doi 10.18524/2077–1746.2021.2(49).246889

УДК 575.17:575.113.2:633.34

Ю. А. Попович[1], аспірант
О. М. Благодарова[2], наук. сп.
С. В. Чеботар[1,2], д.б.н., професор

[1]Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Одеса, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна.
[2]Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Одеса, Овідіопольська дор., 3, 65036, Україна.

ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНОГО ЛОКУСУ *TAGLGAP* ТА ЙОГО ЗВ'ЯЗОК З АЛЕЛЬНИМИ ВАРІАНТАМИ ГЛІАДИНІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

Досліджено поліморфізм мікросателітного локусу *Taglgap* в українських та зарубіжних сортах та лініях пшениці м'якої (*Triticum aestivum L.*). Знайдено 11 алелів мікросателіту *Taglgap,* з яких сім алелів у сортів, створених в Україні та десять алелів у сортів, створених в зарубіжних селекційних установах. Показано як асоціюються алелі мікросателітного локусу *Taglgap* з алельними варіантами гліадинів за локусом *Gli-B1.* Проведено аналіз нуклеотидних послідовностей у базі даних NCBI, та показано присутність й можливі алелі *Taglgap* у низки видів родів *Triticum L.* та *Aegolops L.*

Ключові слова: *Triticum aestivum L.*; алельні варіанти гліадинів; *Taglgap;* мікросателіт; поліморфізм; *Gli-B1* локус.

Гліадини відносяться до основних запасних білків ендосперму пшениці, які використовуються рослиною як джерело нітрогену та фосфору при проростанні зародка. Мономерні гліадини, взаємодіючи з полімерними глютенінами через дисульфідні зв'язки та нековалентні взаємодії утворюють глютеновий комплекс, який визначає реологічні властивості тіста і зумовлює хлібопекарську якість зерна [4, 24]. З гліадиновими генами зчеплені окремі гени стійкості до хвороб, наприклад, листової, стеблової та бурої іржі та абіотичних чинників, що впливає на поширення деяких алелів гліадинів у певних кліматичних зонах [2, 4, 11,]. Отже, алельний стан гліадинових генів є важливою ознакою при доборі матеріалу у процесі селекції пшениці м'якої.

Гліадинові гени є високополіморфними та локалізуються у шести основних та восьми мінорних локусах на хромосомах першої та шостої гомеологічних груп [17]. На основі відмінностей в амінокислотній послідовності (довжини повторювального домену, будови С-термінального домену, послідовності повторювального мотиву) та за електрофоретичною рухливістю гліадини поділяють на γ-, δ- та ώ-гліадини, що кодуються *Gli-1* локусами та α-гліадини, які кодуються *Gli-2* локусами [8, 17]. Кількість гліадинових генів, зібраних у клас-

© Ю.А. Попович, О.М. Благодарова, С.В. Чеботар, 2021
Ця стаття відкритого доступу на умовах CC BY-NC 4.0

тери, у кожному локусі варіює. Залежно від сорту, вона сягає від 40 до 150 копій генів (сорт Cheyenne), в локусах, що кодують α-гліадини [7, 16]. За γ- та ω-гліадини відповідають кластери сімейств генів, що досягають 15–40 копій та 15–18 копій відповідно [12]. Тому, зазвичай розглядають сукупність гліадинових генів одного локусу, які успадковуються зчеплено, й кодують певний алельний варіант гліадинів.

На основі результатів, отриманих методом електрофорезу в кислому поліакриламідному гелі було розроблено дві класифікації алельних варіантів білків гліадинів – за Ф. О. Поперелею [23], яка зазвичай використовувалася в Україні та колишньому Радянському Союзі, та за Є. В. Метаковським [14], що є міжнародною. На даний момент у каталозі Є. В. Метаковського описано 182 алельних варіантів гліадинів для шести локусів, ідентифікація яких є досить складною.

У зв'язку з високим рівнем поліморфізму та складним процесом ідентифікації гліадинів методом електрофорезу в кислому ПААГ, виникає потреба у визначенні алелів генів гліадинів, що кодують алельні варіанти гліадинів, методом ПЛР. Це потрібно для добору матеріалу під час селекції пшениці. Зокрема, вважається, що *Gli-B1* локус має більший вплив на хлібопекарську якість зерна, ніж інші локуси. Цінними для селекції є такі алельні варіанти гліадинів, як *Gli-B1b, Gli-B1c, Gli-B1d,* та *Gli-B1l*. Алель *Gli-B1l* зчеплений з генами стійкості такими як стійкість до листової, стеблової та бурої іржі [2, 4].

У наших попередніх дослідженнях у 46 сортів було проаналізовано та показано відповідність між алельними варіантами гліадинів та поліморфізмом *Gli-B1* локусу, визначеному за використання алель-специфічних праймерів [15, 19]. Проте, застосовані молекулярні маркери не дозволили розділити певні алельні варіанти гліадинів та характеризувалися досить довгими фрагментами ампліфікації з малою різницею між алелями (1–2 п. н.). На даний момент відомо, що у *Gli-B1* локусі також локалізується мікросателіт *Taglgap* з коровим мотивом САА, до якого розроблені праймери, що фланкують послідовність 213–285 п. н. [9]. Цей мікросателіт використовувався з метою генотипування. Так, у досліджуванній вибірці європейських сортів пшениці м'якої M. S. Roder et al. [22] показано наявність 17 алелів *Taglgap* (209 п. н.– 281 п. н.), а С. В. Чеботар [5] зафіксовано 14 алелів у сортів українського походження. Крім цього, у роботі S. Alamerew et al. [6] праймери до локусу *Taglgap* були застосовані не тільки для пшениці м'якої, але й для видів *T. durum* та *T. aethiopicum,* де виявлено 13, 11 та 16 алелів відповідно. Незважаючи на локалізацію мікросателіту *Taglgap* в *Gli-B1* локусі, зв'язок його поліморфізму з алельними варіантами гліадинів на даний момент не вивчався.

