

УДК 577.21:633.111.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА НМW ГЛЮТЕНИНОВ У СОРТООБРАЗЦОВ ИЗ КОЛЛЕКЦИОННЫХ И СЕЛЕКЦИОННЫХ ПИТОМНИКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Е.А. Фомина¹, С.Н. Куликович², кандидат с.-х. наук,
С.В. Малышев¹, О.Ю. Урбанович¹, кандидат биол. наук

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси

²Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию

(Поступила 25.09.2014 г.)

Аннотация. Проведен анализ полиморфизма генов, контролирующих синтез запасных белков семян – глютеинов *Glu-A1x*, *Glu-B1x* и *Glu-B1y*, *Glu-D1x* и *Glu-D1y* в 45 сортообразцах озимой пшеницы. Оценены вероятные хлебопекарные качества исследованных линий. Результаты тестирования образцов пшеницы белорусской селекции показали, что среди них высока доля аллелей *Glu-A1* и *Glu-B1* локусов, негативно влияющих на хлебопекарные качества, и аллеля *d* локуса *Glu-D1*, вносящего положительный вклад в качество производимой муки. В результате проведенного исследования выделены генотипы, содержащие благоприятные комбинации аллелей высокомолекулярных глютеинов. Выявлено 4 сортообразца с максимальными показателями хлебопекарных качеств (10 баллов). Наиболее низкая суммарная хлебопекарная оценка была у сортообразцов, где в качестве родительских форм были использованы только сорта западноевропейской селекции *STH 729*, *STH 735*, *Кубус*, *Kriss*, *STH 583*, *STH 1198*, *Контур*, *Корнет*, а также сортов белорусской селекции с низкими хлебопекарными качествами *Щара* и *Гармония*.

Введение. Одной из важнейших культур, которая решает проблему обеспечения населения продовольствием, является пшеница. Ежегодно посевные площади под данной культурой возрастают. Так, если в 2007 г. посевная площадь озимой пшеницы составляла 235,6 тыс. га, то за пять лет она выросла более чем в два раза и составила 468,1 тыс. га в 2011 г. и 529,9 тыс. га – в 2013 г. [1]. Селекционерами ведется планомерная работа по созданию новых сортов озимой пшеницы с высоким потенциалом урожайности и хорошими хлебопекарными качествами, адаптированных к почвенно-климатическим условиям Республики Беларусь [2]. Создание нового сорта – длительный и трудоемкий процесс.

Поиск и выделение источников генов, наиболее эффективно контролируемых полезными признаками, в традиционной селекции зерновых культур проводится путем изучения исходного материала в полевых коллекциях, включения его в тестерные, анализирующие и др. виды скрещиваний и, как правило, занимает от четырех до шести лет. Одним из путей сокращения сроков создания сортов является использование в селекционном процессе достижений молекулярной генетики. Применение современных методов изучения исходного материала с использованием ДНК-технологий позволяет с достаточной степенью достоверности выделить среди имеющихся образцов те, которые несут целевой ген, и, таким образом, сократить период поиска до месяцев при существенном увеличении объемов исследуемого материала и сокращении трудовых затрат, а также позволит контролировать передачу и закрепление генов в новом исходном материале.

Одним из важнейших признаков, по которым ведется селекционный процесс, является хлебопекарное качество пшеницы. Большой вклад в него вносят гидрофобные запасные белки семян глютеины. От состава глютеинов зависит эластичность и вязкость теста, из которого выпекают мучные изделия. Глютеины состоят из двух субъединиц: высокомолекулярной и низкомолекулярной. Эта классификация основана на подвижности субъединиц в полиакриламидном геле при проведении электрофореза [3]. Высокомолекулярные субъединицы глютеинов играют главную роль в определении вязко-эластичных свойств, придаваемых пшеничной мукой тесту. Структура глютеинов кодируется генами *Glu-1* локусов, которые расположены на длинном плече хромосом первой группы. В каждом локусе (*Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1*) расположены два близко сцепленных гена: х- и у-типа. Ген х-типа определяет структуру высокомолекулярных субъединиц с большей молекулярной массой, а ген у-типа – с меньшей. У гексаплоидной пшеницы гены у-типа в геноме А обычно не экспрессируются [3, 4]. Высокомолекулярные субъединицы, судя по их подвижности в полиакриламидном геле, имеют массу в пределах 80-130 кДа, хотя их настоящая молекулярная масса, исходя из аминокислотного состава, находится в пределах 60-90 кДа. Они содержат уникальные N- и C-концевые домены и большой повторяющийся центральный домен, обогащенный остатками глицина, пролина и глутамина. Межмолекулярные дисульфидные мостики между сульфгидрильными группами остатков цистеина, содержащимися в N- и C-концевых доменах, играют главную роль в образовании глютеинового макрополимера [3]. Разнообразие аллелей, определяющих аминокислотный состав больших субъединиц, является одним из главных факторов, определяющих качество муки, производимого из того или иного сорта пшеницы.

