

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПОПОВИЧ ЮЛІЯ АНДРІЇВНА

УДК 575.17:575.113.2:633.1

ДИСЕРТАЦІЯ
ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ ГЛІАДИНІВ В СУЧАСНИХ УКРАЇНСЬКИХ
СОРТАХ ТА ЛІНІЯХ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

091 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Ю. А. Попович

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент
НААН України Чеботар Сабіна Віталіївна

Одеса - 2023

АНОТАЦІЯ

Попович Ю. А. Поліморфізм генів гліадинів в сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія» – Одеський національний університет імені І. І. Мечникова. Одеса, 2023.

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) – одна з основних сільськогосподарських культур в Україні та світі. Вона широко використовується у харчовій промисловості та є важливою кормовою базою для тваринництва.

Хлібопекарська якість борошна – дуже важлива ознака для селекції, визначається властивостями глютену (клейковини) – комплексу, що складається з високо- (HMW) і низькомолекулярних (LMW) субодиниць глютенінів, з'єднаних дисульфідними зв'язками, які утримуються з гліадинами нековалентними взаємодіями. Саме співвідношенням і поліморфізмом гліадинів та глютенінів у глютенівому комплексі, детермінуються хлібопекарська якість та властивості борошна. Гени глютенінів, на сьогодні добре досліджені та описані, секвеновано та розроблено праймери для цілого ряду алелів, на відміну від гліадинових генів.

Основним методом вивчення алельних варіантів гліадинів, на даний момент є електрофорез в кислому ПААГ, який фактично показує фенотип, що визначається набором генів гліадин-кодуєчого локусу. Даний метод є складним для використання, оскільки на одній доріжці гелю присутні пептиди, що кодуються усіма гліадин-кодуєчими локусами, які можуть перекриватися. Секвенування гліадин-кодуєчих локусів та окремих генів гліадинів, здійснене лише для деяких сортів (Wang D. W. et al., 2017; Huo, Zhu et al., 2018; Huo, Zhang et al., 2018; Noma et al., 2015; Camerlengo et al., 2017), показало високий рівень

поліморфізму між сортами за кількістю генів, що кодується одним локусом, присутність великої кількості псевдогенів.

Тому існує потреба у молекулярних маркерах, які б дозволили визначати алельні варіанти гліадинів за допомогою ПЛР. Це допоможе використовувати гліадини в ході маркер-асоційованої селекції, для ідентифікації алельних варіантів гліадинів ще до отримання зерна, придатного для проведення електрофорезу запасних білків, а також може допомогти об'єднати теоретичні знання, отримані в ході секвенування з конкретним фенотипом – алельними варіантами гліадинів. Таким чином це дозволить вивчати та застосовувати знання про гліадини в комплексі від окремого пептиду до алельного варіанту гліадинів та фенотипу. У зв'язку з цим дана робота присвячена дослідженням поліморфізму гліадинів, що кодуються *Gli-1* локусами за допомогою молекулярних маркерів, секвенування та електрофорезу запасних білків в кислому ПААГ.

За результатами дослідження, вперше проаналізовано поліморфізм *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів з використанням алель-специфічних праймерів, розроблених Zhang et al. (2003), та праймерів до мікросателіту *Taglgap* на світовій колекції сортів пшениці м'якої, що відображає максимальну різноманітність алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом (надана для досліджень Є. В. Метаковським) та на сучасній українській колекції сортів та ліній пшениці м'якої із різних селекційних центрів України.

За результатами ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу, виявлено поліморфізм фрагментів ампліфікації *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2* алелів, спричинений мікросателітом всередині послідовності, що ампліфікується (Devos et al., 1995), на основі чого, вперше описано чотири алелі мікросателіту, що виявляються в ПЛР з праймерами до *Gli-B1.1* алеля та вісім алелів, що виявляються в ПЛР з праймерами до *Gli-B1.2* алеля. З них, сім алелів було секвеновано, отримані нуклеотидні послідовності підтвердили наявність поліморфного мікросателіту із мотивом САА з кількістю повторів від семи (сорт

Gabo) до 31 (сорт Chinese-spring). Додатково було використано пару праймерів до мікросателіту *Taglgap*, яка фланкує послідовність, що перекривається із послідовністю, що фланкується алель-специфічними праймерами, проте є коротшою, а тому дозволяє отримати більш точні розміри фрагментів ампліфікації. Праймери до мікросателіту *Taglgap*, дозволили виявити 12 алелів у світовій та українській колекціях сортів пшениці м'якої.

Отримані результати стали основою для виділення трьох груп та 13 підгруп за поліморфізмом *Gli-B1* локусу та демонструють відповідність між наступними генетичними характеристиками «SNP алель *Gli-B1* локусу – алель мікросателіту *Taglgap* – алельний варіант гліадинів». До групи I відносяться чотири підгрупи з *Gli-B1.1* алелем, до групи II – вісім підгруп із *Gli-B1.2* алелем, а до групи III – підгрупа 10, із *null* алелями.

Для аналізу генетичного поліморфізму *Gli-A1* локусу було застосовано дві пари алель-специфічних праймерів, розроблених Zhang et al. (2003). На відміну від аналогічних праймерів до *Gli-B1* локусу, фрагменти ампліфікації *Gli-A1.1* та *Gli-A1.2* алелів були однакової довжини, що вказана розробниками – 168 п.н. На основі отриманих результатів по *Gli-A1* локусу, встановлена відповідність між алелями *Gli-A1.1/Gli-A1.2* та алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом.

В результаті біоінформаційного аналізу, виявлено мікросателіт, що є частиною кодуючої послідовності гена *Gamma gliadin-A1*, до якого було розроблено пару праймерів MsA1. Застосування цієї пари праймерів для аналізу української та світової колекції сортів пшениці дозволило виявити вісім різних алелів, які відповідають алельним варіантам гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом.

За результатами ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1* локусу у порівнянні із результатами по *Gli-A1* та *Gli-B1* локусах, виявлена значна кількість гетерогенних сортів. Відповідність між алелями, які визначаються в ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1* локусу не встановлена.

Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей γ -гліадинових генів та *in silico* ПЛР показали наявність двох копій послідовності, що ампліфікується із застосуванням алель-специфічних праймерів до *Gli-A1* локусу, а також переважання *Gli-A1.1* та *Gli-D1.1* алелів. Для *Gli-B1* локусу знайдено десять алелів мікросателіту *Taglgap*.