Тому метою даної роботи було дослідити поліморфізм мікросателітного локусу *Taglgap* та проаналізувати чи є асоціація між поліморфізмом за цим локусом і поліморфізмом, що визначається за алельними варіантами гліадинів, які детектуються методом електрофорезу в кислому ПААГ.

Матеріали та методи досліджень

У роботі було досліджено 140 сортів та ліній пшениці м'якої. З них – 96 сучасних українських сортів та ліній із таких селекційно-дослідних установ: Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення (22 сорти та 6 ліній), Миронівський інститут пшениці ім. В. М. Ремесла (19 сортів), Білоцерківська дослідно-селекційна станція (11 сортів), Інститут зрошувального землеробства НААН (10 сортів), Полтавська державна аграрна академія (10 сортів), Носівська селекційно-дослідна станція (3 сорти та 5 ліній), Донецький інститут агропромислового виробництва (2 сорти), Луганський інститут селекції і технологій (1 сорт), науково-виробнича фірма «Дріада» (1 сорт) та 6 майже-ізогенних ліній, створених проф. Копусем М. М. на основі сорту Безоста 1, які характеризуються різними алельними варіантами гліадинів, а також колекція із 44 зарубіжних сортів з Канади, Іспанії, Австралії, Франції, Мексики, Італії та ін., яка була зібрана та надана для досліджень к.б.н. Є. В. Метаковським, як така, що максимально відображає поліморфізм алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом.

У дослідження брали не менше п'яти зернівок на сорт, які розділяли на половинки: одну половинку використовували для електрофорезу запасних білків, з другої – екстрагували ДНК та проводили ПЛР. Електрофорез запасних білків проводили в кислому ПААГ за методикою Ф. О. Поперелі [18], алельні варіанти гліадинів позначали за каталогом Є. В. Метаковського [14]. Екстракцію ДНК здійснювали з використанням буферу СТАВ [10], ПЛР реакцію проводили з використанням праймерів до мікросателітного локусу *Taglgap*, розроблених K. Devos et al. [9], фрагменти ампліфікації фракціонували у 7% ПААГ та фарбували за допомогою аргентум(I) нітрату [21]. Довжину фрагментів ампліфікації визначали у програмі GelAnalyzer. Частоту алелів обчислювали лише для української вибірки сортів за формулою

$$H=1-\sum p_i^2,$$

де p_i частота кожного алеля у вибірці.

Оскільки зарубіжна колекція була підібрана за заздалегідь відомими алельними варіантами гліадинів з каталогу Є. В. Метаковського з метою відтворення максимальної різноманітності, тому «зарубіжна» вибірка не відображає справжні частоти алелів гліадинів.

Результати досліджень та їх обговорення

В ході досліджень методом електрофорезу запасних білків в кислому ПААГ було підтверджено 19 алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом, у зарубіжній колекції сортів пшениці: *Gli-B1a, Gli-B1b, Gli-B1c, Gli-B1d, Gli-B1e, Gli-B1f, Gli-B1g, Gli-B1h, Gli-B1i, Gli-B1j, Gli-B1k, Gli-B1l, Gli-B1m, Gli-B1n, Gli-B1o, Gli-B1p, Gli-B1q, Gli-B1r, Gli-B1s*. Дев'ять алельних варіантів

було виявлено також у сортах української селекції, де найбільш поширеним був *Gli-B1b* (*p*=0,59). Даний алельний варіант визначає хороші хлібопекарські властивості зерна [2, 4] та зустрічається у 28,2% світових сортів і є найбільш характерним для Румунії, Болгарії, України та частини Росії [14]. Крім цього серед українських сортів зустрічалися *Gli-B1c* (p=0,02), *Gli-B1d* (p=0,06), *Gli-B1e* (p=0,03), *Gli-B1f* (p=0,02), *Gli-B1g* (p=0,01), *Gli-B1h* (p=0,01), *Gli-B1l* (p=0,25) та *Gli-B1o* (p=0,01). Серед них *Gli-B1c* пов'язують з високою хлібопекарською якістю, а *Gli-B1l* – зі стійкістю до хвороб, яку привносить пшенично-житня транслокація 1BL.1RS [2, 4]. Детальний перелік сортів з алельними варіантами гліадинів опубліковані у статтях Popovych et al. [19] (зарубіжні сорти) та Popovych et al. [20] (більшість сортів української вибірки). Алельні варіанти гліадинів ряду сортів Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла та СГІ–НЦНС, що досліджувалися, вже опубліковані N. Kozub et al. [21], та збігаються з нашими результатами.

Дослідження мікросателітного локусу *Taglgap*, показали його високий поліморфізм та зв'язок з алельними варіантами гліадинів. Загалом було знайдено 11 алелів локусу *Taglgap,* десять з яких знайдено у сортах зарубіжної колекції та вісім – у досліджених українських сортах пшениці м'якої (рис. 1, рис. 2).

У колекції зарубіжних сортів пшениці м'якої зустрічалися такі алелі мікросателіту*Taglgap*: 213 п.н., 216 п.н., 237 п.н., 246 п.н., 248 п.н., 250 п.н., 252 п.н., 270 п.н., 285 п.н. та *null*; а в сортів української селекції – 216 п.н., 237 п.н., 246 п.н., 248 п.н., 252 п.н., 267 п.н., 270 п.н. та *null*, знайдені у сучасних українських сортах пшениці м'якої (рис. 1, рис. 2).

