopheevii*.

Giraldo et al. (2010) анализират 165 пшенични популации с произход от Испания и идентифицират четири, девет и три ВМГ субединици в локуси *Glu-A1, Glu-B1* и *Glu-D1*, но субединиците 1.1, 22 и двойките 14+15, 1.5+10, 2+11 и 4+10.1, установени в настоящото проучване, не са сред тях. Yasmeen et al. (2015) проучват 242 линии пшеница, включително местни популации от Пинджаб и Балучистан, както и сортове пшеница от Пакистан, и установяват редица нетипични алелни комбинации в *Glu-B1*, но без участието на субединици 1.1 и 22, и трите фракционни двойки от *Glu-D^{t}1* локуса. При проучване на португалската пшеница Барбела, Ribeiro et al. (2013) съобщават за нова x-тип ВМГ субединица, кодирана от *Glu-A1* локуса, която е означена като *1Ax*1.1, докато Ravel et al. (2014) идентифицират субединица 1Bx22 при проучване на образци пшеница. Rasheed et al. (2012^{a}) анализират 95 синтетични хексаплоидни пшеници (*T. turgidum/A. tauschii*) и установяват 22 глутенинови субединици, 13 от които са в *Glu-D^{t}1* локуса. В настоящото проучване са анализирани девет СХП, в които са идентифицирани 11 субединици (три в *Glu-D^{t}1* локуса). Пет субединици (1.1, 14+15, 22, 2+11 и 4+10.1) отсъстват в изследването на Rasheed et al. (2012^{a}), като две от тях, фракционните двойки 2+11 и 4+10.1, кодирани от *Glu-D^{t}1* локуса, са ВМГ субединици, установени тук за първи път.

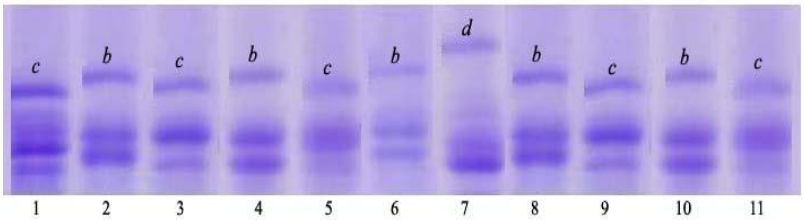
Идентифицираните алелни варианти в локуси *Glu-A1, Glu-B1, Glu-D^{t}1, Glu-G1, Glu-S1* и *Glu-V1* не са характерни за хлебната пшеница, но като се има предвид, че броят на високомолекулните алели обуславящи различни по състав резервни протеини е ограничен, интрогресията им в генома на културната пшеница ще доведе до създаване на изходни материали с високо качество на зърното.

2.2. Анализ на нискомолекулни глутенини (НМГ) и глиадини

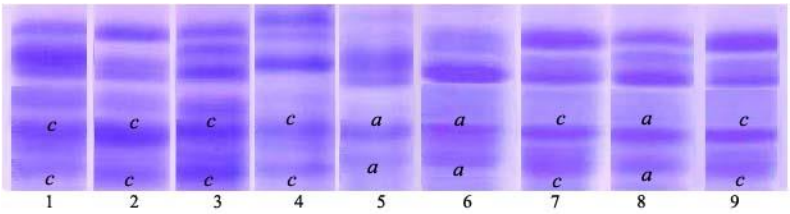
Нискомолекулните глутенинови и глиадинови алели на синтетичните хибриди са адитивна комбинация от алелите на тетраплоидните и диплоидните родителски форми. За разлика от значителния полиморфизъм на синтетичните пшеници по отношение на ВМГ, варирането при нискомолекулните белтъци е по-слабо.

Идентифицирани са три алела (*b, c, d*) в *Glu-A3* на синтетици №32, 106, 107, 530, 531, 532 и 83/27, които се дължат на тетраплоидните родители. С най-голяма честота се среща алел *b*

(Фиг. 23). В локус *Glu-D^{t}3*, наследен от *Ae.tauschii*, са идентифицирани фракции на нивото на алели *a* и *c* от *Glu-D3* на обикновената пшеница, като алел *c* е експресиран с по-голяма честота (Фиг. 24).



Фигура 23. НМГ в *Glu-A3* чрез 10% SDS-PAGE с урея на десет СХП, получени с участието на *Ae. tauschii*: 1. Безостая 1, 2. 530-1, 3. 530-2, 4. 532-1, 5. 532-2, 6. 531, 7. 83/27 , 8. 107, 9. 106, 10. 32-1, 11. 32-2.



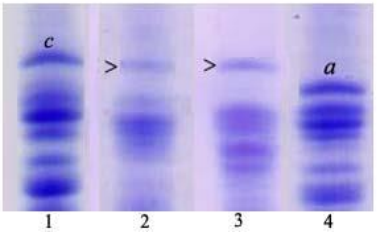
Фигура 24. НМГ в *Glu-D3* чрез 12 % SDS-PAGE на осем СХП, получени с участието на *Ae. tauschii*: 1. Безостая 1, 2. 530, 3. 531, 4. 532, 5. 83/27, 6. 107, 7. 106, 8. 32-1, 9. 32-2.

В резултат на извършените електрофоретични анализи е установена хетерогенност в СХП 530 и 532 в *Glu-A3* и СХП 32 в локуси *Glu-A3* и *Glu-D3*. Наличието на два биотипа в посочените синтетици, които са идентични по основната част от алелите, кодиращи белтъчните субединици, а се различават само по малък брой алели, показва, че най-вероятната причина за тяхната хетерогенност е недовършената селекция на тези амфиплоиди, поради липса на електрофоретичен контрол в началните етапи на тяхното създаване.

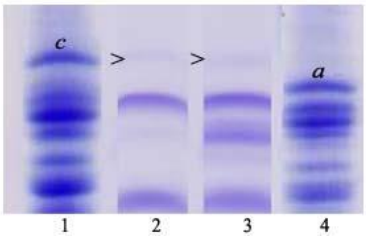
Данните от SDS-PAGE с 4М урея сочат, че анализираните елитни растения от синтетици №41^к (BBA^{u}A^{u}SS) и №85/19 (BBA^{u}A^{u}A^{b}A^b) са хомогенни по отношение на НМГ състав и притежават бенд, който е почти на нивото на алел *c* от *Glu-A3* на сорт Безостая 1. В СХП 85/19 минорната фракция е прехвърлена от А-генома на тетраплоидния родител *T. polonicum*, докато в амфидиплоид №41^к субединицата най-вероятно е наследена от S-генома на диплоидния родител *Ae. speltoides*, притежаващ експресиран бенд със сходна електрофоретична подвижност (Фиг. 25-26; бендовете са посочени със стрелки).

В *Glu-A3* на синтетици №68/44, 69/36 и 1dv също е идентифициран бенд, съответстващ на алел *c* от спектъра на *T. aestivum* (Фиг. 27). В *Glu-D^{t}3*, наследен от диплоидния опрашител *Ae. tauschii*, амфиплоид №68/44 притежава две субединици, които са на нивото на субединиците, кодирани от алел *a* в *Glu-D3* на обикновената пшеница Китайска пролетна (Фиг. 28).

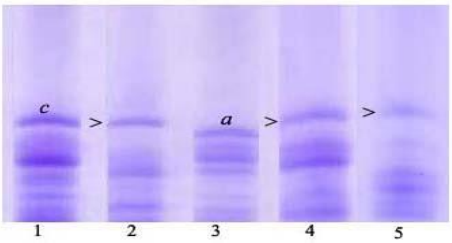
Въпреки, че алелното разнообразие при нискомолекулните глутенини е по-слабо от това на високомолекулните, в електрофоретичните спектри на синтетичните пшеници е установен голям брой НМГ субединици, различни от тези в прилежащите стандарти. Полученият резултат потвърждава изследванията на Pflëger et al. (2001[a]), който идентифицира значително алелно вариране в *Glu-D^{t}3* на група синтетични хексаплоиди (*Ae. tauschii/T. durum*).



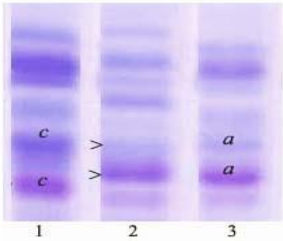
Фигура 25. НМГ състав в *Glu-A3* чрез 10% SDS-PAGE с урея на СХП41^к: 1. Без. 1, 2. *Ae. speltoides*, 3. 41^к, 4. К. пролетна



Фигура 26. НМГ състав в *Glu-A3* чрез 10% SDS-PAGE с урея на СХП 85/19: 1. Без.1, 2. *T. polonicum*, 3. 85/19, 4. К. пролетна



Фигура 27. НМГ състав в *Glu-A3* чрез 10 % SDS - PAGE с урея на синтетици: 69/36, 68/44, 1dv: 1.Без.1, 2.69/36,3.К.пролетна, 4.68/44, 5.1dv



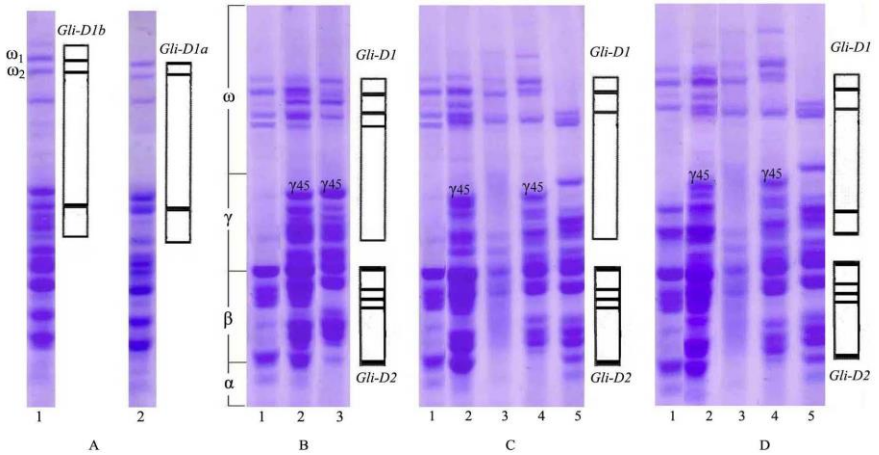
Фигура 28. НМГ състав в *Glu-D3* чрез 10 % SDS-PAGE с урея на синтетик 68/44: 1. Без.1, 2. 68/44, 3. К. пролетна

Информацията за алелния състав на НМГ допълва данните за ВМГ и прави отбора на разнообразни синтетични форми значително по-ефективен, особено в случаите, когато високият скор на ВМ белтъци не е съчетан с високо качество.

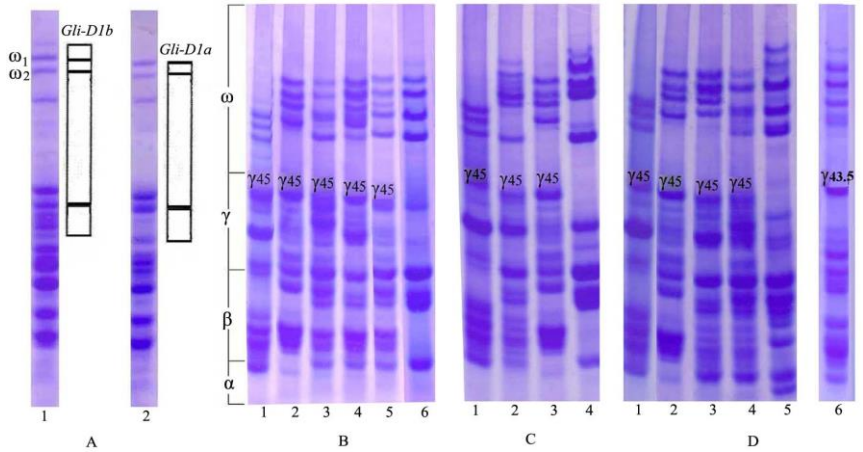
За установяване на глиадиновите блокове на синтетиците, принадлежащи към локуси *Gli-1* и *Gli-2,* е проведена А-PAGE електрофореза. Отчетено е високо ниво на вариране на глиадиновите компоненти. Всяка от изследваните седем хексаплоидни синтетични пшеници (№32, 106, 107, 530, 531, 532, 83/27) е точно идентифицирана със специфичен глиадинов блок в *Gli-D1*, наследен от съответния диплоиден образец на *Ae. tauschii* (Фиг. 29-30).