В ході біоінформаційного аналізу показано, що нуклеотидні послідовності, що відповідають фрагментам ампліфікації із алель-специфічними праймерами та праймерами до мікросателіту *Taglgap*, присутні також у ряді інших видів злаків. Це дозволяє використовувати дані праймери для молекулярно-генетичного аналізу інших злаків.

Отримані результати демонструють можливість використання молекулярних маркерів для ідентифікації алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-A1*, *Gli-B1* локусами використовуючи ПЛР.

Ключові слова: пшениця м'яка, насіння; запасні білки, гліадини, *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локуси, алелі, поліморфізм, ПЛР, молекулярно-генетичний аналіз, алель-специфічні праймери, мікросателітні локуси (SSR), молекулярні маркери, біоінформаційні методи, секвенування.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті

1. **Попович Ю. А.**, Благодарова О. М., Чеботар С. В. Поліморфізм мікросателітного локусу *Taglgap* та його зв'язок з алельними варіантами гліадинів пшениці м'якої. *Вісник ОНУ. Серія Біологія*. 2021. Т. 2, №49. С. 73-85. doi 10.18524/2077–1746.2021.2(49).246889 (*Особистий внесок здобувача: планування і проведення експерименту, аналіз даних, написання статті*).
2. **Popovych Yu. A.**, Blagodarova O. M., Chebotar S. V. Genetic variation of *Gli-B1* locus in Ukrainian bread wheat varieties and lines. *Biopolym. Cell*.

2021. Vol. 37, №5. P. 379-388. <https://doi.org/10.7124/bc.000a63>.
(*Особистий внесок здобувача: Особистий внесок здобувача: планування і проведення молекулярно-генетичного аналізу, аналіз даних, написання статті*).
3. Metakovsky E., Pasqual L., Vaccino P., Rodrigues-Quijano M., **Popovych Yu.**, Chebotar S., Rogers W. Heteroalleles in common wheat: Multiple differences between allelic variants of the *Gli-B1* locus. *Int. J. of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. P. 1832. <https://doi.org/10.3390/ijms22041832>.
(*Особистий внесок здобувача: проведення частини експерименту – молекулярно-генетичний аналіз із застосуванням алель-специфічних праймерів, аналіз результатів та висновки по даній частині роботи*).
4. **Popovych Yu.**, Chebotar S., Melnik V., Rodriguez-Quijano M., Pascual L., Rogers W. J., Metakovsky E. Congruity of the polymorphisms in the expressed and noncoding parts of the *Gli-B1* locus in common wheat. *Agronomy*. 2020. Vol.10, №10. P. 1510. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101510>.
(*Особистий внесок здобувача: проведення експерименту, аналіз даних, участь у написанні тексту статті*).

Тези

1. **Popovych Yu. A.**, Blagodarova O. M. Chebotar S. V. Correspondence between alleles of *Gli-1* loci and the allelic variants of gliadins of *Triticum aestivum* L. Book of Abstracts of the Eucarpia Cereals Section Conf. Seged (Hungary), 15-20 May 2023, pp. 118.
2. **Popovych Yu. A.**, Blagodarova O.M., Chebotar S.V. Bioinformatic analysis of nucleotide sequences of *Gli-1* loci of *Triticum aestivum* L. *Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія*. 2022. Т. 27, Вип. 2. С. 111-112.
3. **Попович Ю. А.**, Благодарова О.М., Чеботар С.В. Поліморфізм *Gli-1* локусів у сортів пшениці м'якої, походженням із провідних селекційних

- центрів України. Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин: тези доповідей Міжнародної наукової конференції. СГІ–НЦНС. м. Одеса (Україна). 26 жовтня 2022. С. 100-101.
4. **Рорович Ю. А.**, Blagodarova O.M., Chebotar S.V. Association between allelic variants of *Gli-B1* locus and polymorphism of microsatellite locus *Taglgap* in bread wheat varieties. *Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія.* 2021. Т. 2, Вип. 49. С. 127-128.
 5. **Попович Ю. А.**, Благодарова О.М., Чеботар С.В. Оцінка генетичної різноманітності *Gli-1* локусів у сучасних українських сортах пшениці м'якої. Селекційно-генетична наука і освіта: тези доповідей Міжнародної наукової конференції. м. Умань. 17-18 березня 2021. С. 202-205.
 6. **Попович Ю. А.**, Благодарова О.М., Чеботар С.В. Аналіз поліморфізму *Gli-A1* локусу у сортів пшениці м'якої сучасної української селекції. Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин: тези доповідей Міжнародної наукової конференції. СГІ–НЦНС. м. Одеса (Україна). 21 жовтня 2020. С. 65-67.
 7. **Попович Ю. А.**, Благодарова О.М., Чеботар С.В. Поліморфізм гліадинкодуєчого локусу *Gli-D1* у сучасних українських сортів пшениці м'якої. Генетика та селекція сільськогосподарських рослин – від молекули до сорту: матеріали IV Інтернет-конференції молодих вчених. НААН СГІ-ННЦ, м-во розвитку економ., торг. та с.-г. України, Укр. ін-т експертизи сортів рослин. м. Київ. 18 вересня 2020. С 26-27.
 8. **Рорович Ю. А.**, Blagodarova O. M., Chebotar S.V. Polymorphism of *Gli-B1* genes among the modern Ukrainian bread winter wheat varieties. *Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія.* 2020. Т. 25, Вип. 2. С. 199.

SAMMARY

Popovych Yu. A. Gliadin gene polymorphism in modern Ukrainian cultivars and lines of bred wheat. – Manuscript.

Thesis of degree of PhD, speciality 091 – “Biology”. – Odesa I.I. Mechnikov National University. Odesa, 2023.

Bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the main agricultural crops in Ukraine and the world. It is widely used in the food industry and is an important fodder base for animal husbandry.

The bread-making quality of flour is a very important feature for selection, determined by the properties of the gluten (gluten) complex, which consists of high- (HMW) and low-molecular-weight (LMW) subunits of glutenins connected by disulfide bonds, which are held with gliadins by non-covalent interactions. Polymorphism of gliadins and glutenins in the gluten complex and its ratio determine the bread-making quality and properties of flour. In contrast of gliadin genes, the glutenin genes are well studied and described, sequenced and primers designed for a number of alleles.