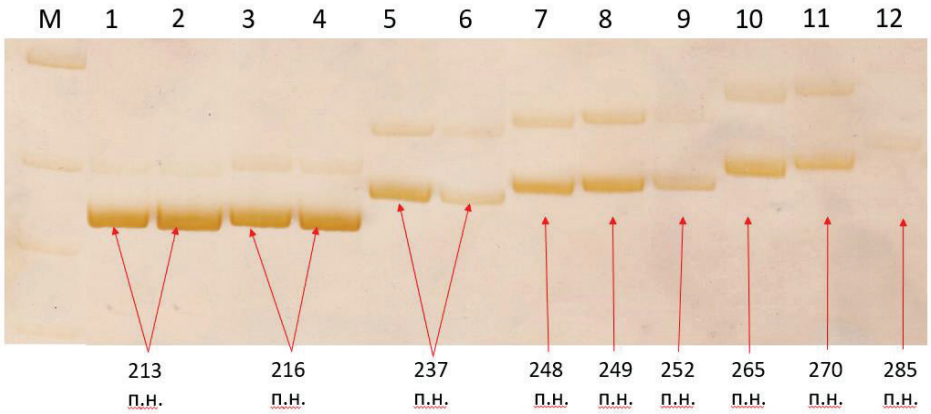

Рис. 1. Фрагменти ампліфікації ПЛР з праймерами до мікросателітного локусу Taglgap. ДНК: 1 – Marquis; 2 – Gabo; 3 – Марія; 4 – Goelent; 5 – Prinqual; 6 – Миронівська слава; 7 – Federation; 8 – Ardec; 9 – Caia; 10 – Любава; 11 – Suneca; 12 – Chinese Spring, M – маркер молекулярної маси pUC19/MspI.

Варто зазначити, що один алель – 267 п.н. було знайдено лише в українській колекції і лише в одного, до того ж, гетерогенного сорту Любава (267 п.н. та 216 п.н.), а виключно в зарубіжній колекції знайдено чотири алельні варіанти – 213 п.н., 246 п.н., 250 п.н. та 285 п.н.

В ході роботи був проаналізований зв'язок між поліморфізмом алельних варіантів гліадинів та алелями мікросателітного локусу *Taglgap* (Табл. 1). Так, сорти з алельним варіантом гліадинів *Gli-B1b* характеризувалися алелями *Taglgap* 213 п.н. та 216 п.н. Цікавим є те, що алель 213 п.н. був знайдений лише у австралійського сорту Gabo та канадського Marquis, а 216 п.н.– у сортів з російським (Безоста 1) та українським походженням (Миронівська 808, Марія, Альбатрос та ін.). Крім цього, фрагментом ампліфікації 216 п.н. характеризувалися ще три зарубіжні сорти з алельними варіантами гліадинів, які не зустрічаються в Україні – *Gli-B1n* (Intensivnaya), *Gli-B1s* (Salmone) та *Gli-B1q* (Goelent).

Фрагмент ампліфікації 237 п.н. за локусом *Taglgap* був детектований в українських та зарубіжних сортах із алельними варіантами *Gli-B1c* (Prinqual, Панна та ін), *Gli-B1e* (Escualo, Лютенька та ін.), *Gli-B1f* (Capelle-Desprez, Зимоярка та ін.), *Gli-B1g* (Galahad, Gli-B1–4 та ін.). Алель *Taglgap* 248 п.н. зустрічається переважно в зарубіжній колекції і в одній українській лінії – Gli-B1–12 та об'єднує аж сім алельних варіантів гліадинів: Gli-B1i (Federation, Insignia), *Gli-B1j* (Cluj-650), *Gli-B1k* (Mentana, Pane-247), *Gli-B1m* (Titien), *Gli-B1o* (Aragon-03, Gli-B1–12), *Gli-B1p* (Potam-70), *Gli-B1r* (Gazul). Дані алельні варіанти мають схожі електрофоретичні спектри та спільний найбільш повільний γ-гліадин [15, 19].

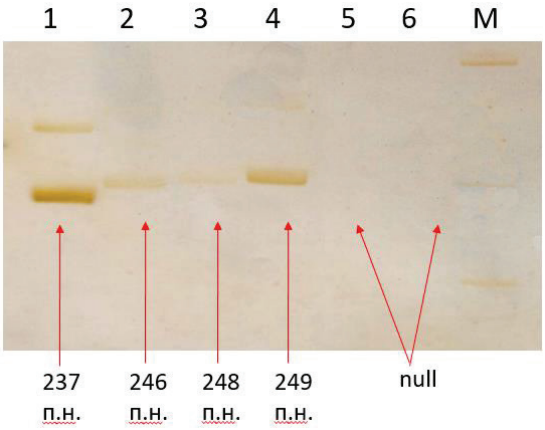

Рис. 2. Фрагменти ампліфікації ПЛР з праймерами до мікросателітного локусу Taglgap. ДНК: 1 – Prinqual; 2 – Krasnodonka; 3 – Federation; 4 – Ardec; 5 – Щедрість; 6 – Cartaya, M – маркер молекулярної маси pUC19/MspI.

Таблиця 1

Відповідність алелів мікросателітного локусу *Taglgap* та алельних варіантів гліадинів

Кількість сортів	**Алель** *Taglgap,* **п.н.**	**Алельний варіант локусу** *Gli-B1*
2	213	*Gli-B1b*
60	216	*Gli-B1b, Gli-B1n, Gli-B1s, Gli-B1q*
21	237	*Gli-B1c, Gli-B1e, Gli-B1f, Gli-B1g*
10	248	*Gli-B1i, Gli-B1j, Gli-B1k, Gli-B1m, Gli-B1o, Gli-B1p, Gli-B1r*
1	246	*Gli-B1h*
1	249	*Gli-B1h*
3	252	*Gli-B1h*
1	267	*Gli-B1d*
14	270	*Gli-B1d*
1	285	*Gli-B1a*
25	*null*	*Gli-B1l*

Одразу три алеля локусу *Taglgap* було знайдено у сортів пшениці з *Gli-B1h* алельним варіантом – 246 п.н. у російського сорту Краснодонка, 250 п.н. у бельгійського Ardec та 252 п.н. у португальського Caia, американського Newcaster і українського сорту Мадярка. У роботі Н.О. Козуб [3] показано, що даний алельний варіант зустрічається також у видів *T. dicoccum, T. spelta* та *T. durum*, а також описано споріднені до *Gli-B1h* алельні варіати *ha**, *hb**, *hs**, що імовірно може пояснювати виявлений нами поліморфізм. Також два алеля *Taglgap* було виявлено у сортів з *Gli-B1d* алельним варіантом. З них, лише один сорт – Любава характеризувався алелем 267 п.н., а всі інші, такі як Suneca, Laura, Струмок, Віген – 270 п.н. Алельний варіант *Gli-B1a* знайдений лише у Chinese Spring, який вирізнявся алелем *Taglgap* 285 п.н. У сортів з алельним варіантом *Gli-B1l* (Відповідь, Либідь та ін.), які досить поширені в Україні, були відсутні фрагменти ампліфікації локусу *Taglgap* (*null* алель, у зв'язку з наявністю 1RS.1BL транслокації в генотипі.