Локусът *Gli-D1* обхваща компоненти от ω- и γ-зоните, които в зависимост от интензитета на оцветяването си могат да бъдат слабо, средно или силно обагрени. Подобно на електрофоретичните спектри на образците от *Ae. tauschii*, в глиадиновите блокове на синтетичните линии №32, 106, 107, 530, 531, 532 и 83/27 липсват бавноподвижните ω-бендове характерни за стандартите (Фиг.29-30). Тези високомолекулни ω-глиадинови фракции не са проявени и в останалите амфиплоиди (№41^{к}, 1dv, 85/19, 69/36), които са носители на глиадинови гени в S-, V-, G- и A^{u}- геномите, наследени от родителските форми (Фиг. 31). Изключение прави синтетик №68/44, чийто глиадинов профил се характеризира с наличието на три високомолекулни ω-субединици, наследени от вида *T. timopheevii*, които са разположени между ω_1 и ω_2 на стандартите (Фиг. 31, бендовете са посочени със стрелки). Двойката бавноподвижни ω-компоненти, съобщена за първи път от Wrigley and Shepherd (1974) е много характерна за обикновената пшеница и е използвана като основа за първоначална идентификация на глиадиновите електрофореграми на хексаплоидни образци. *Gli-2* блоковете обхващат глиадинови компоненти от β- и α-зоните. Повечето от бендовете, влизащи в състава на тези блокове са по-интензивно оцветени в сравнение с *Gli-1*. Подобно на глиадиновите спектри на *Ae. tauschii* и в спектрите на синтетичните хексаплоиди (№32, 106, 107, 530, 531, 532, 83/27 и 68/44) в региона, очертаващ γ- и β- зоните се наблюдава известно препокриване на бързоподвижни бендове от група *Gli-D1* с бавноподвижни от *Gli-D2*, което значително затруднява идентификацията на глиадините. Прието е по-слабо оцветените бендове, с много слаба подвижност, намиращи се в началото на β- зоната да бъдат включени в *Gli-D1*, докато тези, които са интензивно оцветени и локализирани в края на γ- зоната да бъдат отнесени към *Gli-D2* (Lagudah and Halloran, 1988). Всички амфидиплоиди (с изключение на №68/44, който не притежава генома В) съдържат γ-глиадинова фракция 45 свързана със силата на пшеничния глутен. Този алел, предаден в синтетиците от тетраплоидните родители *T. turgidum* и *T. polonicum,* е свързан с високо качество на глутена. СХП83/27 и 69/36 притежават γ-глиадинова фракция 43.5, която се среща в хлебната пшеница (сорт Безостая 1) и също е маркер за добро качество, за разлика от γ-глиадин 42, който е индикатор за слаб глутен и е наследен в синтетици №41^{к} и 1dv от *T. durum* (Загорка и Гергана, съответно).

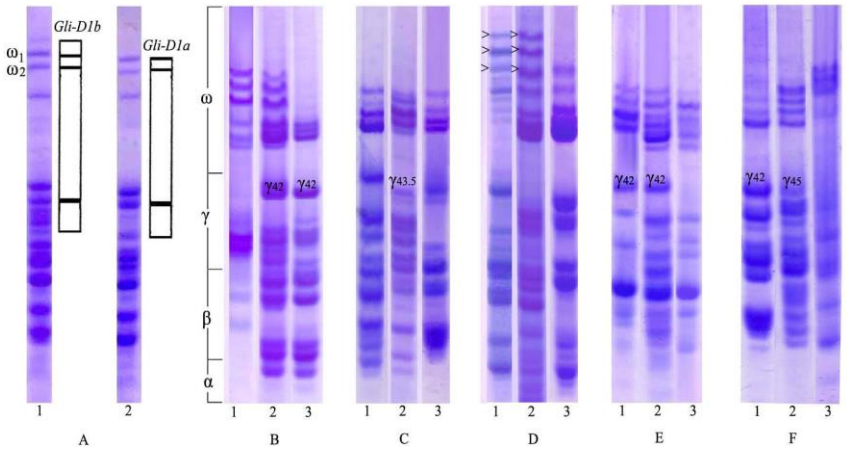
Редица субединици, кодирани от локуси *Gli-1* и *Gli-2* на анализираните амфиплоиди се препокриват със съответните хомеоалелни компоненти от А- и В- геномите на хексаплоидните пшеници. Това прави невъзможно идентифицирането на глиадиновите блокове от локус *Gli-1,* както по каталога на глиадиновите алели на обикновената пшеница, предложен от Metakovsky (1991), така и чрез използването на генетичната зависимост между алелните състави в локуси *Glu-3* и *Gli-1* (Jacson et al., 1996). В тази връзка специфичните глиадинови алели, прехвърлени от диплоидните и тетраплоидните родителски видове и експресирани в синтетичните амфиплоиди, са установени най-често чрез сравнение с родителските форми.



Фигура 29. Глиадини чрез A-PAGE на стандарти (A), СХП 107 (B), СХП 106 (C) и СХП 32 (D) и на родителски форми. A: 1. Безостая 1, 2. К. пролетна; B: 1. 22744 (*Ae. tauschii*), 2. СХП107, 3. 45398 (*T. dicoccum*); C: 1. 22744 (*Ae. tauschii*), 2. СХП106, 3. 44961 (*T. dicoccum*), 4. 45432 (*T. dicoccum*), 5. Загорка (*T. durum*), D: 1. 19089 (*Ae. tauschii*), 2. СХП32, 3. 44961 (*T. dicoccum*), 4. 45432 (*T. dicoccum*), 5. Загорка.



Фигура 30. Глиадини чрез A-PAGE на стандарти (A), СХП 530 (B), СХП 531 (C), СХП 532 и 83/27 (D) и на родителски форми. A: 1. Безостая 1, 2. К. пролетна; B: 45390 (*T. dicoccum*), 2. 45398 (*T. dicoccum*), 3. СХП530-1, 4. СХП530-2, 5. СХП530-3, 6. 19088 (*Ae. tauschii*); C: 1. 45390 (*T. dicoccum*), 2. СХП 531, 3. 45398 (*T. dicoccum*), 4. 30422 (*Ae. tauschii*); D: 1. 45390 (*T. dicoccum*), 2. 45398 (*T. dicoccum*), 3. СХП532-1, 4. СХП532-2, 5. 22744 (*Ae. tauschii*), 6. 83/27.



Фигура 31. Глиадини чрез A-PAGE на стандарти (A), СХП 41^{к} (B), №69/36 (C), СХП 68/44 (D), СХП 1dv (E), СХП 85/19 (F) и на родителски форми. A: 1. Безостая 1, 2. К. пролетна; B: 1. *Ae. speltoides*, 2. 41^{к}, 3. Загорка (*T. durum*); C: 1. *T. turanicum*, 2. №69/36, 3. *T. timopheevii*; D: 1. *T. timopheevii*, 2. СХП 68/44, 3. *Ae. tauschii*, E: 1. Гергана (*T. durum*), 2. СХП 1dv, 3.*D. villosum*; F :1.*T. polonicum*, 2. СХП 85-19, 3. *T. boeoticum*.

3. Изследване на резервни протеини, биометричен анализ и качествени показатели на нови линии пшеница

Анализирани са зърна от двадесет и седем кръстоски в BC_2F_2, BC_1F_5 и F_6 генерации (Табл. 4), получени от кръстосване на СХП530 и 532 и Н-83/27 със сортове обикновена зимна пшеница.

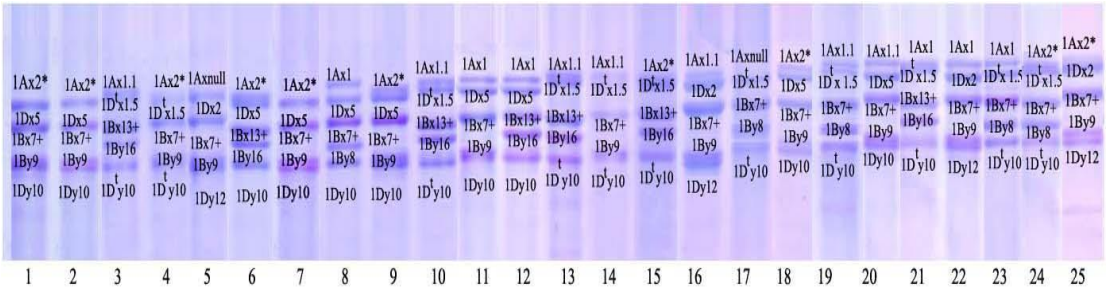
3.1. Високомолекулен глутенинов фракционен състав и конфигурации

Резултатите за фракционния състав на високомолекулните запасни ендоспермови белтъци показват, че новите форми съдържат повече от един биотип, т.е. те са хетерогенни. Всеки биотип следва да се възприема като отделна линия, поради което общият брой на анализираните генотипове възлиза на 92. В трите високомолекулни глутенинови локуса (*Glu-A1, Glu-B1* и *Glu-D1*) са идентифицирани общо дванадесет субединици/фракционни двойки (Табл. 13, Фиг. 32).

Основната част (60.9%) от генетичния потенциал в локус *Glu-A1* на проучваните линии пшеница се контролира от алелите, обуславящи експресията на свързаните с високо качество субединици 2* и 1. Субединица null (N), която няма отношение към качеството на зърното, показва относително ниска честота – 15.2%. Субединица 1.1 е наследена от синтетичните родителски форми. Експресията на тази субединица се кодира от алел *x,* който не се среща в А-генома на обикновената пшеница и създава нови комбинации за изследване на влиянието им върху качеството. Генетичният потенциал в локус *Glu-A1* намира количествен израз в изчисления скор-1.98, при максимално възможен 3.00. Действителната стойност на този показател би трябвало да е по-голяма от посочената, защото при изчисляването й не се включва срещащата се с висока честота субединица 1.1 (23.9%), чийто Glu-1 скор все още е неизяснен. Генетичното разнообразие, изчислено чрез H=0.73, надвишава значително средното ниво (H=0.50).

В локус *Glu-B1* са идентифицирани четири алела. Основната част от наследствения потенциал на локуса (58.7%) се контролира от алел *c*, обуславящ експресията на свързаната с добро качество фракционна двойка 7+9. Най-благоприятните фракционни двойки 7+8 и 13+16 контролират 39.1% от качеството на проучваните линии. Субединица 6+8, с честота 2.2% има малък дял в контрола на качеството. В резултат на този фракционен състав и честотата на включените в него субединици, локус *Glu-B1* се характеризира с малко над средното ниво на генетично разнообразие – H=0.58. Изчисленият Glu-1 скор е 2.37 при максимално възможен 3.00.