Today, the main method of studying allelic variants of gliadins is electrophoresis in acidic PAGE, which actually shows the phenotype determined by the set of genes of the gliadin-encoding locus. This method is difficult to use, because peptides encoded by all gliadin-encoding loci are present on one lane of the gel and may overlap. Sequencing of gliadin-encoding loci and individual gliadin genes, carried out only for some cultivars (Wang D. W. et al., 2017; Huo, Zhu et al., 2018; Huo, Zhang et al., 2018; Noma et al., 2015; Camerlengo et al., 2017), showed a high level of polymorphism between cultivars in terms of the number of genes encoded by one locus, the presence of a large number of pseudogenes.

Therefore, there is a need for molecular markers that would allow the determination of allelic variants of gliadins using PCR. This will help to use gliadins for marker-assisted selection, to identify allelic variants of gliadins even before obtaining grain suitable for electrophoresis of storage proteins, and can also help to

combine theoretical knowledge obtained during sequencing with a specific phenotype - allelic variants of gliadins. Thus, it will allow to study and apply knowledge about gliadins in complex from individual peptide to allelic variant of gliadins and phenotype. In this regard, this work is devoted to the study of gliadin polymorphism using the electrophoresis method in acidic PAGE and the search and analysis of polymorphism of *Gli-1* loci using molecular markers.

Based on the results of the study, the polymorphism of *Gli-A1*, *Gli-B1* and *Gli-D1* loci was analyzed using allele-specific primers developed by Zhang et al. (2003), and primers to the *Taglgap* microsatellite on the world collection of bread wheat cultivars, which reflects the maximum diversity of allelic variants of gliadins encoded by the *Gli-B1* locus (provided for research by E. V. Metakovsky) and on the modern Ukrainian collection of cultivars and lines of bread wheat from different Ukrainian selection and breeding centers.

According to the PCR with allele-specific primers to the *Gli-B1* locus results, a polymorphism of the amplification fragments of the *Gli-B1.1* and *Gli-B1.2* alleles, caused by a microsatellite within the amplified sequence (Devos et al., 1995), was revealed, on the basis of which four alleles of the microsatellite were described for the first time, detected in PCR with primers to the *Gli-B1.1* allele and eight alleles detected in PCR with primers to the *Gli-B1.2* allele. Seven alleles were sequenced, the obtained nucleotide sequences confirmed the presence of a polymorphic microsatellite with a CAA motif with the number of repeats from seven (Gabo cultivar) to 31 (Chinese-spring cultivar). Additionally, a *Taglgap* microsatellite primer pair was used, which flanks the sequence that overlaps with the sequence flanked by the allele-specific primers, but is shorter and therefore allows for more accurate amplification fragment sizes. Primers for the *Taglgap* microsatellite allowed to identify 12 alleles in the worldwide and Ukrainian collections of bread wheat cultivars.

Based on the results three groups and 13 subgroups, were separated according to the polymorphism of the *Gli-B1* locus which demonstrate the correspondence between "SNP allele of the *Gli-B1* locus – allele of the *Taglgap* microsatellite – allelic variant

of gliadins". Group I includes four subgroups with the *Gli-B1.1* allele, group II – eight subgroups with the *Gli-B1.2* allele, and group III – subgroup 10 with *null* alleles.

To analyze the genetic polymorphism of the *Gli-A1* locus, two pairs of allele-specific primers developed by Zhang et al. (2003) were used. In contrast to similar primers for the *Gli-B1* locus, the amplification fragments of *Gli-A1.1* and *Gli-A1.2* alleles were of the same length, as specified by the authors – 168 bp. Based on the results obtained for the *Gli-A1* locus, correspondence between the *Gli-A1.1/Gli-A1.2* alleles and allelic variants of gliadins encoded by the *Gli-A1* locus was established.

As a result of bioinformatic analysis, a microsatellite, which is part of the coding sequence of the *Gamma gliadin-A1* gene was found, and a pair of primers MsA1 were developed. The use of this pair of primers for the analysis of the Ukrainian and worldwide collections made it possible to identify eight different alleles that correspond to allelic variants of gliadins encoded by the *Gli-A1* locus.

According to the results of PCR with allele-specific primers for the *Gli-D1* locus, in comparison with the results for the *Gli-A1* and *Gli-B1* loci, a significant number of heterogeneous cultivars were found. Correspondence between alleles determined in PCR with allele-specific primers to the *Gli-D1* locus has not been established.

Bioinformatic analysis of the nucleotide sequences of γ -gliadin genes and *in silico* PCR showed the presence of two copies of the sequence amplified using allele-specific primers to the *Gli-A1* locus, as well as the predominance of *Gli-A1.1* and *Gli-D1.1* alleles. Ten alleles of the *Taglgap* microsatellite were found for the *Gli-B1* locus.

Bioinformatics analysis showed that nucleotide sequences corresponding to amplification fragments with allele-specific primers and primers to the *Taglgap* microsatellite are also present in a number of other types of cereals. This allows the use of these primers for molecular genetic analysis of other cereals.

Obtained results demonstrate application of molecular markers for detecting of allelic variants of gliadins encoded et *Gli-A1*, *Gli-B1* loci using PCR.