Для підтвердження знайдених алелів, було проаналізовано нуклеотидні послідовності продуктів ампліфікації локусу *Taglgap,* наведені у статті K. Devos et al. [9] і здійснено пошук та аналіз інших нуклеотидних послідовностей в базі даних NCBI.

Згідно K. Devos et al. [9], довжина продуктів ампліфікації локусу *Taglgap* для сортів Soissons і Timgalen становить 213 п.н., Synthetic – 225 п.н., Hereward і Cappelle – 237 п.н. та Chinese Spring – 285 п.н., що співпадає з нашими результатами ПЛР за цим сортом. Із наведеного переліку у каталозі Є.В. Мета-

ковського [14] знайдено алельні варіанти для сортів Soissons і Timgalen – *Gli-B1b* та сорту Hereward – *Gli-B1f*, розміри фрагментів ампліфікації яких також відповідають Таблиці 1.

За пошуком у базі даних NCBI було знайдено нуклеотидні послідовності та підтверджено розмір фрагментів ампліфікації мікросателітного локусу *Taglgap* сортів Chinese Spring (AJ389689.1) та Katepwa (AJ389693.1), які досліджувалися у даній роботі. Крім цього, BLAST пошук показав локалізацію *Taglgap* локусу у великій (6,5 млн. п. н.) анотованій нуклеотидній послідовності MG560141, що належить сорту Chinese Spring. Зокрема, послідовність, що фланкується праймерами, розробленими K. Devos et al. [9], є некодуючою, займає позицію між 3377023–3377307 п. н. від початку сиквенсу MG560141, та знаходиться між γB4 та γB6 гліадиновими генами.

Загалом у базі даних NCBI за допомогою BLAST сервісу було знайдено шість нуклеотидних послідовностей *T. Œstivum* L., які за описом належали гену GAG56 або γ-гліадиновону псевдогену. На рис. 3 відображено мультиплексне вирівнювання даних нуклеотидних послідовностей за алгоритмом MAFT.

```
1. AJ389689.1 T GCAGACCTGTGTCATTGGTCTCATCCCTCTGGTCAATGATCTGGCCACAAAGCGCTTGCC
2. AJ389693.1 T CCATCTCTGTGTCATTGGTCTCATCCCTCTGGTCAATGATCTGGCCACAAAGCGCTTGCC
3. KC715968.1 T CCATCTCTGTGTCATTGGTCTCATCCCTCTGGTCAATGATCTGGCCACAAAGCGCTTGCC
4. AJ389690.1 T CCATCTCTGTGTCATTGGTCTCATCCCTCTGGTCAATGATCTGGCCACAAAGCGCTTGCC
5. M13712.1 WHE CCATCTCTGTGTCATTGGTCTCATCCCTCTGGTCAATGATCTGGCCACAAAGCGCTTGCC
6. AF234648.1 T CCATCTCTGTGTCATTGGTCTCATCCCTCTGGTCAATGATCTGGCCACAAAGCGCTTGCC

1. AJ389689.1 T AAGTGATGAGGCAACAATGCTGCCAACAACTAGCACAGATTCCTCAGCAGCTCCAGTGTG
2. AJ389693.1 T AAGTGATGAGGCAACAATGCTGCCAACAACTAGCACAGATTCCTCAGCAGCTCCAGTGTG
3. KC715968.1 T AAGTGATGAGGCAACAATGCTGCCAACAACTAGCACAGATTCCTCAGCAGCTCCAGTGTG
4. AJ389690.1 T AAGTGATGAGGCAACAATGCTGCCAACAACTAGCACAGATTCCTCAGCAGCTCCAGTGTG
5. M13712.1 WHE AAGTGATGAGGCAACAATGCTGCCAACAACTAGCACAGATTCCTCAGCAGCTCCAGTGTG
6. AF234648.1 T GTGTCATGAGGCAACAATGCTGCCAACAACTAGCACAGATTCCTCAGCAGCTCCAGTGTG

1. AJ389689.1 T CAGCCATCCATAGCGTCGTGCATTCCATCAGCATGTAGCAAGAACAACAACAACAACAAC
2. AJ389693.1 T CAGCCATCCATAGCGTCGTGCATTCCATCAGCATGTAGCAAG---------------AAC
3. KC715968.1 T CAGCCATCCATAGCGTCGTGCATTCCATCAGCATGTAGCAAG-------------------
4. AJ389690.1 T CAGCCATCCATAGCGTCGTGCATTCCATCAGCATGTAGCAAG-------------------
5. M13712.1 WHE CAGCCATCCATAGCGTCGTGCATTCCATCAGCATGTAGCAAG-------------------
6. AF234648.1 T CAGCCATCCATAGCGTCGTGCATTCCATCAGCATGTAGCAAG-------------------

1. AJ389689.1 T AACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC
2. AJ389693.1 T AACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC
3. KC715968.1 T ---------------AACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC
4. AJ389690.1 T -------------------------------AACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC
5. M13712.1 WHE -------------------------------AACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC
6. AF234648.1 T -------------------------------------------------AACAACAACAAC

1. AJ389689.1 T AACAACAACAACAACAAGGCATGCGTATCCTGCTGCCACTATATCAGCAACAACAGGTGG
2. AJ389693.1 T AACAACAACAACAACAAGGCATGCGTATCCTGCTGCCACTATATCAGCAACAACAGGTGG
3. KC715968.1 T AACAACAACAACAACAAGGCATGCGTATCCTGCTGCCACTATATCAGCAACAACAGGTGG
4. AJ389690.1 T AACAACAACAACAACAAGGCATGCGTATCCTGCTGCCACTATATCAGCAACAACAGGTGG
5. M13712.1 WHE AACAACAACAACAACAAGGCATGCGTATCCTGCTGCCACTATATCAGCAACAACAGGTGG
6. AF234648.1 T AACAACAACAACAACAAGGCATGCGTATCCTGCTGCCACTATATCAGCAACAACAGGTGG
```

Рис. 3. Мультиплексне вирівнювання нуклеотидних послідовностей γ-гліадинових псевдогенів Triticum aestivum L., здійснене у MAFT.