Наследственият потенциал на качеството в локус *Glu-D1* се отличава с широка генетична основа (H=0.66). Тя е обусловена от по-големия брой алели, два от които кодират нови фракционни двойки – 1.5+10 и 4+10.1 за вида *T. aestivum*. Те са прехвърлени в новополучените генотипове от D-генома на диплоидния вид *Ae. tauschii* чрез СХП 530 и 532. Установена е висока честота на свързаната с много добро качество фракционна двойка 5+10. Glu-1 скорът на локуса е 2.26 при максимално възможен 4.00. Той би бил много по-висок като се има предвид високата честота на субединици 1.5+10, както и тази на 4+10.1, които са с неизвестен Glu-1 скор до момента и не са включени при изчисляването му. Общият Glu-1 скор на алелите от трите високомолекулни глутенинови локуса е 6.61. Тъй като във формирането на този скор не участват субединица 1.1 от *Glu-A1* и фракционните двойки 1.5+10 и 4+10.1 от *Glu-D1*, оценката му е добра спрямо максимално възможния скор при ВМГ на обикновената пшеница, който е 10.



Фигура 32. Алелно вариране на ВМГ в част от новополучените генотипове пшеница: 1. Безостая 1; 2. 128-1; 3. СХП 532-1 (родител); 4. 128-2; 5. 128-3; 6. 136-1; 7. Аглика (родител); 8. 136-2; 9. Полена (родител); 10. СХП 532-2 (родител); 11. 166-1; 12. 166-2; 13. 168-1; 14. 118-1; 15. 168а-1; 16. 181-1; 17. 110-1; 18. 177-1; 19. 110-2; 20. 167а-1; 21. 168-2; 22. 166-3; 23. 168а-2; 24. 110-3; 25. 168-3

От направеният анализ на фракционния състав се вижда, че новите форми се характеризират с много добър наследствен потенциал за качество, дължащ се на съдържащите се в тях високомолекулни глутенини. Съществен дял при формирането на посочената генетична основа имат и новите алели в *Glu-A1* и *Glu-D1*, кодиращи експресията на субединици, обуславящи по-високи наследствени заложби на качеството в обикновената зимна пшеница.

Таблица 13. Честота на високомолекулните глутенинови алели и субединици в изследвани кръстоски, получени с участието на синтетични пшеници

Локус	Алели	Субединици	Glu-1 скор	Брой генотипове	Честота, %
Glu-A1	*c*	null	1	14	15.2
H*=0.73	*a*	1	3	24	26.1
Скор>1.98	*x*	1.1	-	22	23.9
(3.00)	*b*	2*	3	32	34.8
Glu-B1	*b*	7+8	3	22	23.9
H*=0.58	*c*	7+9	2	54	58.7
Скор=2.37	*f*	13+16	3	14	15.2
(3.00)	*d*	6+8	1	2	2.2
Glu-D1	*d*	5+10	4	43	46.7
H*=0.66	*a*	2+12	2	18	19.6
Скор>2.26	*ah*	1.5+10	-	26	28.3
(4.00)	-	4+10.1	-	5	5.4
H*=0.66					
Glu-1 скор					
6.61 (10.00)				92	100.0

* Показател за генетично разнообразие

В резултат от рекомбинацията на гените, локализирани в трите *Glu-1* локуса, в кръстоските са установени 30 високомолекулни глутенинови конфигурации (Табл. 14, Фиг. 32). В следващата таблица (Табл. 15) са посочени високомолекулните глутенинови конфигурации на родителските форми, участващи в кръстоските.

Таблица 14. ВМГ конфигурации в кръстоски, получени с участието на синтетични форми

Кръстоска №	ВМГ конфигурации			ВМГ алели			Glu-1 скор	Брой зърна	
	Glu-A1	*Glu-B1*	*Glu-D1*	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*		Брой	%
149	N	6+8	2+12	*c*	*d*	*a*	4	1	1.1
128, 181, 115	N	7+9	2+12	*c*	*c*	*a*	5	3	3.3
57	N	7+9	5+10	*c*	*c*	*d*	7	1	1.1
128, 181	N	7+9	1.5+10	*c*	*c*	*ah*	-	2	2.2
115, 95	N	7+8	2+12	*c*	*b*	*a*	6	2	2.2
111,112, 115	N	7+8	5+10	*c*	*b*	*d*	8	3	3.3
112	N	7+8	4+10.1	*c*	*b*	-	-	1	1.1
125	N	13+16	2+12	*c*	*f*	*a*	6	1	1.1
149	1.1	6+8	2+12	*x*	*d*	*a*	-	1	1.1
181, 206б	1.1	7+9	2+12	*x*	*c*	*a*	-	2	2.2
92, 95, 167a, 168, 206б, 109	1.1	7+9	5+10	*x*	*c*	*d*	-	6	6.5
95,109,118, 136,168, 168a, 181	1.1	7+9	1.5+10	*x*	*c*	*ah*	-	7	7.6
110	1.1	7+8	1.5+10	*x*	*b*	*ah*	-	1	1.1
121	1.1	7+8	4+10.1	*x*	*b*	-	-	1	1.1
125	1.1	13+16	2+12	*x*	*f*	*a*	-	1	1.1
168, 168a, 177	1.1	13+16	1.5+10	*x*	*f*	*ah*	-	3	3.3
134, 166, 181	1	7+9	2+12	*a*	*c*	*a*	7	3	3.3
118,121, 134, 155,166, 168,	1	7+9	5+10	*a*	*c*	*d*	9	9	9.8

168a,177,181									
57, 119, 121, 136, 146, 155	1	7+8	5+10	*a*	*b*	*d*	10	6	6.5
121	1	7+8	4+10.1	*a*	*b*	-	-	1	1.1
166, 177	1	13+16	5+10	*a*	*f*	*d*	10	2	2.2
136, 166, 168	1	13+16	1.5+10	*a*	*f*	*ah*	-	3	3.3
128, 166, 168, 206б	2*	7+9	2+12	*b*	*c*	*a*	7	4	4.3
92, 95, 110, 118,119, 128, 166,167a,16, 168a, 177	2*	7+9	5+10	*b*	*c*	*d*	9	11	11.9
92, 95, 109, 128, 136, 143	2*	7+9	1.5+10	*b*	*c*	*ah*	-	6	6.5
109, 112, 146	2*	7+8	5+10	*b*	*b*	*d*	10	3	3.3
136, 143	2*	7+8	1.5+10	*b*	*b*	*ah*	-	2	2.2
112, 121	2*	7+8	4+10.1	*b*	*b*	-	-	2	2.2
136, 177	2*	13+16	5+10	*b*	*f*	*d*	10	2	2.2
136, 168a	2*	13+16	1.5+10	*b*	*f*	*ah*	-	2	2.2

Таблица 15. ВМГ конфигурации на сортове хлебна пшеница и СХП 530 и 532

Сорт	ВМГ конфигурации			ВМГ алели		
пшеница	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
Аглика	2*	7+9	5+10	*b*	*c*	*d*
Албена	N	7+8	5+10	*c*	*b*	*d*
	1	7+8	5+10	*a*	*b*	*d*
	2*	7+8	5+10	*b*	*b*	*d*
Горица	2*	7+9	5+10	*b*	*c*	*d*
Антица	N	7+9	5+10	*c*	*c*	*d*
	2*	7+9	5+10	*b*	*c*	*d*
Енола	1	7+9	5+10	*a*	*c*	*a*
Карат	N	7+9	2+12	*c*	*c*	*a*
Кристора	1	7+8	2+12	*a*	*b*	*a*
Корона	N	7+8	2+12	*c*	*b*	*a*
Мерилин	2*	7+8	5+10	*b*	*b*	*d*
Олимпиада	1	7+9	5+10	*a*	*c*	*d*
Перла-2	N	7+8	5+10	*c*	*b*	*d*
	N	7+9	5+10	*c*	*c*	*d*
Победа	2*	7+9	5+10	*b*	*c*	*d*
Полена	2*	7+9	5+10	*b*	*c*	*d*
Свилена	1	7+9	5+10	*a*	*c*	*d*
	2*	7+9	2+12	*b*	*c*	*d*
Славея	1	7+9	5+10	*a*	*c*	*d*
	2*	7+9	5+10	*b*	*c*	*d*
Тодора	1	7+9	2+12	*a*	*c*	*a*
Алана	N	7+8	5+10	*c*	*b*	*d*
Власта	1	7+8	5+10	*a*	*b*	*d*
Гоулд	2*	7+8	5+10	*b*	*b*	*d*
Мерито	N	6+8	2+12	*c*	*d*	*a*
СХП 530-1	1.1	7+8	4+10.1	*x*	*b*	-
530-2	1.1	22	4+10.1	*x*	*k*	-
530-3	1.1	13+16	1.5+10	*x*	*f*	*ah*
530-4	1.1	7+8	1.5+10	*x*	*b*	*ah*
СХП 532-1	1.1	7+8	1.5+10	*x*	*b*	*ah*
532-2	1.1	13+16	1.5+10	*x*	*f*	*ah*
532-3	1.1	22	4+10.1	*x*	*k*	-
СХП Н-83/27	N	17+18	2+11	*c*	*i*	-

3.2. Нискомолекулен глутенинов фракционен състав и конфигурации

Наследственият потенциал на нискомолекулните глутенини в изследваните кръстоски се характеризира със значително генетично разнообразие в първите два локуса – *Glu-A3* и *Glu-B3* и ниско - в локус *Glu-D3* (Табл. 16). Като характерна особеност може да се посочи наличието на 27 генотипа с неизяснен алелен състав в локус *Glu-B3*, дължащо се на наследяването на бендове от СХП, които не са типични за спектъра на НМГ в обикновената пшеница.

В локус *Glu-A3* са идентифицирани пет алела. В основата на нискомолекулния глутенинов спектър е алел *c* с честота – 64.1 %. Този алел притежава Glu-3 скор 3 и обуславя високо качество на пшеничния глутен. Стойността на показателя H=0.53 е малко над средното ниво. Локус *Glu-B3* се отличава с по-високо генетично разнообразие-H=0.72, дължащо се на относително равномерното разпределение на честотите на алелите. Основният алел *b,* обуславящ експресията на свързана с високо качество субединица (Glu-3 скор 4), контролира 35.9% от наследствения потенциал на локуса. Локус *Glu-D3* се характеризира с ниско генетично разнообразие-H=0.40 и ограничен алелен състав, представен само от два алела – *a* и *c*. Наследственият потенциал на този локус (72.8 %) се контролира основно от свързания с високо качество алел *c* (Glu-3 скор 3).

Таблица 16. Честота на нискомолекулните глутенинови алели в изследваните кръстоски

Локус	Алели	Брой генотипове	Честота, %
Glu-A3	*b*	4	4.4
	c	59	64.1
H*=0.53	*d*	3	3.3
	e	21	22.8
	f	5	5.4
Glu-B3	*b*	33	35.9
	f	10	10.9
H*=0.72	*g*	1	1.1
	j	21	22.8
	-	27	29.3
Glu-D3	*a*	25	27.2
	c	67	72.8
H*=0.40			
Glu 3/H*=0.55		92	100.0

* Показател за генетично разнообразие

3.3. Глиадинов фракционен състав

В резултат на рекомбинацията на голям брой глиадинови субединици, наследени както от сортовете, така и от синтетичните амфидиплоиди, участващи като родителски форми в кръстоските, е идентифицираното по-високо ниво на генетичен полиморфизъм на ω-, γ-, α-, и β-глиадините от група *Gli-1*. За голяма част от установените електрофоретични спектри са характерни нови бендове, или групи (блокове) от компоненти, които не е възможно да бъдат идентифицирани, защото установената номенклатура за глиадиновите алели на хексаплоидната пшеница е приложима за класификацията само на ограничен брой, известни алели от *Gli-1* локуса на изследваните кръстоски. В Таблица 16 и Приложение 2 са представени установените глиадинови конфигурации на анализирани потомства от изследваните генотипове, като неидентифицираните алели са пропуснати и е посочен броят на експресираните бендове, наследени от спектъра на синтетиците.

Резултатите за фракционния състав на глиадиновите белтъци показват, че с изключение на анализирани генотипове от №112, 134 и 57, всички останали съдържат по два и повече биотипа, поради което общият брой на анализираните генотипове е 81. Този брой не съответства на установените образци по отношение на високо- и нискомолекулните белтъци, които са 92. Причината за това е, че за някои потомства идентифицираните глутениновиконфигурации превъзхождат по брой установените глиадинови спектри.