Key words: bread wheat; seed; storage proteins; gliadins; *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* loci; alleles; polymorphism; PCR; molecular genetic analysis; allele-specific primers; microsatellites loci (SSR); molecular markers; bioinformatic methods; sequencing.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	24
1.1. Деякі особливості організації геному пшениці м'якої.....	24
1.2. Запасні білки ендосперму пшениці та гліадинкодуєчі локуси <i>Triticum aestivum</i> L.....	25
1.3. Структура гліадинів та кількість і експресія гліадинових генів	29
1.4. Поширення та різноманітність алельних варіантів гліадинів та їх вплив на хлібопекарську якість	39
1.6. Сучасні молекулярно-генетичні дослідження гліадинів	45
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	52
2.1. Матеріали.....	52
2.3. Метод екстракції ДНК.....	59
2.4. Алель-специфічна ПЛР, ПЛР з праймерами до мікросателіту, мультиплексна ПЛР	62
2.5. Електрофорез продуктів ампліфікації в 7% поліакриламідному гелі	65
2.6. Аналіз довжини фрагментів ампліфікації, визначення частот алелів та генетичної різноманітності	66
2.5. Біоінформаційний аналіз та ПЛР <i>in silico</i>	67
2.6. Підготовка зразків до секвенування.....	69
РОЗДІЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ <i>GLI-B1</i> ЛОКУСУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ.....	70
3.1. Генетичний поліморфізм <i>Gli-B1</i> локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у світовій колекції сортів пшениці м'якої.....	70

3.2. Генетичний поліморфізм *Gli-B1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої. 85

3.3. Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей *Gli-B1* локусу пшениці м'якої та споріднених видів злаків 95

3.4. Секвенування найбільш поширених алелів *Gli-B1* локусу 106

РОЗДІЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ *GLI-A1* ЛОКУСУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ 113

4.1. Генетичний поліморфізм *Gli-A1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої 113

4.2. Генетичний поліморфізм *Gli-A1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у світовій колекції сортів пшениці м'якої..... 121

4.3. Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей *Gli-A1* локусу пшениці м'якої та низки інших видів злаків 126

4.4. ПЛР *in silico* та пошук інших праймерів до гліадинових генів. Розробка та аналіз потенціалу праймерів до мікросателіту *Gli-A1* локусу 135

РОЗДІЛ 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ *GLI-D1* ЛОКУСУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ 145

5.1. Генетичний поліморфізм *Gli-D1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої 145

5.2. Генетичний поліморфізм *Gli-D1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у світовій колекції сортів пшениці м'якої..... 152

5.3. Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей <i>Gli-D1</i> локусу пшениці м'якої та низки інших видів злаків	157
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	162
ВИСНОВКИ.....	170
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	172
ДОДАТОК А.....	191
ДОДАТОК Б	194

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- HMW** – High Molecular Weight
- LMW** – Low Molecular Weight
- MAFFT** – Multiple Alignment using Fast Fourier Transform
- NCBI** – National Center for Biotechnology Information
- pUC19/MspI** – маркер молекулярної маси
- TBE** – Трис-борат – ЕДТА буфер
- TEMED** – N,N,N'N'-тетраметилетилендіамін
- SNP** – single nucleotide polymorphism
- ДНК** – дезоксирибонуклеїнова кислота
- СТАВ** – цетилтриетиламоній бромід
- ПЛР** – полімеразна ланцюгова реакція
- ЕДТА** – етилендіамінтетраоцтова кислота
- п. н.** – пара нуклеотидів
- та ін.** – та інші
- БЦДС** – Білоцерківська селекційно-дослідна станція
- ІЗЗ** – Інститут зрошувального землеробства Національної академії аграрних наук України
- МІП** – Миронівський інститут пшениці імені В. М. Ремесла Національної академії аграрних наук України
- НСДС** – Носівська селекційно-дослідна станція
- ПДАА** – Полтавська державна аграрна академія
- СГІ-НЦНС** – Селекційно-генетичний інститут – національний центр насіннезнавства та сортовивчення

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) – одна з основних сільськогосподарських культур в Україні та світі. За даними FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (FAOSTAT, 2020), продукція пшениці м'якої зростає, та у 2021 році досягла 771 млн тон. Значний внесок у цьому – 32,1 млн тон належить Україні, яка входить у першу десятку країн за продукцією пшениці у світі.

Пшениця м'яка широко використовується у харчовій промисловості для виготовлення круп, кондитерських та хлібо-булочних виробів, а також є важливою кормовою базою для тваринництва. Окрім високої поживної цінності, продукти виготовлені з пшениці м'якої у деяких людей можуть викликати ряд захворювань – алергію на пшеницю, целиакію, чутливість до клейковини, не пов'язану з целиакією (NCGS/NCWS), та ін. (Рибалка, 2017).

У зв'язку з широким географічним поширенням культури пшениці та використанням її у різних галузях перед селекціонерами стоїть багато викликів: отримати високоврожайні сорти, стійкі до хвороб та абіотичного стресу, із зерна яких можна отримати високоякісне борошно, а також сорти із низьким вмістом чи відсутністю глютену. На даний момент, найбільш досліджуваними і важливими для селекції є гени, пов'язані з агрономічно цінними ознаками, такими як кількісні ознаки, стійкість до хвороб, що визначають адаптацію та урожайність. В даний перелік входять гени *Vrn* (*vernalization response*) та *Ppd* (*photoperiod response*), що визначають реакцію пшениці на яровизацію і довжину дня, гени *Rht* (*reduced plant height*), контролюють висоту рослини та WGQ (Wheat grain quality) – гени, що контролюють твердозерність, якість глютену, колір борошна, якість крохмалю та ін.

Хлібопекарська якість борошна – дуже важлива ознака для селекції, визначається властивостями глютену (клейковини) – комплексу, що складається з високо- (HMW) і низькомолекулярних (LMW) субодиниць глютенінів,

з'єднаних дисульфідними зв'язками, які утримуються з гліадинами нековалентними взаємодіями, формуючи агрегати (Shewry et al. 2009; Urade et al., 2018).

Саме співвідношенням і поліморфізмом гліадинів та глютенінів у глютенівому комплексі, детермінуються хлібопекарська якість та властивості борошна. У більшій мірі, якість визначається глютенінами, проте, доведено, що відсутність гліадину різко знижує корисні властивості глютену (Созинов, 1985). Глютеніві білки або запасні білки пшениці (накопичуються в ендоспермі та є джерелом поживних речовин при проростанні) демонструють високий рівень поліморфізму в сортах пшениці та є комплексом гомологічних білків, які широко варіюють за молекулярною масою та зарядом (Shewry et al., 1984). На основі електрофоретичної рухливості глютеніни поділяють на низькомолекулярні (LMW) та високомолекулярні (HMW), а гліадини умовно розділяють на фракції: α -, γ -, ω - та δ -гліадини (Wrigley et al., 1973; Anderson et al., 2012).

Гени HMW та LMW глютенінів локалізовані у *Glu-1* та *Glu-3* локусах, які добре досліджені та описані, секвеновано та розроблено праймери для цілого ряду алелів, на відміну від гліадинових генів (Dong et al., 2013; Wang et al., 2010.; Wang et al., 2009).