1 – Chinese Spring GAG56 gene (AJ389689.1), 2 – Katepwa GAG56 gene (AJ389693.1), 3 – Ymai34 clone gamma-gliadin pseudogene (KC715968.1), 4 – Forno GAG56 gene (AJ389690.1), 5 ї T. aestivum gamma-gliadin pseudogene (M13712.1), 6 – T. aestivum gamma-gliadin pseudogene (AF243648.1). Кольором позначено послідовності праймерів до локусу Taglgap.

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей показало, що вони розрізняються лише кількістю повторів корового мотиву CAA (рис. 3). Потенційно, продукти ампліфікації, які охоплюють ділянку між праймерами, мали б довжину 285 п.н. для Chinese Spring, 270 п.н. для сорту Katepwa, 237 п.н. для Forno, 252 п.н. для Ymai34 та 237 п.н. і 219 п.н. для γ-гліадинових послідовностей M13712.1 і AF234648.1.

Мотив CAA досить часто зустрічається в нуклеотидних послідовностях генів та псевдогенів гліадинів, оскільки він кодує глютамін, який у великій кількості присутній в амінокислотних послідовностях гліадинів. BLAST аналіз виявив також подібні до локусу *Taglgap* мікросателітні послідовності в секвенованих генах гліадинів, що клоновані із A та D субгеномів і містять CAA мотив. Наприклад, секвеновані послідовності MG560140 та MH347507.1 мають ідентичність із локусом *Taglgap* 92,16% й належать до субгеному A, але одночасно вони містять ряд однонуклеотидних замін, особливо в послідовностях, що комплементарні праймерам до *Taglgap*. Вирівнювання ряду секвенованих послідовностей, найбільш ідентичних до сиквенсу MH347507.1 показало, що кількість повторів CAA відрізняється лише на рівні виду.

Крім пшениці м'якої за допомогою BLAST аналізу було знайдено ряд нуклеотидних послідовностей, подібних до локусу *Taglgap* в інших видів злаків, що містять *B* геном, таких як – *T. spelta* (*ABD*)*, T. dicoccum* (*AB*)*, T. dicoccoides* (*AB*)*, T. durum* (*AB*), а також видів, що розглядалися як імовірні донори субгеному *B* пшениці м'якої – *Ae. bicornis* (S^b), *Ae. longissima* (S^l)*, Ae. sharonensis* (S^l), *Ae. searsii* (S^s) та *Ae. speltoides* (*S*) та тетраплоїдної пшениці із *G* субгеномом (що також походить від різновиду *Ae. speltoides) T. timopheevii (AG)* [24]. Імовірні продукти ампліфікації могли би бути 243 п.н. (AJ389696.1) для *T. spelta;* 240 п.н (AJ389705.1) та 243 п.н. (AJ389706.1) для *T. dicoccum*; 255 п.н. (AJ389707.1) та 279 п.н. (AJ389708.1) для *T. dicoccoides* 237 п.н. (AJ389709.1) та 234 п.н. (AJ389710.1) для *T. timopheevii;* 222 п.н. (389704.1) та 249 п.н. (AJ389702.1) для *T. durum*; 231 п.н. (AJ389711.1, FJ0067708.1) для *Ae. bicornis*, 222 п.н (AJ389714.1) для *Ae. longissima,* 249 п.н. (AJ389718.1) для *Ae. sharonensis*, 234 (AJ389715.1) п.н. для *Ae. searsii* та 210 п.н. (AJ389719.1) для *Ae. speltoides*. Загалом, за допомогою BLAST аналізу було знайдено в NCBI нуклеотидні послідовності, що відповідають 14 різним алелям мікросателіту *Taglgap,* з яких лише чотири знайдені ПЛР методом у досліджуваній вибірці сортів та один – 237 п.н. зустрічається у двох видів – *T. aestivum L.* та *ϖ. timopheevii.* Отже, отримані результати свідчать про можливість застосування праймерів, розроблених Devos et al. [9] не тільки для пшениці м'якої.

Висновки

1. У проведеному дослідженні методом ПЛР знайдено всього 11 алелів локусу *Taglgap,* сім алелів зустрічається у сортів, створених в Україні, та десять алелів – у сортів, створених в зарубіжних селекційних установах.

2. Виявлений поліморфізм корелює з поліморфізмом алельних варіантів гліадинів *Gli-B1* локусу та дозволяє розділити *Gli-B1a, Gli-B1d, Gli-B1h* та *Gli-B1l* алельні варіанти, а для українських сортів з високою імовірністю ще й *Gli-B1b* алельний варіант.

3. Мікросателітний маркер *Taglgap* маркер не дозволяє ідентифікувати *Gli-B1c* (який пов'язують із високою хлібопекарською якістю), проте дозволяє відрізнити його від деяких інших алелів, наприклад *Gli-B1b*, що є важливим для селекції.

4. Аналіз нуклеотидних послідовностей з бази даних NCBI показав наявність *Taglgap* локусу не лише в пшениці м'якої, але й в інших видів злаків родів *Triticum L.* та *Aegilops L*.