В *Glu-A1* локусе обнаружено три аллеля: *Glu-A1a* (Ax1), *Glu-A1b* (Ax2*) и *Glu-A1c* (Axnull). Было показано, что Ax1 и Ax2* субъединицы оказывают положительное влияние на качество теста, а Axnull субъединица – отрицательное [4, 5].

Glu-B1 локус, в свою очередь, состоит из гена x-типа и сцепленного с ним гена y-типа. Этот локус более полиморфен. В нем выявлены следующие аллели: *Glu-B1ak* (Bx7*+By8*), *Glu-B1b* (Bx7+By8), *Glu-B1c* (Bx7*+By9), *Glu-B1d* (Bx6+By8), *Glu-B1e* (Bx20), *Glu-B1f* (Bx13+By16), *Glu-B1h* (Bx14+By15), *Glu-B1i* (Bx17+By18) и *Glu-B1u* (Bx7*+By8) и др. Аллели *Glu-B1d* (Bx6+By8) и *Glu-B1e* (Bx20) оказывают отрицательное влияние на качество теста. Тесто самого высокого качества получается из муки, для получения которой используются сорта пшеницы, содержащие Bx7 субъединицу [4].

Аллельный состав *Glu-D1* локуса оказывает основное влияние на упругость теста. Мука из пшеницы, содержащей *d* аллель (Dx5 и сцепленную с ним Dy10 субъединицу), образует более упругое тесто, чем мука из пшеницы, содержащей «a» аллель (Dx2 и Dy12 субъединицы). Как предполагают, это усиление упругости связано с присутствием дополнительных цистеиновых остатков в повторяющемся домене Dx5 субъединицы [3, 6]. Полиморфизм нуклеотидов, связанный с присутствием дополнительных цистеиновых остатков в Dx5 субъединице недалеко от начала центрального повторяющегося домена, был использован для создания ДНК маркеров [3]. Также в Dx5 субъединице, а точнее по обоим концам ее повторного домена, были обнаружены делеции из шести аминокислотных остатков, между которыми располагается инсерция из двенадцати аминокислотных остатков. В субъединице Dy10 тоже была выявлена делеция из шести аминокислотных остатков. Для выявления данных делеций были созданы маркеры [7].

Материалы и методы исследования. Для анализа аллельной композиции глютенинов обычно используется метод SDS полиакриламидного гель-электрофореза. Однако этот метод не обладает достаточной разрешающей силой, чтобы достоверно различить все аллели высокомолекулярных глютенинов (HMW), что снижает его ценность для селекционного процесса [3]. В представленном исследовании для определения аллельного состава HMW мы применили метод ПЦР-диагностики на основе ДНК-маркеров, который позволяет специфично амплифицировать отдельные наиболее ценные аллели локуса *Glu-1*. Такое тестирование можно проводить на начальных этапах селекционного процесса, используя для анализа фрагмент листа растения. Целью проведенной работы была оценка потенциала хлебопекарных качеств селекционного материала озимой пшеницы. Было исследовано 45 селекционных образ-

цов озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), полученных от различных комбинаций скрещивания в Научно-практическом центре НАН Беларуси по земледелию (г. Жодино).

ДНК выделяли из индивидуальных зерновок согласно методике, описанной Plaschke и др. [4]. Для идентификации генов *Glu-A1*, *Glu-B1* и *Glu-D1* использовали олигонуклеотидные праймеры, отобранные на основании литературных данных, чья эффективность была подтверждена собственными экспериментами [3-10]. В общей сложности для тестирования использовано 11 молекулярных маркеров различного типа.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 12,5 мкл включала 50 нг ДНК, 250 нМ каждого праймера (Праймтех), 200 нМ dNTP, 1,5 мМ MgCl₂, 1x PCR буфер «А» (Праймтех), 1 ед. Taq полимеразы (Праймтех). Реакцию проводили в амплификаторе iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) по программе: 5 мин 94 °С, 35 циклов 30 сек 94 °С, 30 сек 55 °С, 1 мин 72 °С и затем 5 мин 72 °С. Продукты амплификации разделяли в 1,5-2,0% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, или 6% акриламидном геле.