Гліадинові гени локалізовані в шести основних локусах: *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* розташовані на коротких плечах першої гомеологічної групи хромосом, та *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2* на коротких плечах шостої гомеологічної групи хромосом (Payne et al., 1982). Відомо також шість-вісім мінорних гліадинових локусів (Shewry et al., 2003; Juhasz et al. 2015). Мінорні гліадинові локуси кодують лише невелике число поліпептидів, та характеризуються значно меншим поліморфізмом, ніж основні. У кожному локусі знаходиться ряд генів поліпептидів, які успадковуються зчеплено, як проста ознака, сукупність цих генів, називають алельними варіантами гліадинів.

Основним методом вивчення алельних варіантів гліадинів, на даний момент є електрофорез в кислому ПААГ, який фактично показує фенотип, що

визначається набором генів кожного гліадин-кодуючого локусу. Даний метод є складним для використання, оскільки на одній доріжці гелю присутні пептиди, що кодуються усіма гліадин-кодуючими локусами, які можуть перекриватися. Для пшениці м'якої описано 118 різних алельних варіантів гліадинів, для шести основних локусів (Metakovsky et al., 2018). Окремі алельні варіанти зчеплені із генами, що впливають на морозостійкість, стійкість до стеблової іржі, що впливає на адаптацію, тому в кожному регіоні, як правило, вирощуються сорти, що характеризуються певним набором алельних варіантів, типовим для даного регіону (Metakovsky et al., 2018).

Секвенування гліадин-кодуючих локусів (кластерів генів) в цілому методами NGS та кожного гена гліадинів у локусі окремо, здійснене лише для деяких сортів, показало високий рівень поліморфізму між сортами за кількістю генів, що кодується одним локусом, присутність великої кількості псевдогенів (Wang D. W. et al., 2017; Huo, Zhu et al., 2018; Huo, Zhang et al., 2018; Noma et al., 2015; Camerlengo et al., 2017).

Хоч вважається, що основний внесок у хлібопекарську якість належить алелям глютенінів, та було доведено, що місенс мутація (що спричинила зміну аланіну на валін) у сигнальному пептиді одного лише γ -гліадинового гену, що кодується *Gli-D1* локусом, привела до різкого зниження кількості як гліадинів, так і глютенінів (Chen et al., 2022), що у свою чергу різко знижує вміст білка та хлібопекарську якість, знижує масу 1000 зерен. Даний факт показує, що експресія одного гена може впливати і на експресію інших гліадинових та глютенінових генів, що може бути ключем для зниження рівня глютену або зміни співвідношення Gli/Glu, вмісту білка у зерні, що впливає на хлібопекарську якість, незалежно від алельного стану глютенінових локусів. Таким чином, вивчення окремих генів гліадинів та алельних варіантів гліадинів, які є характеристикою гліадин-кодуючого локусу в цілому, є актуальним для вирішення проблем селекції.

Тому існує потреба у молекулярних маркерах, які б дозволили визначати алельні варіанти гліадинів за допомогою ПЛР. Це допоможе використовувати гліадини в ході маркер-асоційованої селекції, для ідентифікації алельних варіантів гліадинів ще до отримання зерна, придатного для проведення електрофорезу запасних білків, а також можуть допомогти об'єднати теоретичні знання, отримані в ході секвенування з конкретним фенотипом – алельними варіантами гліадинів. Таким чином, це дозволить вивчати та застосовувати знання про гліадини в комплексі від окремого пептиду до алельного варіанту гліадинів та фенотипу.

У зв'язку з цим, дана робота присвячена дослідженням поліморфізму гліадинів за допомогою методу електрофорезу в кислому ПААГ та пошуку і аналізу поліморфізму *Gli-1* локусів з використанням молекулярних маркерів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Наукова робота виконувалася на кафедрі молекулярної біології, біохімії та генетики (до реорганізації кафедра генетики та молекулярної біології) у 2019-2023 рр. Біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова у межах наукової теми кафедри №308 «Еколого-генетичні аспекти адаптації та генетичний поліморфізм живих систем», Держ. реєстрація №0121U109169 (01.02.2021-31.12.2025).

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи було визначити поліморфізм *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів за допомогою ПЛР з алель-специфічними праймерами та з'ясувати відповідність виявлених алелів алельним варіантам гліадинів, що виявлені методом електрофорезу в кислому ПААГ, у колекціях зарубіжних та сучасних українських сортів пшениці м'якої.

Для досягнення мети виконували наступні завдання:

1. Проаналізувати поліморфізм *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів за допомогою алель-специфічних праймерів, розроблених Zhang et al. (2003) у сучасних українських сортів та світової колекції сортів пшениці м'якої;

2. Визначити алельні варіанти гліадинів, що кодуються *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусами для колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої методом електрофорезу в кислому ПААГ;
3. Проаналізувати відповідність поліморфізму, виявленого у ПЛР з алель-специфічними праймерами та поліморфізмом алельних варіантів гліадинів;
4. Проаналізувати поширення виявлених алелів та алельних варіантів гліадинів у вибірках сортів та ліній пшениці із різних селекційних центрів України;
5. Провести біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей гліадинових генів, проаналізувати їх за допомогою *in silico* ПЛР з алель-специфічними праймерами, та порівняти отримані результати з результатами лабораторного експерименту;
6. Провести *in silico* ПЛР з уже відомими розробленими різними авторами праймерами, до послідовностей γ -гліадинових генів, при виявленні поліморфізму, протестувати додаткові праймери у лабораторному експерименті.

Об'єкт дослідження: гліадин-кодуючі локуси *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* пшениці м'якої.

Предмет дослідження: поліморфізм генів γ -гліадинів, що кодуються *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусами *Triticum aestivum* L.