Таблица 16. Глиадинови конфигурации на потомства от кръстоски №128, 136, 146 и 166, получени с участието на синтетични форми (всички глиадинови конфигурации на потомства от останалите кръстоски са дадени в Приложение 2)

Кръстоски/ потомства	Глиадинови алели			Gli-бендове от СХП
	Gli-A1	*Gli-B1*	*Gli-D1*	
128-2/1,2,3, 4,5,6,7,8	*m*	*b*	*b*	от 2 до 3 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
128-3/1,2,3, 4,5,6,7,8	*m*	*b*	*b*	-//-
128-6/4,7	*m*	*b*	*b*	-//-
128-1/1,2, 3,5,7	*m*	*l*	*b*	2 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
128-7/1,3,4	*m*	*l*	*b*	-//-
128-8/1,2,3,4	*m*	*l*	*b*	-//-
128-1/4,6	*b*	*l*	*b*	-
128-7/2	*b*	*l*	*b*	-
128-4/1,2, 3,4,5,6,7,8	*b*	*b*	*b*	-
128-6/1,2,3,8	*b*	*b*	*b*	-
128-9/1,2,3,4	*b*	*b*	*b*	-
136-1/1,7,8	-	*b*	-	4 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
136-1/3,6	*b*	*b*	-	4 бенда от СХП530 в областта на ω –глиадините
136-2/1,2,3, 4,5,6,7,8	*b*	*b*	-	-//-
136-4/1,2,3, 4,5,6,7,8	-	-	*b*	4 бенда от СХП530 в областта на ω –глиадините
136-5/3,4	*b*	-	*h*	1 бенд от СХП530 в областта на ω –глиадините
136-6/2,3,4, 6,7,8	*b*	-	*h*	-//-
136-3/5,6,7,8	*b*	*b*	*h*	-
136-5/1,2,6,8	*b*	*b*	*h*	-
136-3/1,2,3,4	*b*	*b*	*a*	-
146-3/1,2,3, 4,5	*r*	*b*	*b*	-
146-4/1,2,3, 4,5	*r*	*b*	*b*	-
146-5/1,2,3, 4,5	*r*	*b*	*b*	-
146-6/1,2,3, 4,5	*r*	*b*	*b*	-
146-1/1,2,3, 4,5	*r*	*g*	*b*	-
146-2/1,2,3, 4,5	*r*	*g*	*b*	-
166-7/1,2,3, 4,5	*m*	*b*	*f*	-
166-4/4	*m*	*b*	*b*	-
166-6/1,2,3, 4,5	*m*	*b*	*b*	-
166-3/1,2,3,	*m*	*b*	*a*	-

4,5				
166-4/1,2	*m*	*b*	*a*	-
166-5/1,2,3	*m*	*b*	*a*	-
166-8/1,2,3, 4,5				
166-9/1,2,3, 4,5	*m*	*b*	*a*	-
166-1/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*a*	-
166-2/1,2,3,4	*b*	*b*	*a*	-
166-4/3,5	*b*	*b*	*a*	-
166-5/4,5	*b*	*b*	*a*	-

3.4. Отглеждане на отбрани растения и потомства при полски условия и създаване на линии, носители на алели от D-генома на *Aegilops tauschii*

Алелният състав на ВМГ в отбрани растения от кръстоска №112 през 2013 реколтна година (BC_1F_5 генерация), 2014 реколтна година (BC_1F_6 генерация) и 2015 реколтна година (BC_1F_7 генерация) е предствен последователно в Таблици 17, 18 и 19. Данните сочат, че в резултат на извършения отбор чрез прилагане на електрофоретичния метод е постигнато почти пълно изравняване на деветте линии от кръстоска №112 - №38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 и 46 по отношение на вискомолекулния глутенинов състав в BC_1F_7 генерация. Ценен признак от селекционна гледна точка е установяването на гени, кодиращи двойката субединици 4+10.1 в локус *Glu-D1*, наследени от СХП530, чийто бащин компонент е диплоидният вид *Aegilops tauschii* (образец 19088). Подобен подход е приложен спрямо други седем кръстоски: №128, 136, 166, 168, 168а, 177 и 181. И при тях чрез отбор в BC_2F_2 генерация с помощта на SDS-PAGE електрофорезата е постигнато значително нарастване на броя на растенията в BC_2F_3, носители на желани ВМГ от *Aegilops tauschii* (Приложение 3).

Следователно, с напредване на генерациите може да бъде постигнато постепенно и пълно изравняване на изследваните потомства по отношение на техния глутенинов и глиадинов алелен спектър и получаване на нови линии пшеница, притежаващи ценни за селекцията белтъчни съставки.

Таблица 17. ВМГ на зърна (BC_1F_5) от пет отбрани класа в кръстоска №112{Албена х $76F_1$(Славея х 530-3)}

Родители/кръстоска/ генотипове	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
Албена - родител	null	7+8	5+10
Славея - родител	2*	7+9	5+10
530-1-3 - родител	1.1	7+8	4+10.1
Кр.112-1/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	null	7+8	4+10.1
Кр.112-2/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1
Кр.112-3/1,4	null	7+8	5+10
Кр.112-3/2,5,10	2*	7+8	5+10, 4+10.1
Кр.112-3/3,9,6	2*	7+8	4+10.1
Кр.112-3/7	null	7+8	5+10, 4+10.1
Кр.112-3/8	2*	7+8	5+10
Кр.112-4/1,2	2*	7+8	4+10.1
Кр.112-4/3,4,5,6,7,8,9,10	null	7+8	4+10.1
Кр.112-5/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1

Таблица 18. ВМГ състав на 9 потомства от кръстоска №112 (BC_1F_6) през 2014 реколтна година

Кръстоска, потомства, генотипове	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*	Полски № за 2015
112-2-1 -леха/ 1,2,3,4,5,6	2*	7+8	4+10.1	38
112-2-2 -леха/ 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1	39
112-2-1 -саксия/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1	40
112-2-2 -саксия/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1	41
112-2-4 -леха/ 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1	42
112-4-1 -саксия/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1	43
112-4-2 -леха/ 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1	44
112-5-1 -леха/ 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+8	4+10.1	45
112-1-2 -леха/ 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	null	7+8	4+10.1	46

Таблица 19. Глутенинов алелен състав на 9 потомства (отгледани в две повторения) от кръстоска №112 (BC_1F_7 зърна) през 2015 реколтна година

Линия №, кръстоска, потомство	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
38 112-2-1/7/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
38a[1]112-2-1/2/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
112-2-1/5/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
39 112-2-2/8/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
39a 112-2-2/2/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
112-2-2/5/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
40 112-2-1/3/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
112-2-1/8/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
40a 112-2-1/2/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
41 112-2-2/2/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
41a 112-2-2/4/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
112-2-2/5/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
42 112-2-4/4/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
42a 112-2-4/4/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
112-2-4/5/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
43 112-4-1/1/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
43a 112-4-1/1/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
112-4-1/2/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
44 112-4-2/9/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
44a 112-4-2/4/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
112-4-2/9/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
45 112-5-1/2/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
112-5-1/5/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
45a 112-5-1/3/1,2,3	2*	7+8	4+10.1
46 112-1-2/5/1,2,3	null	7+8	4+10.1
112-1-2/7/1,2,3	null	7+8	4+10.1
112-1-2/8/1,2,3	null	7+8	4+10.1

[1], второ повторение в опита; по 3 зърна са анализирани от трите най-добри растения в линия (обикновено едно от 1во и две от 2ро повторение).

3.5. Биометричен анализ на растения от потомства на кръстоска №112 (BC_1F_7) и други 8 кръстоски (BC_2F_2)

В настоящото изследване са извършени биометрични измервания на всички отгледани растения от деветте линии (№38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46) на кръстоска №112 през 2015 реколтна година спрямо стандартните сортове Аглика и Садовска Ранозрейка-4. Данните от дисперсионния и вариационния анализ по отчетените признаци сочат, че:

а/ Всички линии се характеризират с оптимална стойност на признака височина (87-103cm) от гледна точка на селекцията. Най-ниски растения формира №45 (87.3 cm). Междинно положение заемат №40, 38, 43, 39, 42 и 44 със средна височина от 96.2 до 100.6 cm. Най-високи растения формират №41 и 46 (101.6-102.9 cm).

б/ Не съществуват достоверни разлики между линиите и стандартите по признака брой братя в растение. №39 регистрира най-висок среден брой братя (M=6.7) от всички изпитвани материали. Високото вариране при потомствата и стандартите е резултат от зависимостта на признака от условията на отглеждане.

в/ С най-дълъг главен клас (M=11.5) и брой класчета в главен клас (M=24.6), както и най-стабилна по двата признака е линия №42.

г/ №42 формира най-високо средно тегло на главен клас (M=4.95) и е най-стабилна по признака, като се различава достоверно от останалите осем потомства и стандарти.

д/ Най-стабилна по признака брой зърна в главен клас е №42. Линията статистически не се различава от сорт Аглика (M=67), макар че формира средно по-малко зърна (M=58.1).

е/ Пет от общо девет линии (№42, 44, 39, 40, 41) показват високо средно тегло на зърното от главен клас. На първо място е №42 (M=3.9), която изпреварва всички, включително и стандартите. Най-стабилни по признака са №42, 46, 41 и 40.

ж/ Установени и статистически доказани са разлики в полза на линия №42, която се характеризира с най-висока стойност за масата на зърното в главен клас (65.8 g). Това е логично следствие от стойностите на ТЗ и брой зърна от главен клас, които са най-високи за тази линия. Всички потомства изпреварват сорт Аглика по МЗГКЛ и установените разлики са математически доказани.

з/ Всички линии показват висока средна маса на зърното в растение, като с най-високо изражение е линия №42 (59.0 g), а с най-ниско - линия №38 (47.2 g).

и/ С потенциал по качество на зърното се представя линия №46, която е с най-високи стойности на показателите протеин (17.3%), лизин (318 mg/100g а.с.в.) и седиментация (79 ml).

4. Оценка на качествени показатели на синтетични и новополучени линии пшеница

За разлика от запасните ендоспермови белтъци, които имат стабилна електрофоретична характеристика през различните реколтни години, качествените показатели, като съдържание на суров протеин и лизин, седиментационна стойност, мокър глутен, фаринографски показатели, обем на хляба и др. варират по години в различна степен в зависимост от агро-метеорологичните характеристики на района и от климатичните условия на годината, т.е. те се влияят много повече от условията на околната среда, отколкото от генетичния потенциал на сорта. Ето защо въздействието на високомолекулните алели, кодирани от D-генома, включително и на новите фракционни двойки 1.5+10 и 4+10.1, наследени от *Glu-D1* на диплоидния вид *Aegilops tauschii* върху качествените показатели, представлява интерес за селекцията. Не без значение са и факторите на варирането в синтетичните популации, преценени с помощта на дискриптивна статистика, t- критерий, корелационен и регресионен анализ.

С тази цел през две поредни реколтни години са анализирани зърна от СХП32, 106, 107 (2013 и 2014 р. г.) и девет потомства на кръстоска 112 (BC_1F_6/2014 р.г. и BC_1F_7/2015 р.г.), за които предварително чрез SDS-PAGE е установено, че са носители на новите фракционни двойки - 1.5+10 и 4+10.1 в *Glu-D1* локуса.