Суммарный индекс хлебопекарного качества вычисляли согласно Payne et al. 1997 [11].

Результаты и их обсуждение. Исследованию подвергались аллели глутенинов А, В и D генома селекционных линий гексаплоидной пшеницы. В геноме тестируемых образцов были представлены 3 аллели *Glu-A1* локуса хромосомы 1А (*a*, *b* и *c*), 6 аллелей *Glu-B1* локуса хромосомы 1В (*a*, *c*, *d*, *e*, *i*, *f* и *ak*), две аллели локуса *Glu-D1* хромосомы 1D (*a* и *d*).

В локусе *Glu-A1* аллель *b* была наиболее редкой (таблица). Она представлена у 2 сортообразцов (4,4%). При создании данных сортообразцов были использованы различные родительские формы: Капылянка, Спектр, Московский карлик и Weneda. У сортообразца, где в качестве родительских форм использовались сорта Капылянка и Корнет, локус *Glu-A1* был гетерозиготен. Аллель *a* была обнаружена в геноме 12 сортообразцов (26,6%), в двух из которых наблюдается также аллель *c*. Большая часть образцов (66,7%) содержала аллель *c*, которая оказывает негативное влияние на хлебопекарные качества зерна.

Максимальным разнообразием аллелей характеризовался локус *Glu-B1*. В нем представлены 6 аллелей – *c*, *d*, *e*, *f*, *i* и *ak*, а также их комбинация. При этом 38 образцов содержат аллели, вклад которых в показатели качества муки составляет 1-2 балла из 3 возможных. В геноме 15,6% сортообразцов представлены аллели, вносящие максимальный вклад в хлебопекарные качества пшеницы. При этом следует отметить, что во всех сортообразцах, имеющих в своем геноме аллели *ak* и *i*, в качестве родительских форм были или белорусский сорт Капылянка, или

Таблица – Распределение образцов пшеницы по составу HMW глютелинов

Аллель	Белковая формула	Оценка качества	Количество, шт.	Доля, %
А геном, локус <i>Glu-A1</i>				
<i>a</i>	1	3	10	22,2
<i>b</i>	2*	3	2	4,4
<i>c</i>	null	1	30	66,7
<i>a/c</i>	1/null	2	2	4,4
<i>b/c</i>	2*/null	2	1	2,2
В геном, локус <i>Glu-B1</i>				
<i>c</i>	7*+9	2	17	37,8
<i>d</i>	6+8*	1	13	28,9
<i>e</i>	20	1	1	2,2
<i>f</i>	13+16	3	3	6,7
<i>i</i>	17+18	3	1	2,2
<i>ak</i>	7*+8*	3	3	6,7
<i>d/c</i>	6+8*/7*+9	1,5	4	8,9
<i>d/ak</i>	6+8*/7*+8*	2	3	6,7
Д геном, локус <i>Glu-D1</i>				
<i>a</i>	2+12	2	10	22,2
<i>d</i>	5+10	4	33	73,3
<i>a/d</i>	5+10/2+12	-	2	4,4

польские сорта STN 254, STN583 и STN 1198, в то время как аллель *f* была выявлена у гибридной комбинации с участием сортов немецкой и английской селекции (Крисс и Кубус), а также у двух линий сложного отдаленного гибрида, где в качестве родительских форм были использованы сорта озимой и яровой пшеницы, а также озимого тритикале.

В локусе *Glu-D1* среди тестируемых образцов аллели распределились следующим образом. Аллель *a*, оказывающая негативное влияние на хлебопекарные качества пшеницы, представлена у 22,2% образцов. В основном это гибридные комбинации, у которых в качестве материнской формы были использованы сорта западноевропейской селекции Кубус, Бригадир, Бизон, Корнет и Контур. Гетерозиготными по составу аллелей оказались 2 образца. Большая часть селекционных образцов (73,3%) содержала аллель *d*, способствующую большей упругости теста. Следует отметить, что данная аллель содержалась и у двух линий

сложного отдаленного гибрида, где в качестве родительских форм были использованы сорта озимой и яровой пшеницы, а также озимого трикале.