Методи дослідження. Для аналізу поліморфізму *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* за допомогою ПЛР використовували такі методи, як екстракція ДНК, ПЛР з алель-специфічними праймерами та з праймерами до мікросателіту *Taglgap*, електрофорез в 7% ПААГ та фарбування гелів за допомогою аргентум II нітрату, довжину фрагментів ампліфікації визначали за допомогою програмного забезпечення GelAnalyzer. Для ідентифікації алельних варіантів гліадинів використовували електрофорез запасних білків в кислому ПААГ, алельні

варіанти гліадинів позначали за каталогом E. V. Metakovsky (2018). Частоти алельних варіантів та алелів визначали з урахуванням гетерогенності. Індекс генетичної різноманітності вираховували за формулою Нея (Nei, 1973). Для біоінформаційного аналізу використовували BLAST пошук, мультиплексне вирівнювання послідовностей MAFFT, *in silico* ПЛР з використанням власного програмного забезпечення InSilicoPCR (для алель-специфічних праймерів) та програмного забезпечення FastPCR. Для уточнення розмірів нуклеотидних послідовностей найбільш поширених алелів *Gli-B1* локусу проводили секвенування продуктів ампліфікації за Сенгером.

Наукова новизна отриманих результатів. На 94-ох сортах з різних селекційних центрів України та 64-ох сортах з різних країн світу була показана відповідність між алелями, що визначаються праймерами Zhang et al. (2003) та алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-A1* та *Gli-B1* локусами. Описано поліморфізм за довжиною фрагментів ампліфікації, отриманих із застосуванням алель-специфічних праймерів до *Gli-B1* локусу, та показана його відповідність алелям мікросателіту *Taglgap* та алельним варіантам гліадинів, секвеновано ряд основних алелів *Gli-B1* локусу.

Розроблено нові праймери до кодуючої ділянки гена γ -гліадину, що кодується *Gli-A1* локусом, показана відповідність між виявленими алелями та алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом.

Продемонстровано можливість використання алель-специфічних праймерів, праймерів до мікросателіту *Taglgap*, а також розроблених в даному дослідженні праймерів до *Gli-A1* локусу, для аналізу поліморфізму близьких до *Triticum aestivum* L. видів.

Практичне значення отриманих результатів. Робота фактично впроваджена у навчальну програму курсу «Молекулярні маркери», що викладається для докторів філософії за ОНП «Біологія» за спеціальністю 091 Біологія та біохімія на Біологічному факультеті ОНУ імені І.І. Мечникова, та рекомендована як корисна модель при виконанні кваліфікаційних робіт

студентами, що включають дослідження запасних білків різних видів роду *Triticum*. Акт впровадження додається.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем та науковим керівником д. б. н., професором С. В. Чеботар було сплановано хід дослідження, його основні завдання та висновки. Спільно із науковим співробітником СГІ – НЦНС О. М. Благодаровою, був проведений електрофорез запасних білків в кислому ПААГ та визначені алельні варіанти гліадинів для вибірки із сучасних українських сортів та ліній пшениці м'якої. Дисертантом особисто проведений аналіз джерел літератури, здійснено молекулярно генетичний аналіз, проаналізовано отримані результати, проведено біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей γ -гліадинових генів та розроблено праймери для *Gli-A1* локусу. Проведено підготовку зразків до секвенування та аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей в ході секвенування.

Апробація результатів дослідження. Результати дослідження були представлені на XX, XXI, XXII, XXIII Міжнародній Гамівській конференції у 2020, 2021, 2022 та 2023 роках, IV Інтернет-конференції молодих вчених «Генетика та селекція сільськогосподарських рослин – від молекули до сорту» (м. Київ, 18 вересня 2020 р.), Міжнародних наукових конференціях «Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин» (21 жовтня 2020 р. та 26 жовтня 2022 р. СГІ – НЦНС, м. Одеса), Міжнародній науковій конференції «Селекційно-генетична наука і освіта» (м. Умань, 17-18 березня 2021 р.), Професорсько-викладацьких конференціях ОНУ імені І. І. Мечникова у 2021 і 2022 роках, XVII-ій Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченій 200-річчю з дня народження засновника сучасної генетики Грегора Йоганна Менделя, Міжнародній конференції Eucarpia Sereals Section Conference, 15-20 травня 2023.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 наукових робіт, вісім із яких є тезами міжнародних та вітчизняних конференцій та чотири статті, три з яких у журналах, що входять в наукометричну базу Scopus та одна фахова.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із наступних розділів: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Обсяг дисертації – 194 сторінки друкованого тексту, що містить 28 рисунків та 23 таблиці. Список використаних джерел складає 160 найменувань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Деякі особливості організації геному пшениці м'якої

Озима м'яка пшениця – це аллогексаплоїд ($2n=6x=42$), що містить три субгеноми (AABBDD), набутих від схрещувань трьох злаків, кожен містить по сім хромосом, що є характерною ознакою для цієї родини.

Геном пшениці м'якої був сформований близько 8000 років тому, внаслідок двох етапів схрещування. Перше відбулося між *Triticum urartu* ($2n=2x=14$; AA) та видом, близьким до *Aegilops speltoides* ($2n = 14$; SS), в результаті утворилася аллотетраплоїдна пшениця двозернянка *Triticum dicoccoides (turgidum ssp.)* ($2n=4x=28$; AABB), що була культивована. На другому етапі ця пшениця зазнала схрещування з *Aegilops tauschii* (DD), в результаті чого, утворився новий вид – *Triticum aestivum* ($2n=6x=42$; AABBDD) (IWGSC, 2014; Petersen, Seberg et al., 2006). Завдяки дії *Ph* генів, кожен субгеном веде себе в мейозі як незалежний (IWGSC, 2014). Доместикація призвела до зниження варіації нуклеотидних послідовностей та редукції розмірів субгеномів в порівнянні з батьківськими видами (Haudry et al., 2007). Однак, все ж присутня значна надлишковість геному, в якому зафіксовані численні процеси перебудов такі як елімінація кодуєчих і некодуєчих послідовностей, активація транспозонів, зміна експресії та замовкання генів, зміна мікроРНК (Li et al., 2015).

Пшениця м'яка озима має один з найбільших (17×10^9 п.н.) і найбільш насичених повторами геномів серед сучасних культурних рослин. Налічується приблизно 94–96 тисяч генів у геномі пшениці м'якої, з частотою генів від одного на 87000 п.н. до одного на 184000 п.н. Близько 80% представлено послідовностями, що повторюються. Активність таких повторів веде до зміни порядку генів та утворення псевдогенів, кластерів та сімейств генів (Gautier et al., 2000; Choulet et al., 2010; Brenchley et al., 2012). Через складність та великий розмір геному чорновий варіант нуклеотидної послідовності геному пшениці

м'якої став доступним лише у 2014, що значно пізніше, ніж для рису чи ряду інших видів (IWGSC, 2014; Wang et al., 2018).