В Таблици 20 и 21 са представени статистическите параметри на качествените показатели, получени при анализ на зърно. Средните стойности на протеин, лизин и седиментация при СХП и деветте линии на кръстоска 112 превишават значително тези при стандартите и през двете години на изследването. Резултатите дават основание да се направи предположението, че новите алели влияят положително върху изследваните качествените показатели. За да бъде установена статистическата достоверност на параметрите на качествени показатели е направена оценка на разликите между средните стойности на протеин, лизин и

седиментация при СХП, потомствата на кръстоската и стандартите чрез t-критерий (Табл. 22-23). Резултатите показват, че разликите са статистически доказани при различни нива на доверие на алтернативната хипотеза. Това потвърждава предположението за положителния ефект на новите фракционни двойки, 1.5 +10 и 4+10.1 върху изследваните признаци. Оценката на корелационните коефициенти между качествените показатели (Табл. 24-25) сочи, че те в голяма степен са под силното въздействие на външните фактори, което доминира над влиянието на наследствения потенциал, т.е. влиянието на фенотипа през различните реколтни години върху взаимовръзките между качествените показатели при СХП и линиите е много по-силно изразен в сравнение с ефекта на новите фракционни двойки.

Таблица 20. Статистически параметри на протеин, лизин и седиментация в СХП и стандартите

Признак	СХП			Стандарти		
	2013 р.г./2014 р.г.					
	Хср.[1]	MS [2]	VC% [3]	Хср.[1]	MS [2]	VC% [3]
Суров протеин, %	14.41±0.11/ 15.75±0.06	1.19/ 0.27	3.31/ 1.74	11.81±0.20/ 12.32±0.24	0.54/ 0.64	4.56/ 5.23
Лизин, mg/100g а.с.в.	305.31±2.14/ 337.42±1.98	9.31/ 8.64	3.05/ 2.56	247.00±4.26/ 261.42±5.67	11.28/ 15.01	4.56/ 5.74
Седиментация, ml	63.68±0.84/ 65.84±0.86	3.67/ 3.76	5.76/ 5.71	54.57±3.29/ 57.57±4.04	8.70/ 10.69	15.93 18.57

[1] Средни стойности; [2] Средно квадратично отклонение; [3] Вариационен коефициент

Таблица 21. Статистически параметри на протеин, лизин и седиментация в новополучените линии и стандартите

Признак	Линии от кр.112			Стандарти		
	2014 р.г./2015 р.г.					
	Хср.[1]	MS [2]	VC%[3]	Хср.[1]	MS [2]	VC%[3]
Суров протеин, %	14.23±0.48/ 13.87±0.52	0.31/ 0.57	2.18/ 4.14	12.28±0.2/ 12.35±0.25	0.61/ 0.72	4.97/ 5.82
Лизин, mg/100g а.с.в.	293.22±7.72/ 278.78±9.71	12.16/ 19.13	4.15/ 6.86	266.37±7.48/ 247.12±11.67	21.14/ 33.01	7.94/ 11.80
Седиментация, ml	71.44±2.53 65.78±2.84	7.58/ 8.51	10.61/ 12.94	63.17±5.64/ 57.92±5.74	19.54/ 19.88	25.31/ 34.32

[1]Средни стойности; [2]Средно квадратично отклонение; [3]Вариационен коефициент

Таблица 22. Оценка на разликите между средните стойности на качествените показатели при СХП и стандартите през 2013 и 2014 реколтни години чрез t-критерий

	Протеин СХП/стандарти				Лизин СХП/стандарти				Седиментация СХП/стандарти			
	t-експ [1]	$t_{5\%}$ [2]	$t_{1\%}$ [2]	df [3]	t експ.[1]	$t_{5\%}$ [2]	$t_{1\%}$ [2]	df [3]	t експ.[1]	$t_{5\%}$ [2]	$t_{1\%}$ [2]	df [3]
1	11.28***	1.81	2.23	10	12.23***	1.83	2.26	9	2.69*	1.89	2.36	7
2	13.66***	1.89	2.36	7	12.64***	1.86	2.31	8	2.80*	1.89	2.36	7

[1]t-критерий; [2]t-таблично; [3]степени на свобода;1-2013г.;2-2014г.; *,**,*** *при P ≤ 0.05; 0.01; 0.001, съотв.*

Таблица 23. Оценка на разликите между средните стойности на качествените показатели при линиите и обикновената пшеница през 2014 и 2015 реколтни години чрез t-критерий

	Протеин линии/стандарти				Лизин линии/стандарти				Седиментация линии/стандарти			
	t–експ [1]	$t_{5\%}$ [2]	$t_{1\%}$ [2]	df [3]	t експ.[1]	$t_{5\%}$ [2]	$t_{1\%}$ [2]	df [3]	t експ.[1]	$t_{5\%}$ [2]	$t_{1\%}$ [2]	df [3]
1	3.67*	1.80	2.20	11	2.50*	1.75	2.13	15	2.84*	1.77	2.16	13
2	2.61*	1.79	2.20	11	2.58*	1.76	2.14	14	2.54*	1.76	2.14	14

[1]t-критерий;[2]t-таблично;[3]степени на свобода;1-2014г.; 2-2015г.;*,**,*** *при P ≤ 0.05; 0.01; 0.001, съотв.*

За да се конкретизират изследваните корелации е приложен линеен регресионен анализ, при който зависимата променлива (Y) е седиментацията, а независимата (X) е протеинът. Получените уравнения и графиките на аналитичните модели (Фиг. 33-36), показват, че тенденциите при СХП, потомствата на кръстоска 112 и стандартите са еднопосочни и през двете

години на изследването. Очевидно е, че причината за това се крие в по-силното влияние на агрометеорологичните условия, в сравнение с изявата на новите алели от *Glu-D1* локуса.

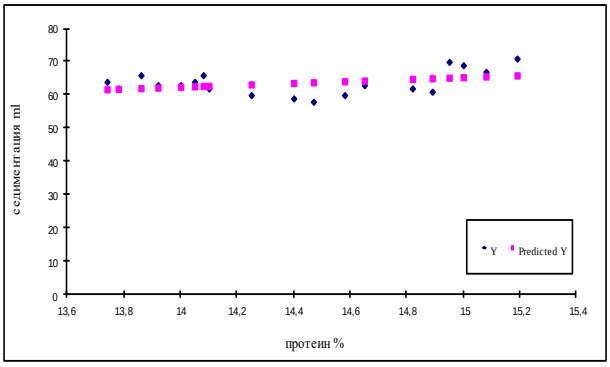
Таблица 24. Корелации между качествените показатели при СХП и стандарти

Година	Синтетични хексаплоидни пшеници			Стандарти		
2013		Лизин	Седиментация		Лизин	Седиментация
	Протеин	0.903***	0.375*	Протеин	0.999***	-0.051
	Лизин		0.564**	Лизин		-0.074
2014		Лизин	Седиментация		Лизин	Седиментация
	Протеин	0.740***	0.385*	Протеин	0.965***	0.476*
	Лизин		0.161	Лизин		0.416*

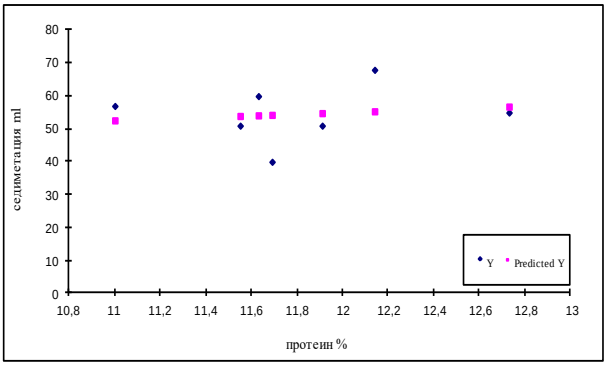
Таблица 25. Корелации между качествените показатели при линиите и стандарти

Година	Линии на кр. 112			Стандарти		
2014		Лизин	Седиментация		Лизин	Седиментация
	Протеин	0.589**	0.597**	Протеин	0.491*	0.383*
	Лизин		0.430*	Лизин		0.486*
2015		Лизин	Седиментация		Лизин	Седиментация
	Протеин	0.223	0.620**	Протеин	0.274	0.655**
	Лизин		0.440*	Лизин		-0.140

Y = 2.9*X + 22.1



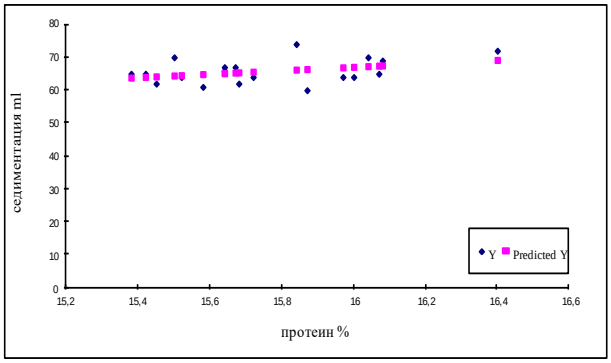
Y = 2.4*X + 26



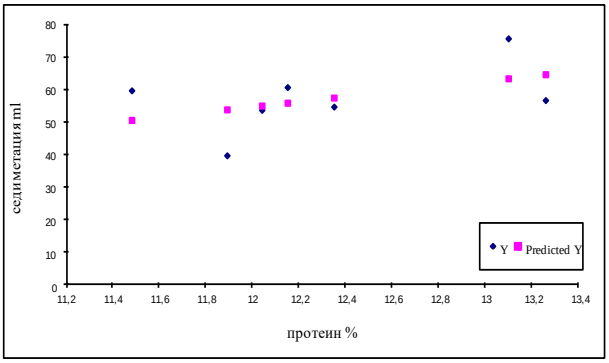
A **B**

Фигура 33. Графичен модел седиментация/протеин при СХП (А) и стандарти (В), 2013 реколтна година

Y = 5.3*X – 17.1



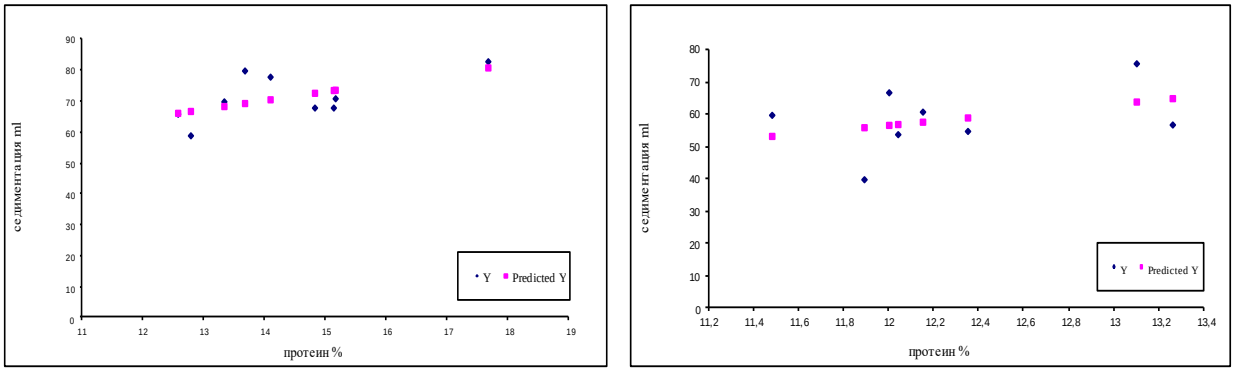
Y = 7.9*X – 39.9



A **B**

Фигура 34. Графичен модел седиментация/протеин при СХП (А) и стандарти (В), 2014 реколтна година