Следует отметить, что по литературным данным селекция на субъединицу 5+10 наиболее часто используется в мире [11, 12]. В частности, количество генотипов, в которых представлена субъединица 5+10, среди сортов и линий гексаплоидной пшеницы в Эфиопии составило 73% [13]. В то же время среди выборки русских и украинских сортов и линий доля аллели *d* была ниже у яровой пшеницы (52,7%), а у озимой составила 94,7% [14]. Среди чешских сортов озимой пшеницы 66% имели в составе D генома аллель *d* [15]. Считается, что наибольший вклад в качество производимой муки вносит аллельный состав именно *Glu-D1* локуса. Поэтому при равных баллах преимущество, вероятнее всего, будет иметь тот сорт (или линия), в геноме которого содержится *Glu-D1d* аллель.

Исходя из литературных данных можно прогнозировать, что чем выше суммарная оценка того или иного образца, тем более высокими хлебопекарными качествами он обладает [16, 17]. В представленном исследовании при том, что у 73,3% образцов встречается благоприятное сочетание аллелей D генома, общее количество образцов с суммарной оценкой хлебопекарных качеств 7-10 баллов было равно 53,3%. Среди селекционных образцов, подвергшихся анализу, наблюдается значительный негативный вклад аллелей A и B генома. В частности, у 30 сортообразцов (66,7%) вклад A генома в общую оценку качества муки составил всего 1 балл. При этом у 13 из них вклад B генома также был равен 1. Основной негативный эффект на суммарную оценку оказывало наличие аллелей *Glu-A1c* и *Glu-B1d* и особенно их совместное присутствие. Как следствие, несмотря на то, что значительная часть данных образцов содержала благоприятные аллели D генома, суммарная оценка предполагаемого качества муки ряда образцов оказалась невысокой. Столь низкая суммарная хлебопекарная оценка была у сортообразцов, где в качестве родительских форм были использованы только сорта западноевропейской селекции: STN 729, STN 735, Кубус, Kriss, STN 583, STN 1198, Контур, Корнет, а также сорта белорусской селекции с низкими хлебопекарными качествами Щара и Гармония.

Проведенными исследованиями установлено, что при создании сортов озимой пшеницы с высокими хлебопекарными качествами необходимо учитывать не только аллели D генома, но и возможные комбинации аллелей *Glu-A1* и *Glu-B1* локусов, которые наследуются как от материнских, так и от отцовских форм.

Анализ суммарного эффекта состава глютеенинов на хлебопекарные качества (рисунок) показывает, что 26,7% сортообразцов пшеницы имеют хороший хлебопекарный потенциал с общей оценкой 8-10 баллов. При этом выявлено 4 сортообразца с максимальными показателями хлебопекарной оценки (10 баллов). Два из них – линии сложного отдаленного гибрида, где в качестве родительских форм использованы сорта озимой и яровой пшеницы, а также озимого тритикале, а у двух других в качестве отцовской формы был использован сорт польской селекции STH-254.

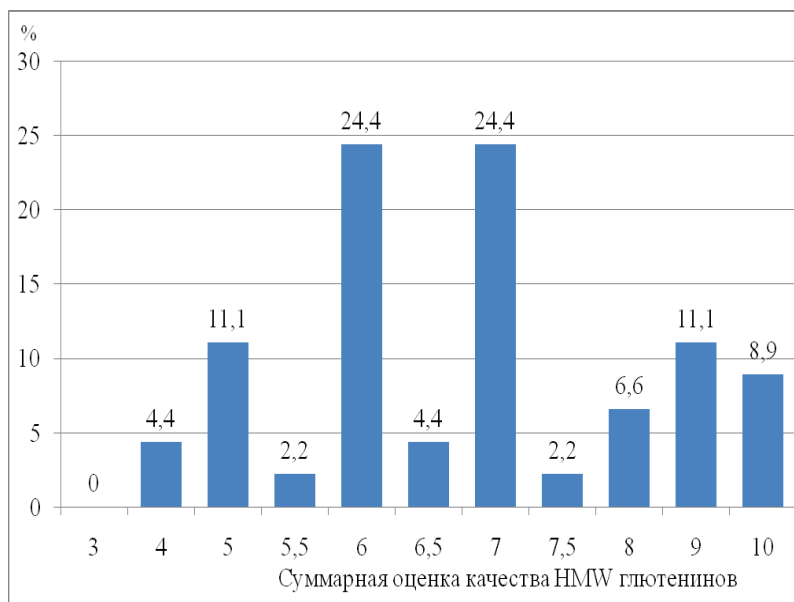


Рисунок 1 – Распределение образцов пшеницы по суммарной оценке качества, полученной на основании изучения состава НМВ глютеинов