Найбільш досліджуваними і важливими для селекції є гени, пов'язані з агрономічно цінними ознаками, такими як стійкість до хвороб та абіотичних стресів, гени, що визначають адаптацію та урожайність. В даний перелік входять локуси кількісних ознак, так звані QTLs (quantitative trait loci) – ділянки ДНК, у яких локазовані гени або регуляторні ділянки, що впливають на кількісні ознаки, які залежать від багатьох генів, а також окремі гени, такі як *Vrn* (vernalization response) та *Ppd* (photoperiod response), що визначають реакцію пшениці на яровизацію і довжину дня, гени *Rht* (reduced plant height), контролюють висоту рослини та WGQ (Wheat grain quality) – група генів, що контролюють твердозерність, якість глютену, колір борошна, якість крохмалю та ін.

Основні відкриття певних WGQ генів, таких, що контролюють запасні білки зерна пшениці *Gli* та *Glu* мають давню історію, проте молекулярно-генетичні дослідження їх розпочалися лише в 1990 роках і активно продовжуються зараз (Wang et al., 2018).

1.2. Запасні білки ендосперму пшениці та гліадинкодуєчі локуси *Triticum aestivum* L.

Завдяки високому економічному значенню, запасні білки були одними з перших описаних протеїнів, так, Беккарі у 1745 році ізолював глютен пшениці, однак їх детальне вивчення почалося у 1924 році з класифікації Осборна, який розділив запасні білки на основі екстракції та розчинності у воді, розчинах солей, спиртах чи кислотах/лугах на такі основні групи як альбуміни, глобуліни, проламіни та глютеліни (Shewry, 1995).

Запасні білки зернівки виконують функцію джерела нітрогену та в меншій мірі сульфуру у процесі проростання зародка. Основна їх маса накопичується в ендоспермі та сім'я'долях насінини. У пшениці, ячменю, кукурудзи, жита вони представлені в основному проламінами (спирторозчинна фракція) та

глютелінами (розчинними у лугах), багатими на глютамін і пролін, які є важливими компонентами в метаболічних процесах біосинтезу амінокислот. Проламіни пшениці називаються гліадинами, ячменю – гордеїнами, кукурудзи – зеїнами, жита – секалінами, усі вони здатні утворювати лише внутрішні дисульфідні зв'язки, тому є мономерними. Проламіни синтезуються на полісомах, прикріплених до ендоплазматичного ретикулуму і за допомогою характерного для них сигнального поліпептиду проникають через мембрану, накопичуючись у порожнинах ендоплазматичного ретикулуму чи вакуолях у вигляді білкових тіл (Созинов А. А., 1985).

Глютеліни пшениці, так звані, глютеніни – високомолекулярні полімерні білки, що містять цистеїнові амінокислотні залишки, здатні утворювати міжмолекулярні дисульфідні зв'язки (Созинов, 1985). Глютеніни та гліадини здатні взаємодіяти між собою та утворювати клейковину.

Глютен (клейковина) – комплекс, що складається з високо- (HMW) і низькомолекулярних (LMW) субодиниць глютенінів, з'єднаних дисульфідними зв'язками, які утримуються з гліадинами нековалентними взаємодіями, формуючи агрегати (Shewry et al. 2009, Urade et al., 2018). Близько 40% від загального вмісту білка у борошні становлять гліадини, 7,5% – високополімерні глютеніни та 32,5% – низькополімерні глютеніни (Gras et al. 2001; Goesaert et al., 2005). Крім цього, у невеликій кількості борошно містить інші запасні білки – гліадин-подібні білки, тритицини, глобуліни, а також деякі ферменти такі як амілази, інгібітори протеаз, які захищають від комах та грибів та ін.

Саме співвідношенням і поліморфізмом гліадинів та глютенінів у глютенівому комплексі, детермінуються хлібопекарська якість та властивості борошна. У більшій мірі, якість визначається глютенінами, проте, доведено, що відсутність гліадину різко знижує корисні властивості глютену (Созинов А. А., 1985). Вважається, що глютеніни визначають еластичність та силу, а гліадини – в'язкість та розтяжність тіста (Anderson et al., 1989; Anderson O. D. et al., 2009; Dupont et al., 2004; Gianibelli et al., 2011; Gu et al., 2004; Qi et al., 2009; Salentijn et

al., 2009; Wieser, 2007). Проте, на даний момент існує ряд публікацій, де показано, що зниження рівня гліадинів (в більшій мірі α - типу) не має негативного впливу на глютен і властивості тіста, і, навіть може підвищувати кінцеву якість борошна (Gil-Humanes et al., 2014a,b; Becker et al., 2012; Altenbach et al., 2014). Зміна акумуляції гліадинів впливає також на вміст лізину – важливої незамінної амінокислоти для людини (Galili et al., 2013). Так, Gil-Humanes et al. (2014b) було отримано підвищений вміст лізину в лініях пшениці шляхом пригнічення експресії гліадинів шляхом РНК інтерференції.

Глютеніві білки демонструють широкий поліморфізм в сортах пшениці. Імовірно, що велике число генів запасних білків зростало через дуплікації і транслокації, а амінокислотні послідовності змінювалися шляхом замінів, делецій та інсерцій, протягом їх еволюції і селекції, утворюючи нові алелі. В результаті, ці зміни привели до утворення комплексу гомологічних білків, які широко варіюють за молекулярною масою та зарядом (Shewry et al., 1984).

На основі електрофоретичної рухливості глютеніни поділяють на низькомолекулярні (LMW) та високомолекулярні (HMW), а гліадини умовно розділяють на фракції: α -, β -, γ -, ω - гліадини (Wrigley et al., 1973). Проте, досліджуючи нуклеотидні послідовності, у роботі Kasandra et al. (1987), було показано високу схожість α - та β - гліадинів, тому зараз їх об'єднують в одну групу. Авторами Anderson et al. (2012) описано ще одну групу – δ -гліадини, які знаходяться між γ - та ω - зонами. Отже, сьогодні класифікація, яка базується на електрофоретичній рухливості, включає чотири групи – α - (alfa-gliadins), γ - (gamma-gliadins), ω - (omega-gliadins) та δ -гліадини (delta-gliadins).