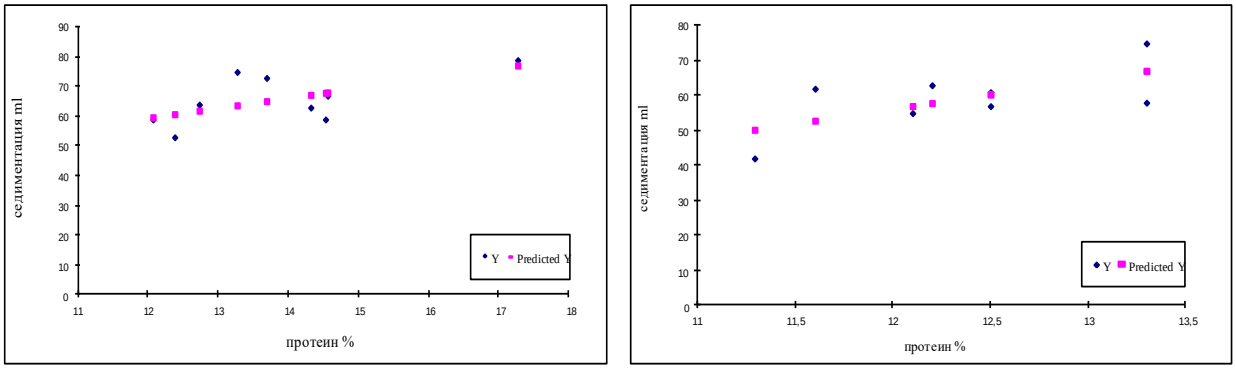
Y = 2.88*X + 30 Y = 6.6*X – 22.2



A **B**

Фигура 35. Графичен модел седиментация/протеин при линии (А) и стандарти (В), 2014 реколтна година

Y = 3.35*X + 19.2 Y = 8.4*X – 44.6



A **B**

Фигура 36. Графичен модел седиментация/протеин при линии (А) и стандарти (В), 2015 реколтна година

Качеството на обикновената пшеница е сложна величина, зависеща от различни фактори. Тя се дефинира като взаимодействие между глутениновия и глиадиновия състав на зърното с факторите на средата (Atanasova et al., 2008; Tsenov et al., 2013). През последните години сме свидетели на изменението в климата на Земята, съпроводено с драстични промени в околната среда, което съществено понижава адаптивния потенциал на съвременните сортове пшеница, а с това и добива и качеството на зърното. Единственият подход, обещаващ добри резултати в бъдеще, е използването на междувидовата и междуродовата хибридизация в съчетание с класическите селекционни методи и средствата на молекулната селекция с цел създаване на нови високопродуктивни, качествени и устойчиви на стресови фактори сортове (Ogbonnaya et al., 2013; Tiwari et al., 2014).

ИЗВОДИ

1. Диплоидните образци от *Aegilops tauschii* (DD), *Aegilops speltoides* (SS), *Dasypyrum villosum* (VV) и тетраплоидните пшеници *Triticum timopheevii* (GGA^uA^u) и *Triticum dicoccum* (BBA^uA^u) притежават нови високомолекулни глутенинови субединици, които отсъстват във вида *Triticum aestivum* L.
2. В *Glu-D1* локуса на синтетичните хексаплоидни пшеници (СХП, геномен състав: BBA^uA^uDD) са идентифицирани нови фракционни двойки: 2+11 (СХП531) и 4+10.1 (СХП530-1 и 530-2), а установената фракционната двойка 1.5+10 е перспективна за изследване на влиянието й върху хлебопекарните качества в близко бъдеще.
3. Експресията на субединици ‘x’ и ‘y’ в геномите на изследваните диплоидни и тетраплоидни видове от подгрупа *Triticinae* и в получените с тяхно участие синтетични пшеници (№69/36, 85/19, $41^к$ и 1dv), е предпоставка за очакван положителен ефект върху хлебопекарните качества на пшеничното брашно.
4. Доказано е високо ниво на полиморфизъм на нискомолекулните глутенини и на глиадините в дивите родственици и в синтетичните форми. Специфичните глиадинови алели и маркерите за добро качество на глутена могат да намерят приложение в селекцията като изходен материал на нови линии с подобрено качество.
5. Високомолекулният фракционен състав на отбрани чрез SDS-PAGE потомства, получени от кръстоски със СХП530 и 532 показва, че те се характеризират с много добър наследствен потенциал за качество, формиран от новите белтъчни субединици 1.1 (*Glu-A1*), 1.5+10 (*Glu-D1*) и 4+10.1 (*Glu-D1*).
6. Наследственият потенциал на нискомолекулните глутенини и глиадини в изследваните кръстоски се характеризира със значително генетично разнообразие, дължащо се на наследяването на бендове от СХП, които не попадат в установената номенклатура за хексаплоидната пшеница.
7. Стабилизирани са девет линии от кръстоска №112 (№38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 и 46) по отношение на вискомолекулния глутенинов състав в BC_1F_7 генерация чрез прилагане на електрофоретичния метод. Ценен признак от селекционна гледна точка е установяването на алели, кодиращи двойката субединици 4+10.1 в локус *Glu-D1*, наследени от СХП530, чийто бащин компонент е диплоидният вид *Aegilops tauschii* (образец 19088).
8. С най-високи стойности на биометричните показатели: дължина на класа, брой класчета в главен клас, брой зърна, маса на зърното в растение и тегло на зърното от главен клас, е линия №42 (родители: Албена, Славея и СХП530), а с най-висока братимост от всички изпитвани материали е линия №39.
9. С потенциал за качество на зърното е линия №46, която е с най-високи стойности на показателите протеин, лизин и седиментация. Голяма е вероятността това да се дължи на гените за високомолекулни глутенини от *Aegilops tauschii*, кодиращи двойката субединици 4+10.1.
10. Средните стойности на суров протеин, лизин и седиментация при СХП и при новополучените линии, са по-високи от тези на стандартите. Установените разлики са добре доказани с помощта на t-тест. Новите фракционни двойки 1.5+10 и 4+10.1, наследени от *Glu-D^t1* локуса на *Aegilops tauschii*, подобряват изследваните качествените показатели.
11. Корелациите, регресионните уравнения и графичните модели доказват, че формирането на суровия протеин, лизина и седиментационното число е под силното въздействие на външните фактори, които доминират над влиянието на наследствения потенциал. Това значително ограничава възможността за точна оценка на ефекта на новите фракционни двойки.

ПРИНОСИ

I. Научно-приложни приноси

1. Научни приноси

1.1. Проведено е комплексно изследване чрез електрофоретични методи на запасните ендоспермови белтъци (ВМГ, НМГ и глиадини) в диви житни (2n=14), в тетраплоидни образци от род *Triticum* (2n=28), както и в синтетични пшеници (2n=42) и техните производни, създадени чрез кръстосване и отбор в хибридни популации.

1.2. Доразвит е модифицираният електрофоретичен метод с добавка на 4М урея (Lafiandra et al., 1993) в допълнение към оригиналния SDS-PAGE метод. Приложен е за разделяне и по-прецизна идентификация на субединици ‘x’ и ‘y’ в геномите A-, S-, V- и G- на диплоидни и тетраплоидни видове, както и в получените с тяхно участие синтетични пшеници (№69/36, 85/19, $41^{к}$ и 1dv).

1.3. Идентифицирани са нови фракционни двойки: 2+11 в СХП531 и 4+10.1 в СХП530-1, 530-2 и 532-3, кодирани от алели, локализирани в *Glu-D^{t}1* на диплоидния вид *Aegilops tauschii*.

1.4. Разработен е оригинален статистически подход, който дава възможност факторите на вариране в синтетичните популации да бъдат преценени с помощта на дискриптивна статистика, t-критерий, корелационен и регресионен анализ и по този начин да се изследва влиянието на високомолекулните глутенинови субединици, наследени от локус *Glu-D^{t}1* на *Aegilops tauschii*.

1.5. Доказан е положителния ефект на новите високомолекулни глутенинови субединици *1D^{t}x*4 и *1D^{t}y*10.1 върху биометричните и някои качествени показатели (протеин, лизин и седиментация) в новополучени линии пшеница от кръстоска №112. Установено е, че СХП32, 106 и 107, носители на фракционната двойка 1.5+10 (алели *ah*) в *Glu-D1*, се характеризират с много добър наследствен потенциал за качество, което напълно потвърждава данните от предишни проучвания.

2. Приложни приноси

2.1. Тетраплоидните образци от *T. dicoccum* (№44961, 45390, 45398 и 45432), *T. turanicum* (№12389), *T. polonicum* и *T. timopheevii* (BGR34176) са носители на маркера за добро качество γ-глиадин 45, кодиран от локус *Gli-B1*. Те следва да се ползват с предимство за създаване на синтетични форми като изходен материал за селекцията на линии с подобрено качество.

2.2. Чрез индивидуален многократен отбор в съчетание с електрофоретичния метод са създадени линии пшеница, носители на нови алели, прехвърлени от синтетичните родители. Новите генотипове показват много добри селекционни качества в малки полски опити и могат да се използват като изходен материал в селекцията.

2.3. Новоселекционираните линии от кръстоска №112 притежават гени за високомолекулни глутенини, кодиращи двойката субединици 4+10.1, и представляват интерес за създаване на сортове с качествено зърно:

- Линия №46 показва най-ниско вариране по маса на зърното в растение и най-високи стойности по протеин, лизин и седиментация. Линията формира растения със средна височина от 103 cm;
- Линия №42 надвишава стандартите по дължина на класа, брой класчета, брой зърна, маса на зърното в растение и тегло на зърното от главен клас; отличава се с малки вариационни коефициенти. Тя е най-продуктивната пшеница в опита;
- Линия №45 се различава от останалите, като дава ниски растения с най-къси главни класове (M=9.3 cm) и неоцветени глуми в жътвена зрялост;
- Линия №39 се характеризира с най-висока братимост от всички изпитвани материали.

Всички линии се характеризират с оптимално висок стъблостой (87-103 cm).

II. Методични приноси

1. За извършване на целенасочен отбор по високомолекулни глутенини, характерни за вида *Aegilops tauschii*, е необходимо да се използва SDS-PAGE със и без добавка на 4М урея в BC_{1-2} генерации, което дава възможност за по-прецизно отчитане на новите белтъчни субединици. От значение за селекцията е фракционирането на запасните протеини да се извършва с половинка от единично зърно, като частта със зародиша служи за възпроизвеждане на желания генотип.

2. Определените скорове на високо- и нискомолекулните субединици, както и общият Glu-скор, дават възможност за оценка на генетичната основа на качеството на новите линии пшеница, селекционирани с участието на синтетични форми.

3. Глиадините са подходящ биохимичен маркер за проучване степента на хомогенност на новите генотипове, както и за тяхното идентифициране. Приложението на този маркер в кръстоски, получени с участието на синтетични пшеници и хибриди (BC_1, BC_2 и др. производни), улеснява отбора и характеристиката на елитни растения с интродуциран генетичен материал от диви житни видове.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Донева С., Спецов П., 2011. Полиморфизъм на глутенини и глиадини в образци на *Aegilops tauschii* (2n=14, DD). Field Crops Studies, vol. VII-2: 243-253.

2. Doneva S., Yordanova D., Daskalova N., Spetsov P., 2014. Allelic variation and composition for seed proteins in synthetic hexaploid wheats (2n=42, BBA^uA^uDD). Turkish Journal of Agricultural and Natural Science, Special Issue: 2, 1891-1896.

3. Daskalova N., Doneva S., Spetsov P., 2016. Chromosome variation and HMW glutenins in synthetic hexaploid wheats (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*/*Aegilops tauschii*). Cereal Research Communications 44 (3), 453-460 (5-year Impact Factor 2015: 0.567).

Characterization of synthetic wheats for seed proteins regarding their potential use as initial materials in breeding

SUMMARY

Several species of subtribe *Triticinae*, twelve synthetic hexaploid wheats (SHW) with their parents and twenty seven hybrid populations originated from crosses between SHW and bread wheat varieties, were investigated for seed proteins.