Достаточно высокий показатель хлебопекарных качеств, равный 9, наблюдался у 5 сортообразцов, полученных от различных комбинаций скрещивания. Во всех этих сортообразцах снижение этого показателя происходило за счет аллелей локуса *Glu-B1*. Наиболее низкий суммарный показатель хлебопекарных качеств, равный 4 баллам, был у сортообразцов, полученных от комбинации скрещивания сортов Контур и Щара.

Анализ сортообразующей способности сортов как источников высоких хлебопекарных качеств показал, что наиболее высокий средний

суммарный балл, равный 8,5, наблюдался в гибридных комбинациях с участием сорта Спектр. Такие же высокие значения признака были и у сорта Капылянка – 8,3 балла. Кроме того, следует отметить, что сорт Капылянка имеет максимально благоприятное сочетание аллелей глютелинов во всех трех локусах (*Glu-A1* – *b*, *Glu-B1* – *ak* и *Glu-D1* – *d*). Поэтому данный сорт может использоваться в качестве донора аллелей, положительно влияющих на хлебопекарные качества пшеницы.

Следует отметить, что коэффициент корреляции между аллельным составом глютелинов, количеством белка и клейковины среди исследованных сортообразцов пшеницы низкий (*Glu1*/Белок $r=0,24$, *Glu1*/Клейковина $r=0,26$). Это обусловлено тем, что эти признаки контролируются разными генами и их влияние друг на друга не велико, в то время как коэффициент корреляции между содержанием белка и клейковины достоверно высокий ($r=0,84$).

Заключение

Использование молекулярных маркеров позволило достаточно точно определить состав глютелинов в сортообразцах озимой пшеницы различного генетического происхождения и прогнозировать их хлебопекарные качества. Результаты тестирования образцов пшеницы белорусской селекции показали, что среди них высока доля аллелей *Glu-A1* и *Glu-B1* локусов, негативно влияющих на хлебопекарные качества, и аллеля *d* локуса *Glu-D1*, вносящего положительный вклад в качество производимой муки. В целом среди протестированных сортообразцов чаще всего встречался генотип *Glu-A1c*, *Glu-B1d*, *Glu-D1d* (17,8%) с общей суммарной оценкой хлебопекарных качеств 6 баллов и генотип *Glu-A1c*, *Glu-B1c*, *Glu-D1d* (15,6%) с общей суммарной оценкой 7 баллов.

Выявлено 4 сортообразца с максимальными показателями хлебопекарной оценки (10 баллов). Два из них – линии сложного отдаленного гибрида, где в качестве родительских форм были использованы сорта озимой и яровой пшеницы, а также озимого тритикале, а у двух других в качестве отцовской формы был использован сорт польской селекции СТН-254.

Наиболее низкая суммарная хлебопекарная оценка была у сортообразцов, где в качестве родительских форм были использованы только сорта западноевропейской селекции: СТН 729, СТН 735, Кубус, Kriss, СТН 583, СТН 1198, Контур, Корнет, а также сорта белорусской селекции с низкими хлебопекарными качествами Щара и Гармония.

Метод может успешно применяться для подбора родительских пар для скрещивания и последующего отбора при селекции пшеницы на хлебопекарные качества.