Стаття надійшла до редакції 14.09.2021

Список використаної літератури

1. Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей / Н.П. Гончаров– Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2012.– 523 с.
2. Коваль С.Ф. Что такое модель сорта / С.Ф. Коваль, В.С. Коваль, В.М. Чернаков.– Омск: ФГОУ ВПО ОМГАУ, 2005.– 280 с.
3. Козуб Н.О. Різноманітність та ефекти кластерів проламінових генів *Triticum aestivum L.* та споріднених видів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня, докт. біол. наук: 03.00.22 «Молекулярна генетика» / Н.О. Козуб.– К., 2021.– 47 с.
4. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции / А.А. Созинов, Л.И. Корочкин.– М: Наука, 1985.– 270 с.
5. Чеботар С.В. Молекулярно-генетичний аналіз генофонду озимої м'якої пшениці України: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня, докт. біол. наук: 03.00.22 «Молекулярна генетика» / С.В. Чеботар.– К., 2009.– 41 с.
6. Alamerew S. Genetic diversity in Ethiopian hexaploid and tetraploid wheat germplasm assessed by microsatellite markers / S. Alamerew, S. Chebotar, X. Huang, M. Röder, A. Börner // Genetic Resourses and Crop Evolution.– 2004 – Vol. 51.– P. 559–567.
7. Anderson O.D. The α-gliadin gene family: DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes / O.D. Anderson, F.C. Greene // Theor. Appl. Genet.– 1997.– Vol. 95.– P. 59–65.
8. Anderson O.D. A new class of wheat gliadin genes and proteins / O.D. Anderson, L. Dong, N. Huo, Y.Q. Gu // PLoS One.– 2012.– Vol. 7.– P. e52139.
9. Devos K. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers / K.M. Devos, G.J. Bryan, A.J. Collins, P. Stephenson, M.D. Gale // Theor. Appl. Genet.– 1995 – Vol. 90.– P. 247–252.
10. Doyle J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Focus.– 1990.– Vol. 12.– P. 13–15.
11. Hafeez A.N. Creation and judicious application of a wheat resistance gene atlas / A.N. Hafeez, S. Arora, S. Ghosh, D. Gilbert, R.L. Bowden, B. B.H. Wulff // Zenodo.– 2021. http://doi.org/10.5281/zenodo.4469514
12. Hsia C.C. Isolation and characterization of wheat gliadin genes / C.C. Hsia, O.D. Anderson // Theor. Appl. Genet.– 2001.– Vol. 103.– P. 37–44.
13. Kozub N.O. Changes in allele frequencies at storage protein loci of winter common wheat under climate change / N.O. Kozub, I.O. Sozinov, V.M. Chaika, O.I. Sozinova, L.A. Janse, Ya.B. Blume // Cytol. Genet.– 2020.– Vol. 54.– P. 305–317.

14. Metakovsky E. A catalog of gliadin alleles: Polymorphism of 20th-century common wheat germplasm / E. Metakovsky, V. Melnik, M. Rodriguez-Quijano, V. Upelniek, M. Carrillo // The Crop Journal.– 2018.– Vol. 6.– P. 628–641.
15. Metakovsky E. Heteroalleles in common wheat: Multiple differences between allelic variants of the *Gli-B1* locus / E. Metakovsky, L. Pasqual, P. Vaccino, M. Rodrigues-Quijano, Yu. Popovych, S. Chebotar, W. Rogers // Int. J. of Molecular Sciences.– 2021.– Vol. 22.– P. 1832.
16. Okita T.W. Evolution and heterogeneity of the α-/β-type and γ-type gliadin DNA sequences / T.W. Okita, V. Cheesbrough, C.D. Reeves // J Biol Chem.– 1985.– Vol. 260.– P. 8203–8213.
17. Payne P.I. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm / P.I. Payne, L.M. Holt, G.J. Lawrence, C.N. Law // Plant Food Hum Nutr.– 1982.– Vol. 31.– P. 229–241.
18. Poperelya F.A. Gliadin polymorphism and its association with grain quality, productivity and adaptation properties of winter bread wheat varieties. Breeding, seed production and intensive technology of wheat cultivation / F.A. Poperelya.– Moscow: Agropromizdat, 1989.– P. 138–150.
19. Popovych Yu. Congruity of the polymorphisms in the expressed and noncoding parts of the *Gli-B1* locus in common wheat / Yu. Popovych, S. Chebotar, V. Melnik, M. Rodriguez-Quijano, L. Pascual, W.J. Rogers, E. Metakovsky // Agronomy.– 2020.– Vol. 10.– P. 1510.
20. Popovych Yu.A. Genetic variation of *Gli-B1* locus in Ukrainian bread wheat varieties and lines / Yu.A. Popovych, O.M. Blagodarova, S.V. Chebotar // Biopol. and Cell.– 2021.– in printing.
21. Promega Technical Manual.– USA: Gene Print. STR Systems. 1999.– P. 52.
22. Röder M.S. Construction and analysis of microsatellite-based database of European wheat varieties / M.S. Röder, K. Wendehake, V. Korzun, G. Bredemeijer, D. Laborie, L. Bertrand, P. Isaac, S. Rendell, J. Jackson, R.J. Cooke, B. Vosman, M.V. Ganal // Theor. Appl. Genet.– 2002 – Vol. 106.– P. 67–73.
23. Sozinov A.A. Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding / A.A. Sozinov, F.A. Poperelya // Ann. Technol. Agric.– 1980.– Vol. 29.– P. 229–245.
24. Urade R. Gliadins from wheat grain: an overview, from primary structure to nanostructures of aggregates / R. Urade, N. Sato, M. Sugiyama // Biophys Rev.– 2018.– Vol. 10.– P. 435–443.

Ю. А. Попович[1], О. М. Благодарова[2], С. В. Чеботар[1,2]
[1]Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Одеса, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна.
[2]Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насінництва та сортовивчення, Одеса, Овідіопольська дор., 3, 65036, Україна.

ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНОГО ЛОКУСУ *TAGLGAP* ТА ЙОГО ЗВ'ЯЗОК З АЛЕЛЬНИМИ ВАРІАНТАМИ ГЛІАДИНІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

Резюме
Проблема. Гліадини – мономерні та високополіморфні запасні білки ендосперму пшениці, які разом з глютенінами формують глютеновий комплекс, що визначає хлібопекарські властивості. Алельні варіанти гліадинів є важливою ознакою при відборі матеріалу для селекції, проте визначення їх методом електрофорезу в кислому ПААГ є досить складним.
Мета. Метою даної роботи було дослідити поліморфізм мікросателітного локусу *Taglgap* та проаналізувати його зв'язок з поліморфізмом алельних варіантів гліадинів визначених методом електрофорезу в кислому ПААГ.
Методика. У роботі досліджували 140 сортів та ліній пшениці м'якої української та зарубіжної селекції. Електрофорез запасних білків проводили в кислому ПААГ за методикою Ф.О. Поперелі [1989], алельні варіанти позначали за міжнародною номенклатурою [Metakovsky et al., 2018]. ДНК виділяли

з використанням СТАВ буферу та проводили ПЛР з праймерами до мікросателіту Taglgap(Devos et al., 1995). Продукти ПЛР фракціонували в 7% ПААГ та фарбували за допомогою аргентум нітрату. Нуклеотидні послідовності аналізували за допомогою BLAST та вирівнювали MAFT методами.

Основні результати. Виявлено 19 алельних варіантів гліадинів та 11 алелів локусу *Taglgap.* В колекції українських сортів зустрічалися *Gli-B1b, Gli-B1c, Gli-B1d, Gli-B1e, Gli-B1f, Gli-B1g, Gli-B1h, Gli-B1l* та *Gli-B1o* алельні варіанти і алелі *Taglgap* 216 п.н, 237 п.н., 246 п.н, 248 п.н, 252 п.н, 267 п.н, 270 п.н. та *null*. У зарубіжній колекції сортів – *Gli-B1a, Gli-B1b, Gli-B1c, Gli-B1d, Gli-B1e, Gli-B1f, Gli-B1g, Gli-B1h, Gli-B1i, Gli-B1j, Gli-B1k, Gli-B1l, Gli-B1m, Gli-B1n, Gli-B1o, Gli-B1p, Gli-B1q, Gli-B1r, Gli-B1s* та 213 п.н., 216 п.н, 237 п.н., 246 п.н, 248 п.н, 250 п.н, 252 п.н, 270 п.н., 285 п.н. та *null*. Аналіз нуклеотидних послідовностей в базі даних NCBI показав наявність ряду інших алелів мікросателіту *Taglgap* не тільки у пшениці м'якої, але й в деяких видів родів *Triticum L.* та *Aegilops L.*

Висновки. Виявлений поліморфізм корелює з поліморфізмом алельних варіантів гліадинів *Gli-B1* локусу та дозволяє розділити *Gli-B1a, Gli-B1d, Gli-B1h* та *Gli-B1l* алельні варіанти, а для українських сортів з високою імовірністю ще й *Gli-B1b* алельний варіант. Проте, даний маркер не дозволяє ідентифікувати *Gli-B1c*, що є важливим для селекції.

Ключові слова: алельні варіанти гліадинів, *Taglgap,* мікросателіт, поліморфізм, *Gli-B1* локус, пшениця м'яка.

Yu. A. Popovych[1], O. M. Blagodarova[2], S. V. Chebotar[1,2]

[1]Odesa National Mechnykov University, Genetics and Molecular Biology Department, 2 Dvorianska Str., Odesa, 65082, Ukraine.

[2]Plant Breeding and Genetic Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 3 Ovidiopolska Doroha, Odesa, 65036, Ukraine.

POLYMORPHISM OF *TAGLGAP* MICROSATELITE LOCUS AND ITS ASSOCIATION WITH ALLELELIC VARIETIES OF GLIADINS OF BREAD WHEAT

Abstract

Introduction. Gliadins are monomeric and highly polymorphic storage proteins of wheat endosperm, which together with glutenins form a gluten complex that determines the breadmaking properties of wheat. Allelic variants of gliadins are an important feature in the selection for breeding material, but their detection by electrophoresis in acid PAGE is quite difficult.

Aim. The aim of this study was to investigate the polymorphism of the *Taglgap* microsatellite locus and to analyze its correspondence to the polymorphism of allelic variants of gliadins that have been revealed by acid PAGE electrophoresis.

Methods. 140 cultivars and lines of bread wheat of Ukrainian and foreign selection were analyzed. Electrophoresis of storage proteins was performed in an acid PAGE according to the method of F.O. Poperellia [1989], allelic variants were designated according to the international nomenclature [Metakovsky et al., 2018]. DNA was

isolated by CTAB method and PCR was performed with primers to the *Taglgap* microsatellite (Devos et al., 1995). PCR products were fractionated in 7% PAGE and stained with silver staining method. Nucleotide sequences were searched by BLAST and aligned by MAFT methods.

The main results. 19 allelic variants of gliadins and 11 alleles of the *Taglgap* locus were identified. In the collection of Ukrainian varieties there were *Gli-B1b*, *Gli-B1c, Gli-B1d, Gli-B1e, Gli-B1f, Gli-B1g, Gli-B1h, Gli-B1l* and *Gli-B1o* allelic variants and alleles of *Taglgap* 216 bp, 237 bp, 246 bp, 248 bp, 252 bp, 267 bp, 270 bp and *null*. In the foreign collection of varieties – *Gli-B1a, Gli-B1b, Gli-B1c, Gli-B1d, Gli-B1e, Gli-B1f, Gli-B1g, Gli-B1h, Gli-B1i, Gli-B1j, Gli-B1k, Gli -B1l, Gli-B1m, Gli-B1n, Gli-B1o, Gli-B1p, Gli-B1q, Gli-B1r, Gli-B1s* and 213 bp, 216 bp, 237 bp, 246 bp, 248 bp, 250 bp, 252 bp, 270 bp, 285 bp and *null*. Nucleotide sequence analysis in the NCBI database showed the presence of a number of other alleles of the *Taglgap* microsatellite not only in bread wheat but also in some species of the *Triticum L*. and *Aegilops L.* genus.