The diploid species *Aegilops tauschii* (DD), *Aegilops speltoides* (SS), *Dasypyrum villosum* (VV), *Triticum monococcum* (A^bA^b), *Triticum sinskajae* (A^bA^b) along with tetraploid *Triticum timopheevii* (GGA^uA^u) and *Triticum dicoccum* (BBA^uA^u) possessed high molecular weight glutenin subunits (HMW-GSs) coded by novel alleles as compared to those in *Triticum aestivum* L. The investigated synthetic hexaploid wheats (genomes: BBA^uA^uDD) expressed subunits 2+11 (SHW531) and 4+10.1 (SHW530-1, 530-2) at the *Glu-D1* locus, while 1.5+10 seemed as a perspective subunit pair for eventual positive effect on wheat bread making in the future.

The expression of ‘x’ и ‘y’ fractions in the species of *Aegilops* and *Triticum* as well in the developed SHW (№69/36, 85/19, $41^к$ и 1dv) with their participation, might lead to some valuable qualitative traits in terms of end-product quality. High polymorphism of low molecular weight glutenins and gliadins in wild relatives and synthetic wheats was also registered. Specific gliadin alleles and good gluten markers might be useful in breeding for obtaining numerous new lines of common wheat with improved quality. Applying the SDS-PAGE method in crosses with SHW530 and 532, new lines were developed showing high potential for quality: presence of subunits 1.1 (*Glu-A1*), 1.5+10 (*Glu-D1*) and 4+10.1 (*Glu-D1*).

Increased diversity among low molecular weight glutenins and gliadins in some of the hybrid populations was found due to inheritance of fractions from synthetic wheats, which are different from the specified wheat nomenclature for seed proteins. Nine new lines from the cross No.112 (#38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 and 46, BC_1F_7 generation) were homogenized for HMW-GS through electrophoresis. Establishment of subunit pair 4+10.1 at *Glu-D1*, inherited from *Aegilops tauschii* acc.19088 through SHW530, was a valuable attribute for the wheat breeding.

One of the newest lines, No.42 (parents: Albena, Slaveya and SHW530) showed the highest values on spike length, spikelet number per main ear, seed number, grain weight per main ear and per plant. Highest tillering was found in line No.39. Line No.46 produced grain with highest protein, lysine and sedimentation value of its flour. The genes from *Aegilops tauschii* encoding HMW-GS pair 4+10.1 are possible factors for this high quality. Independently, SHW and the selected lines from the cross No.112 generated more quality (crude protein, lysine and sedimentation) than the standard wheat varieties. These differences were well proved by means of the t-test. The novel protein pairs 1.5+10 and 4+10.1, inherited from *Glu-D^t1* locus of *Aegilops tauschii*, led to improved quality traits in wheat.

Correlations, regressions and graphic designs demonstrated the strong environmental influence over the expression of quality parameters. So, the precise estimate for the effects of the established new glutenin subunits on grain quality, became complicated.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

(A), (B): Класове от синтетични хексаплоидни пшеници; (C): Четири представителни класа от СХП107, най-вляво е *T. dicoccum* №45398; (D): Четири представителни класа от СХП32, най-вляво е *T. dicoccum* №45432; (E): Вариране по дължина на класа и брой класчета в СХП106 (отгледани растения при полски условия)

Приложение 2

Глиадинови конфигурации на потомства от кръстоски, получени с участието на СХП

Кръстоски/ потомства	Глиадинови алели			Gli-бендове от СХП
	Gli-A1	*Gli-B1*	*Gli-D1*	
167a-1/3,4,5, 6,7,8	*b*	*b*	*b*	-
167a-3/1,2,3, 4,5,6,7,8	*b*	*b*	*b*	-
167a-4/1,2,3, 4,5,6,7,8	*b*	*b*	*b*	-
167a-5/1,2,3, 4,5,6,7,8	*b*	*b*	*b*	-
167a-6/1,2,3, 4,5,6,7,8	*b*	*b*	*b*	-
167a-1/1,2	*b*	-	*b*	1 до 4 бенда от СХП530 в областта на ω –глиадините
167a-2/1,2,3, 4,5,6,7,8	*b*	-	*b*	-//-
168-1/1,2,3, 4,5	*m*	*b*	*a*	-
168-2/1,2,3, 4,5	*m*	*b*	*a*	-
168-3/1,2,3, 4,5	*m*	*g*	*a*	-
168-6/1,2,3,4	*m*	*g*	*a*	-
168-5/1,2,3,4	*m*	*g*	*b*	-
168-4/1,2,4,5	*m*	*l*	*a*	-
168-7/3	*m*	*l*	*a*	-
168-7/4	*m*	*l*	*f*	-
168a-1/1	*b*	*l*	*b*	-
168a-2/5	*b*	*l*	*b*	-
168a-4/3,4,5	*b*	*l*	*b*	-
168a-6/2,3,5	*b*	*l*	*b*	-
168a-7/2,3, 4,5	*b*	*l*	*b*	-
168a-1/2,3, 4,5	*b*	-	*b*	1 бенд от СХП530 в областта на ω-глиадините
168a-4/1,2	*b*	-	*b*	-//-
168a-6/1	*b*	-	*b*	-//-
168a-7/1	*b*	-	*b*	-//-
168a-3/1,2,3	*m*	*l*	*b*	-
168a-3/4,5	*m*	*l*	*b*	-
177-8/1,2,3,4	*b*	-	*g*	1 бенд от СХП530 в областта на ω-глиадините
177-4/4	*b*	*l*	*g*	-
177-5/2	*b*	*l*	*g*	-
177-6/1,2,3,4	*b*	*l*	*g*	-
177-3/1,2,3,4	*b*	*l*	*b*	-
177-4/1,2	*b*	*l*	*b*	-
177-7/1,2,3,4	*b*	*l*	*b*	-
177-4/3	*b*	*b*	*g*	-
177-5/1,3,4	*b*	*b*	*g*	-
181-1/1,2,3,4	*g*	*g*	*a*	-

181-2/1,2,3,4	*g*	*g*	*a*	-
181-3/1,2,3,4	*g*	*g*	*a*	-
181-5/1,2,3,4	*g*	*g*	*a*	-
181-6/1,2,3,4	*g*	*g*	*a*	-
181-7/1,2,3,4	*g*	*g*	*a*	-
181-8/1,2,3,4	*g*	*g*	*a*	-
181-4/1,4	*m*	*g*	*a*	-
181-4/2,3	*m*	*g*	*f*	-
206б-1/1,2, 3,6	*m*	*l*	*b*	-
206б-2/1,2, 3,5	*m*	*l*	*b*	-
206б-4/2 206б-5/4,5,6	*m*	*l*	*b*	-
206б-3/1,2,3, 4,5,6	*m*	*b*	*b*	-
206б-4/3,4, 5,6	*m*	*b*	*b*	-
206б-5/1,2,3, 4,5,6	*m*	*b*	*b*	-
206б-1/4,5	*g*	*l*	*b*	-
206б-2/4	*g*	*l*	*b*	-
206б-4/1	*g*	*l*	*b*	-
109-1/1,2,3, 4,5	-	*b*	*b*	1 бенд от СХП532 в областта на ω-глиадините
109-2/1	-	*b*	*b*	-//-
109-5/1,2,3, 4,5	*b*	γ_{45}	*b*	4 бенда от СХП532 в областта на ω-глиадините
109-2/2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
109-3/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
109-4/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
109-7/2,3,4,5	*b*	*b*	*b*	-
109-6/1,2,3, 4,5	*b*	*g*	*b*	-
110-2/1,2,3, 4,5,6,7,8	*b*	*b*	*b*	-
110-2/6	*b*	*b*	*b*	-
110-3/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	γ_{45}	-	2 бенда от СХП532 в областта на ω-глиадините
110-4/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	γ_{45}	-	-//-
110-1/1,2,3, 4,5,6,7,8	*f*	*b*, γ_{45}	*b*	-
110-3/6,9	-	*b*, γ_{45}	-	2 бенда от СХП532 в областта на ω-глиадините
110-4/2,3,4	-	*b*, γ_{45}	-	-//-
111-1/1,2,3, 4,5	*m*	*e*	*b*	-
111-2/1,2,3, 4,5	*m*	*e*	*b*	-
111-3/1,2,3,	*r*	*e*	*b*	-

4,5				
111-4/1,2,3, 4,5	*r*	*e*	*b*	-
111-5/1,2,3, 4,5	*c*	*b*	-	4 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
112-1/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	*b*	*b*	-
112-2/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	*b*	*b*	-
112-3/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	*b*	*b*	-
112-4/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	*b*	*b*	-
112-5/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	*b*	*b*	-
115-1/4,5,6	*o*	*b*	*b*	-
115-2/1,3,4,6	*o*	*b*	*b*	-
115-3/1,2,3, 4,5,6	*o*	*b*	*b*	-
115-4/1,2,3,5	*r*	*b*	*b*	-
115-4/4,6	*m*	*b*	*b*	-
118-5/1,2,3, 5,6,7,8	*b*	*b*	*b*	от 2 до 3 бенда от СХП530 в областта на ω –глиадините
118-3/1,2,3, 4,5,7,8	*b*	*b*	*b*	-//-
118-4/4,5,7	*b*	*b*	*b*	-//-
118-3/6,9,10	*b*	*b*	*b*	-//-
				от 3 до 5 бенда от СХП530 в областта на ω –глиадините
118-1/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	-	*b*	-//-
118-2/5,7,8,9	*b*	-	*b*	2 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
118-6/1,3,6, 9,10	*b*	*l*	-	-//-
118-7/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	*l*	-	-//-
118-8/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	*l*	-	-//-
118-9/2,5,10	*b*	*l*	-	-//-
118-10/5	*b*	*l*	-	-//-
118-11/1,2,3, 4,5,6,7,8,9,10	*b*	*l*	-	-//-
				2 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
118-10/1	*b*	*b*	-	-//-
118-9/1,3	*b*	*b*	-	целият глиадинов спектър е наследен от СХП530
118-5/4	-	γ_{45}	-	
119-1/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
119-3/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
119-4/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
119-2/2,3,4,5	*b*	*l*	*b*	-
119-5/1,2,3, 4,5	*b*	*l*	*b*	-
121-1/1,2,3,4	*b*	*b*	*b*	-
121-4/2	*b*	*b*	*b*	-

121-5/1,2,3,4	*b*	*b*	*b*	от 2 до5 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
121-6/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-//-
121-7/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-//-
121-8/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-//-
121-9/2	*b*	*b*	*b*	-//-
121-10/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
121-3/1,2,3,4	*b*	*l*	*b*	
125-1/1,2,3, 4,5	*b*	*l*	*a*	2 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
125-2/1,2,3, 4,5	-	*l*	*a*	1 бенд от СХП530 в областта на ω-глиадините
125-3/1,2,3, 4,5				
125-4/1,2,3, 4,5	*b*	*l*	-	3 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
125-5/1,2,3, 4,5	-	*l*	-	5 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
125-6/1,2,3, 4,5	-	*l*	-	-//-
125-7/1,2,3, 4,5	-	*l*	-	-//-
134-1/1,2,3, 4,5	*m*	-	*a*	от 1 до 2 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините -//-
134-2/1,2,3, 4,5	*m*	-	*a*	-//-
134-3/1,2,3,4	*m*	-	*a*	-//-
134-4/1,3,4,5	*m*	-	*a*	-//-
134-5/1,2,3, 4,5	*m*	-	*a*	
143-7/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*g*	- -
143-1/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
143-2/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
143-3/4,5	*b*	*b*	*b*	-
143-4/1,2,3	*b*	*b*	*b*	-
143-5/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
143-6/1,2,3, 4,5	*b*	*b*	*b*	-
149-1/1,2,3, 4,5	*b*	-	*h*	от 2 до 4 бенда от СХП532 в областта на ω-глиадините -//-
149-6/1,2,3, 4,5	*b*	-	*h*	-
149-2/1,2,3, 4,5	*b*	*g*	*h*	
155-5/1,2,3, 4,5	*r*	*g*	*b*	- -
155-1/1,2,4,5	*r*	*b*	*b*	-
155-2/2,3	*r*	*b*	*b*	-
155-3/1,2,3, 4,5	*r*	*b*	*b*	-
155-4/1,2,3,	*r*	*b*	*b*	