Литература

1. Куликович, С.Н. Озимая пшеница в вопросах и ответах / С.Н. Куликович, В.С.Бобер. – Минск: Наша Идея, 2012. – 320 с.
2. Куликович, С.Н. Урожайность зерна сортов озимой пшеницы в южном регионе Республики Беларусь / С.Н. Куликович, О.А. Барановская, С.В. Кравцов // Земляробства і ахова раслін. – 2014. – №5. – С. 26-29.
3. Gale, K.R. Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat / K.R. Gale // Journal of Cereal Science. – 2005. – Vol. 41, №2. – P. 181-192.
4. Ma, W. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat / W. Ma, W. Zhang, K.R. Gale // Euphytica. – 2003. – Vol. 134. – P. 51-60.
5. Laflandra, D. PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex *Glu-A1* locus in durum and bread wheat / D. Laflandra, G.F. Tucci, A. Pavoni, T. Turchetta, B. Margiotto // Theor. Appl. Genet. – 1997. – Vol. 94. – P. 235-240.
6. Ahmad, M. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers / M. Ahmad // TAG Theoretical and Applied Genetics. – 2000. – Vol. 101, №5-6. – P. 892-896.
7. Liu, S. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat / S. Liu, S. Chao, J.A. Anderson // Theor Appl Genet. – 2008. – Vol. 118, №1. – P. 177-183.
8. Giroux, M.J. Puroindolines: their role in grain hardness and plant defence / M.J. Giroux [et al.] // Biotechnol. Genet. Eng. Rev. – 2003. – Vol. 20. – P. 277-290.
9. Lillemo, M. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe / M. Lillemo, C.F. Morris // Theor. Appl. Genet. – 2000. – Vol. 100, №7. – P. 1100-1107.
10. Korzun, V. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat / Korzun V., Roder M.S., Ganal M.W., Worland A.J., Law C.W. // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 96, №8. – P. 1104-1109. – Part I: Molecular mapping of *Rht8* on short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.).
11. MacRitchie, F. Flour polypeptides related to wheat quality / F. MacRitchie, D.L. Cros, C.W. Wrigley // Advances in cereal science and technology. – 1990. – Vol. 10. – P. 79-145.
12. Lukov, O.M. Screening of bread wheats for milling and baking quality-A Canadian perspective / O.M. Lukov // Cereal Foods World. – 1991. – Vol. 36, №6. – P. 497-501.

13. *Dessalegn, T.* Allelic variation of HMW glutenin subunits of Ethiopian bread wheat cultivars and their quality / T. Dessalegn, C.S. Van Deventer, M.T. Labuschagne, H. Martens // *African Crop Science Journal*. – 2011. – Vol. 19, №2. – P. 55-63.
14. *Добротворская, Т.В.* Анализ разнообразия российских и украинских сортов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по высокомолекулярным субъединицам глютенина / Т.В. Добротворская, С.П. Мартынов // *Генетика*. – 2011. – Т. 47, №7. – С. 905-919.
15. *Bradova, J.* Evaluation of winter wheat collection in terms of HMW- and LMW-glutenin subunits / J. Bradova, L. Stockova // *Czech. J. Genet. Plant Breed.* – 2010. – Vol. 46. – P. 596-599.
16. *Payne, P.I.* The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties / P.I. Payne, M.A. Nigtingale, A.F. Krattiger, L.M. Holt / *J. Sci. Food Agriculture*. – 1987. – Vol. 40. – P. 51-65.
17. *Rogers, W.J.* The HMW glutenin subunit and gliadin compositions of German-Grown wheat varieties and their relationship with bread-making quality / W.J. Rogers, P.I. Payne, K. Harinder // *Plant Breeding*. – 1989. – Vol. 103. – P. 89-100.

**IDENTIFICATION OF HMW GLUTENIN POLYMORPHISM IN VARIETY
SAMPLES FROM COLLECTION AND BREEDING NURSURIES
OF WINTER WHEAT**

**E.A. Fomina, S.N. Kulinkovich, S.V. Malyshev,
O.Y. Urbanovich**

The analysis of polymorphism of such genes as Glu-A1x, Glu-B1x and Glu-B1y, Glu-D1x and Glu-D1y controlling synthesis of storage seed proteins (glutenins) was conducted in 45 variety samples of winter wheat. Probable bread-making qualities of the studied lines were estimated. The test results of Belarusian wheat samples showed that among them, a high share of alleles in Glu-A1 and Glu-B1 loci influencing the bread-making qualities negatively, and d allele in Glu-D1 locus contributing positively to flour quality, was observed. As a result of the researches conducted, genotypes containing favourable combinations of the alleles of high-molecular-weight glutenins were isolated. 4 variety samples with the highest indices of bread-making qualities (10 points) were found out. The lowest overall bread-making estimate was in the variety samples in which parents were only West-European varieties, such as STH 729, STH 735, Kubus, Kriss, STH 583, STH 1198, Kontur, Kornet, and as well as when Belarusian varieties with low bread-making qualities (Schara and Garmoniya) were used.