Conclusions. The detected polymorphism correlates with the polymorphism of allelic variants of gliadins of *Gli-B1* locus and makes it possible to identify *Gli-B1a, Gli-B1d, Gli-B1h* and *Gli-B1l* allelic variants, and for Ukrainian varieties with high probability also *Gli-B1b* allelic variant. However, this marker does not allow identifying *Gli-B1c*, which is important for breeding

Key words: allelic variants of gliadins, *Taglgap*, microsatellite, polymorphism, *Gli-B1* locus, bread wheat.

References

1. Goncharov N. P. (2012) "*Comparative genetics of wheat and their relatives*" [Sravnitel'naya genetika pshenits i ikh sorodichej], Novosibirsk: Sib. univ. publishing house, p. 252.
2. Koval S. F., Koval V.S., Chernakov V.M. et al. (2005) "*What is a cultivar model*" [Čto takoe model' sorta], Omsk: FGOU VPO OMHAU, p. 280.
3. Kozub N. O. (2021) "*Diversity and effects of prolamin gene clusters Triticum aestivum L. and releated species"* [Riznomanitnist ta efekty klasteriv prolaminovykh heniv Triticum aestivum L. ta sporidnenykh vydiv]: abstr. of. diss. doct. biol. sci.: 03.00.22: Kyiv, p. 47.
4. Sozinov A. A. (1985) "Protein polymorphism and its significance in genetic and breeding" [Polimorfizm belkov i ego značenie v genetike i selekcii] M: Nauka, p. 270 p.
5. Chebotar S. V. (2009) "*Molecular-genetic analysis of Ukrainian bread wheat gene pool*", abstr. of. diss. doct. biol. sci.: 03.00.22: Kyiv, p. 41.
6. Alamerew S., Chebotar S., Huang X., Röder M., Börner A. (2004) "*Genetic diversity in Ethiopian hexaploid and tetraploid wheat germplasm assessed by microsatellite markers*", Genetic Resourses and Crop Evolution, 51, 559–567.
7. Anderson O. D., Greene F. C. (1997) "*The α-gliadin gene family: DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes*", Theor. Appl. Genet., 95, pp. 59–65.
8. Anderson O.D., Dong L., Huo N., Gu, Y.Q. (2012) "*A new class of wheat gliadin genes and proteins*", PLoS One, 7, pp. e52139.
9. Devos K. M., Bryan G. J., Collins A. J., Stephenson P., Gale M. D. (1995) "*Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers*", Theor. Appl. Genet., 90, pp. 247–252.
10. Doyle J. J., Doyle J. L. (1990) "*Isolation of plant DNA from fresh tissue*", Focus, 12, pp. 13–15.
11. Hafeez A. N., Arora S., Ghosh S., Gilbert D., Bowden R. L., Wulff B. B. H. (2021) "*Creation and judicious application of a wheat resistance gene atlas*", http://doi.org/10.5281/zenodo.4469514
12. Hsia C. C., Anderson O. D. (2001) "*Isolation and characterization of wheat gliadin genes*", Theor. Appl. Genet., 103, pp. 37–44.
13. Kozub N. O., Sozinov I. O., Chaika V. M., Sozinova O. I., Janse L. A., Blume Ya. B. (2020) "*Changes in allele frequencies at storage protein loci of winter common wheat under climate change*", Cytol. Genet., 54, pp. 305–317.

14. Metakovsky E., Melnik V., Rodriguez-Quijano M., Upelniek V., Carrillo M. (2018) "*A catalog of gliadin alleles: Polymorphism of 20th-century common wheat germplasm*", The Crop Journal, 6, pp. 628–641.
15. Metakovsky E., Pasqual L., Vaccino P., Rodrigues-Quijano M., Popovych Yu., Chebotar S., Rogers W. (2021) *"Heteroalleles in common wheat: Multiple differences between allelic variants of the Gli-B1 locus*", Int. J. of Molecular Sciences, 22, pp. 1832.
16. Okita T. W., Cheesbrough V., Reeves C.D. (1985) "*Evolution and heterogeneity of the α-/β-type and γ-type gliadin DNA sequences*", J Biol Chem, 260, pp. 8203–8213.
17. Payne P.I., Holt L.M., Lawrence G.J., Law C.N. (1982) "*The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm*", Plant Food Hum Nutr, 31, pp. 229–241.
18. Poperelya F. A. (1989) "*Gliadin polymorphism and its association with grain quality, productivity and adaptation properties of winter bread wheat varieties Breeding, seed production and intensive technology of wheat cultivation*", Moscow: Agropromizdat, pp. 138–150.
19. Popovych Yu., Chebotar S., Melnik V., Rodriguez-Quijano M., Pascual L., Rogers W.J., Metakovsky E. (2020) "*Congruity of the polymorphisms in the expressed and noncoding parts of the Gli-B1 locus in common wheat*", Agronomy, 10, pp. 1510.
20. Popovych Yu. A., Blagodarova O.M., Chebotar S.V. (2021) "*Genetic variation of Gli-B1 locus in Ukrainian bread wheat varieties and lines*" Biopol. and Cell, in printing.
21. Promega Technical Manual (1999), Gene Print. STR Systems. Printed in USA. Revised. 7:52.
22. Röder M. S., Wendehake K., Korzun V., Bredemeijer G., Laborie D., Bertrand L., Isaac P. Rendell S., Jackson J., Cooke R.J., Vosman B., Ganal M.V. (2002) "*Construction and analysis of microsatellite-based database of European wheat varieties*", Theor. Appl. Genet., 106, pp. 67–73.
23. Sozinov A. A., Poperelya F.A. (1980) "*Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding*", Ann. Technol. Agric, 29, pp. 229–245.
24. Urade R., Sato N., Sugiyama M. (2018) "*Gliadins from wheat grain: an overview, from primary structure to nanostructures of aggregates*", Biophys Rev., 10, pp. 435–443.