4,5				-
155-7/1,2,3, 4,5	*r*	*b*	*b*	-
155-8/1	*r*	*b*	*b*	-
155-9/1,2,3, 4,5	*r*	*b*	*b*	-
155-10/1,2,3, 4,5	*r*	*b*	*b*	-
155-8/2	*b*	*b*	*b*	
92-3/1,2,3, 4,5,6	*b*	*l*	*b*	-
92-4/1,2,3, 4,5,6	*b*	*l*	*b*	-
92-5/1,2,3, 4,5,6	*b*	*l*	*b*	-
92-6/4	*m*	*l*	*b*	-
92-2/1,3,4, 5,6	*b*	γ_{45}	*b*	3 бенда от СХП530 в областта на ω-глиадините
95-1/1,5,6	*m*	*l*	*h*	-
95-1/2	*m*	*l*	*b*	-
95-2/3	*m*	*l*	*b*	-
95-2/2	*m*	*b*, γ_{45}	*b*	
95-4/4,5	*b*	*b*	*b*	1 бенд от СХП532 в областта на ω-глиадините
95-3/2	*b*	*l*	*a*	от 1 до 4 бенда от СХП532 в областта на ω-глиадините
95-6/4,5,6	*b*	*l*	*a*	
57-1/1,2,3, 4,5	*b*	-	*b*	бендове от СХП 83/27 в областта на ω-глиадините
57-2/1,2,3, 4,5	*b*	-	*b*	-//-
57-3/1,2,3,4	*b*	-	*b*	-//-
57-4/1,2,3, 4,5	*b*	-	*b*	-//-
57-5/1,2,3, 4,5	*b*	-	*b*	-//-
57-6/1,2,3, 4,5	*b*	-	*b*	-//-
57-7/1,2,3, 4,5	*b*	-	*b*	-//-

Приложение 3

Високомолекулен глутенинов състав на зърна (BC_2F_2 генерация) от отбрани класове на кръстоски: №136, №166, №168, №168а, №177 и №181

Родители / кръстоска	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
Корона - родител	null	7+8	2+12
Полена - родител	2*	7+9	5+10
Аглика - родител	2*	7+9	5+10
530-4-0 C_1-родител от $72F_1$	1.1	13+16	1.5+10
Кр.128-1/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+9	5+10
Кр.128-2/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	null	7+9	1.5+10
Кр.128-3/1,2,3,5	null	7+9	1.5+10
Кр.128-3/4	2*	7+9	5+10
Кр.128-3/6,7,8,9,10	null	7+9	5+10/1.5+10
Кр.128-4/1,3,4	null	7+9	1.5+10
Кр.128-4/2	null	7+9	5+10/1.5+10
Кр.128-4/5	2*	7+9	1.5+10
Кр.128-4/6,7,8,9,10	2*	7+9	5+10
Кр.128-6/1,2,3,4	null	7+9	2+12
Кр.128-6/5,6,7,10	null	7+9	1.5+10
Кр.128-6/8,9	1.1	7+9	5+10
Кристора-родител	1	7+9	2+12
Полена-родител	2*	7+9	5+10
Аглика-родител	2*	7+9	5+10
530-4-0 C_1-родител от $74F_1$	1.1	13+16	1.5+10
Кр.136-7/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1	7+9	5+10
Полена-родител	2*	7+9	5+10
Аглика-родител	2*	7+9	5+10
Тодора-родител	1	7+9	2+12
530-4-0 C_1-родител	1.1	13+16	1.5+10
166-1/1,2	1	7+9/13+16	1.5+10
166-1/3,4,5,6,7,8,9,10	1	13+16	1.5+10
166-2/1,4,7,8,9,10	1	7+9	5+10
166-2/2,3,5,6	1	7+9/13+16	5+10
166-3/1,7	1	7+9/13+16	5+10
166-3/2,8,9,10	1	13+16	5+10
166-3/3,6	1/1.1	7+9/13+16	5+10
166-3/4	1/1.1	13+16	5+10
166-3/5	1/1.1	7+9	5+10
166-4/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	13+16/9	5+10
166-5/1,6,9,10	2*	7+9	5+10
166-5/2,3	2*/1	7+9	5+10
166-5/4,7	1	7+9	2+12
166-5/5,8	2*	7+9	2+12
166-6/1,3,4	2*/1	7+9/13+16	5+10
166-6/2,6,9	2*	7+9/13+16	5+10
166-6/5,7,8,10	1	7+9	5+10
166-7/1,6,7	1	7+9	2+12
166-7/2,3,4,9	2*/1	7+9	2+12
166-7/5,8,10	1	7+9	5+10
166-8/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+9	5+10
166-9/1,3,5,6,8,10	1	7+9	2+12
166-9/2,4,7,9	2*	7+9	2+12
Родители / кръстоска	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
Славея-родител	2*	7+9	5+10
Енола-родител	1	7+9	5+10
Кристора-родител	1	7+9	2+12
530-4-0 C_1-родител от $74F_1$	1.1	13+16	1.5+10
168-1/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1.1	13+16	1.5+10
168-2/1,2,3	1.1	13+16	1.5+10
168-2/4,5,6,7,8,9,10	1.1	7+9	1.5+10

168-3/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+9	5+10
168-4/1,2,4,5,6,7	1	7+9	5+10
168-4/3,8,9,10	2*	7+9	5+10
168-5/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+9	2+12
168-6/1,2	1	7+9/13+16	1.5+10
168-6/3,4,5,6,7,8,9,10	1	13+16	1.5+10
168-7/1	2*/1.1	7+9	5+10
168-7/2,10	1.1	7+9	5+10
168-7/3,9	2*	7+9	5+10
168-7/4,5,6,7,8	1.1	7+9	1.5+10
Родители / кръстоска	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
Славея-родител	2*	7+9	5+10
Енола-родител	1	7+9	5+10
530-4-0 C_1-родител от $74F_1$	1.1	13+16	1.5+10
168a-1/1,2,3,4,6,7,8	1.1	7+9	1.5+10
168a-1/5,9,10	1	7+9	5+10
168a-2/1,2,3,4,7,10	1.1	13+16	1.5+10
168a-2/5,6,8,9	1.1	7+9/13+16	1.5+10
168a-3/1,7	1	7+9	5+10
168a-3/2,3	1/1.1	7+9	5+10/1.5+10
168a-3/4,10	1	7+9	1.5+10
168a-3/5,6,8,9	1	7+9	5+10/1.5+10
168a-4/1,2,6,10	1.1	13+16	1.5+10
168a-4/3,4,7,8,9	1	7+9	2+12
168a-4/5	1	7+9/13+16	1.5+10
168a-5/1,5,7	2*/1.1	13+16	1.5+10
168a-5/2,9,10	2*	13+16	1.5+10
168a-5/3,4,6,8	1.1	13+16	1.5+10
168a-6/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	13+16	1.5+10
168a-7/1,4,5,8,9,10	2*	7+9/13+16	1.5+10
168a-7/2,3,6,7	2*	7+9	5+10
Родители / кръстоска	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
Енола-родител	1	7+9	5+10
Перла-2-родител	null	7+8	5+10
Аглика-родител	2*	7+9	5+10
530-4-0 C_1-родител от $90F_1$	1.1	13+16	1.5+10
177-1/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1	7+9	5+10
177-2/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1/2*	13+16	1.5+10
177-3/1,5,8	1/2*	7+9	5+10
177-3/2,6,10	1/2*	7+9/13+16	5+10
177-3/3,7	1	7+9/13+16	5+10
177-3/4,9	1	7+9	5+10
177-4/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+9	5+10
177-5/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	7+9	5+10
177-6/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1	7+9	5+10
177-7/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	2*	13+16	5+10
177-8/1,6,7,9	1	13+16	5+10
177-8/2,3,4,5,8,10	1.1	13+16	1.5+10
Родители / кръстоска	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
Аглика-родител	2*	7+9	5+10
Кристора-родител	1	7+9	2+12
Алана-родител	null	7+8	5+10
532-1-4 C_1-родител от $98F_1$	1.1	13+16	1.5+10
181-1/1,2,3,6,9,10	1.1	7+9	1.5+10
181-1/4,5,7,8	null	7+9	1.5+10
181-2/1,2,3,5,8,9	1.1	7+9	1.5+10
181-2/4,6,7,10	null	7+9	1.5+10
181-3/1,5,7	1.1	7+9	2+12
181-3/2,8,9,10	1.1	7+9	1.5+10
181-3/3,4,6	1.1	7+9	2+12/1.5+10
181-4/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1.1	7+9	2+12
181-5/1,5,7	1	7+9	5+10

181-5/2,8	1	7+9	2+12
181-5/3,9,10	null	7+9	2+12
181-5/4,6	1	7+9	2+12/5+10
181-6/1,5,10	null	7+9	2+12
181-6/2,3,4,6,7,8,9	null	7+9	2+12/1.5+10
181-7/1,2,3,5,8,10	1.1	7+9	1.5+10
181-7/4,6,7,9	null	7+9	1.5+10
181-8/1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1	7+9	2+12

Глутенинов алелен състав на потомства от кръстоски: №128, №136, №166, №168, №168а, №177 и №181 (BC_2F_3) през 2015 реколтна година

Линия №, кръст.	*Glu-A1*	*Glu-B1*	*Glu-D1*
128-4-5/1,2,3,4,5	2*	7+9	5+10
136-1-4/1,2,3,5	2*/1.1	7+9	2+12
136-1-4/4	2*	7+9	2+12
136-4-8/1,2,3,4,5	2*	13+16	1.5+10/5+10
136-5-4/1,2,3,4,5	1	7+9	5+10
136-5-7/1,2,3,4,5	1	7+9	5+10
136-6-1/1,2,3,4,5	2*	13+16	5+10
136-6-5/1,2,3,4,5	2*	13+16	5+10
136-7-1/1,2,3,4,5	1	7+9	5+10
166-1-1/1,2,3,4,5	1	13+16	5+10
166-1-2/1,2,3,4,5	1.1	13+16	5+10
166-1-3/1,2,3,4,5	1.1	13+16	5+10
166-1-4/1,2,3,4,5	1.1	13+16	5+10
166-1-5/1,2,3,4,5	1.1	13+16	5+10
168-1-1/1,4,5	1	13+16	1.5+10
168-1-1/2,3	2*	13+16	1.5+10
168-1-2/1,2,3,4,5	2*	13+16	1.5+10
168-1-3/1,2,3,4	2*/1	13+16	1.5+10
168-1-3/5	2*	13+16	1.5+10
168-1-4/1,2,3,4,5	1	13+16	1.5+10
168-7-4/1,4	2*	7+9	1.5+10
168-7-4/2,3,5	2*	7+9	5+10
168a-5-2/1,2,3,4,5	2*	13+16	5+10
168a-5-3/1,2,3,4,5	1.1	13+16	5+10
168a-5-4/1,2,3,4,5	2*	13+16	5+10
168a-6-1/1,2,5	2*/1	13+16	5+10/1.5+10
168a-6-1/3	1	13+16	5+10
168a-6-1/4	2*	13+16	5+10
168a-6-4/1,2,3,4,5	2*	13+16	5+10
177-8-1/1,3,5	1	13+16	5+10/1.5+10
177-8-1/2,4	1	13+16	5+10

Приложение 4

Отбрани и стабилизирани линии от кръстоска №112

A

СР-4 № 38 № 39 № 40 № 41

B

СР-4 № 42 № 43 № 44 № 45 № 46