Гени високомолекулярних субодиниць глютенінів (HMW) знаходяться у *Glu-1* локусах на довгих плечах першої гомеологічної групи хромосом, а низькомолекулярних (LMW) у *Glu-3* локусах на коротких плечах першої гомеологічної групи хромосом, поряд з гліадиновими локусами *Gli* (Ma et al., 2009). У зв'язку з меншою кількістю локусів та копій генів, більшість глютенінових локусів добре досліджені та описані, секвеновано та розроблено

праймери для цілого ряду алелів, на відміну від гліадинових генів (Dong et al., 2013; Wang et al., 2010.; Wang et al., 2009). А також авторами Bekes та Wrigley (2013) було створено базу даних з 8500 сортів пшениці, яка містить інформацію про алельний склад *Glu-1* та *Glu-3* локусів, та на основі набору алелів глютенінів надає оцінку якості тіста за Пейном для *Glu-1* та значення сили R_{Max} і розтяжності, що базується на алелях *Glu-1* та *Glu-3* локусів. Раніше цю базу можна було знайти на сайті AACCC International website, проте на даний момент її перемістили на сайт Cereals and Grains Associations, доступний за посиланням: <https://www.cerealsgrains.org/resources/definitions/Pages/glutendatabase.aspx>.

Гліадинові гени локалізовані в шести основних локусах: *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* розташовані на коротких плечах першої гомеологічної групи хромосом, які в основному кодують γ -, δ -та ω - гліадини, *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2* кодують α - гліадини, локалізовані на коротких плечах шостої гомеологічної групи хромосом (Payne et al., 1982). *Gli-2* локуси є еволюційно молодшими від *Gli-1*, оскільки еволюційно близькі види з триби *Triticeae* не мають даних локусів (Huo et al., 2017).

Відомо також ряд мінорних гліадинових локусів на коротких плечах першої групи хромосом, а саме: 1AS – *Gli-A3*, *Gli-A5*, *Gli-A6*; 1BS – *Gli-B3*, *Gli-B5*; 1DS – *Gli-D3*, *Gli-D4*, *Gli-D6* (Shewry et al., 2003; Juhasz et al., 2015).

Відомо, що *Gli-3* локуси кодують ω - гліадини і розташовані ближче до центромери у порівнянні з *Gli-1* локусами. У *Gli-A3* локалізовано багато псевдогенів, і декілька генів ω -гліадинів AREL типу, даний локус знаходиться на відстані 22 сМ від *Gli-A1* (Nieto-Taladriz et al., 1996). Для *Gli-A5*, який знаходиться на відстані 1,94 сМ від *Gli-A1*, та *Gli-A6* локусів відомо по два алельні варіанти. *Gli-A5a* та *Gli-A6a* – є *null* алелями, *Gli-A5b* кодує два, а *Gli-A6b* – один ω -гліадин, що виявляються на електрофореграмах (Felix et al., 1996; Metakovsky et al., 2018).

Дещо більше ω -гліадинових генів локалізовано у *Gli-B3* локусі, для якого описано щонайменше три алельних варіанти: *Gli-B3a*, *Gli-B3b*, *Gli-B3c* (Nieto-Taladriz et al., 1996; Anderson et al., 2009).

Gli-D3 локус кодує ω -гліадини ARQL типу. *Gli-D4* локус знаходиться між центромерою та *Gli-D1* локусом на відстані 10.1 ± 2.4 сМ від нього і кодує γ -гліадини. *Gli-D5* локалізований на відстані 3.7 ± 0.8 сМ від *Gli-D1*, ближче до теломери, кодує ω -гліадини (Rodriguez-Quitano et al., 2006; Nieto-Taladriz et al., 1996).

Оскільки ω -гліадини *Gli-3* локусів тісно зчеплені з γ -гліадиновими генами, та на основі досліджень Gao et al. (2007) та Anderson et al. (2009), авторами Metakovsky et al. (2018) було висунуто припущення, що *Gli-3* є частиною *Gli-1* локусів.

Міnorні гліадинові локуси кодують лише невелике число поліпептидів, та характеризуються значно меншим поліморфізмом, ніж основні.

Гліадинові гени характеризуються значно вищим поліморфізмом ніж, глютенінові, у зв'язку з цим виникають труднощі у їх секвенуванні та дослідженні.

1.3. Структура гліадинів та кількість і експресія гліадинових генів

Біохімічно α - γ -, δ -гліадини є багатими на сульфур та містять шість (α -гліадини) або вісім (γ -, δ -гліадини) консервативних цистеїнових основ (Gras et al., 2001; Qi et al., 2006; Anderson et al., 2012; Huo et al., 2017). Дані цистеїнові основи беруть участь у формуванні внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків, що виключає можливість α - γ -, δ -гліадинів утворювати міжмолекулярні дисульфідні зв'язки. Однак, деякі варіанти α - і γ -гліадинів містять додаткову цистеїнову основу, яка дає можливість взаємодіяти з глютенінами через міжмолекулярні дисульфідні зв'язки, і діяти як глютеніві ланцюгові термінатори (gluten chain terminators) (Anderson et al., 1997; Anderson et al., 2013; Ferrante et al., 2006; Altenbach et al., 2007; Vensel et al., 2014; Qi et al., 2006).

Kimura et al. (2015) довів, що формування дисульфідних зв'язків у ендоплазматичному ретикулумі є вкрай важливим для їх транспорту до апарату Гольджі та запасанні їх у вигляді білкових тіл. Мутації, що впливають на цистеїнові залишки, можуть спричинити зникнення дисульфідного зв'язку, що призводить до утворення нерозчинних агрегатів в ендоплазматичному ретикулумі (Orsi et al., 2001).

ω -гліадини характеризуються відсутністю цистеїну (рис. 1.1) в амінокислотних послідовностях, відповідно, вони беруть участь у формуванні глютену виключно через нековалентні взаємодії (Shewry et al., 2003; Tatham et al., 2012). Серед ω -гліадинів також трапляються поліпептиди, які містять один цистеїн у послідовності, за допомогою якого вони здатні утворювати міжмолекулярні дисульфідні зв'язки з глютенінами (Tatham et al., 2012; Wang et al., 2018).

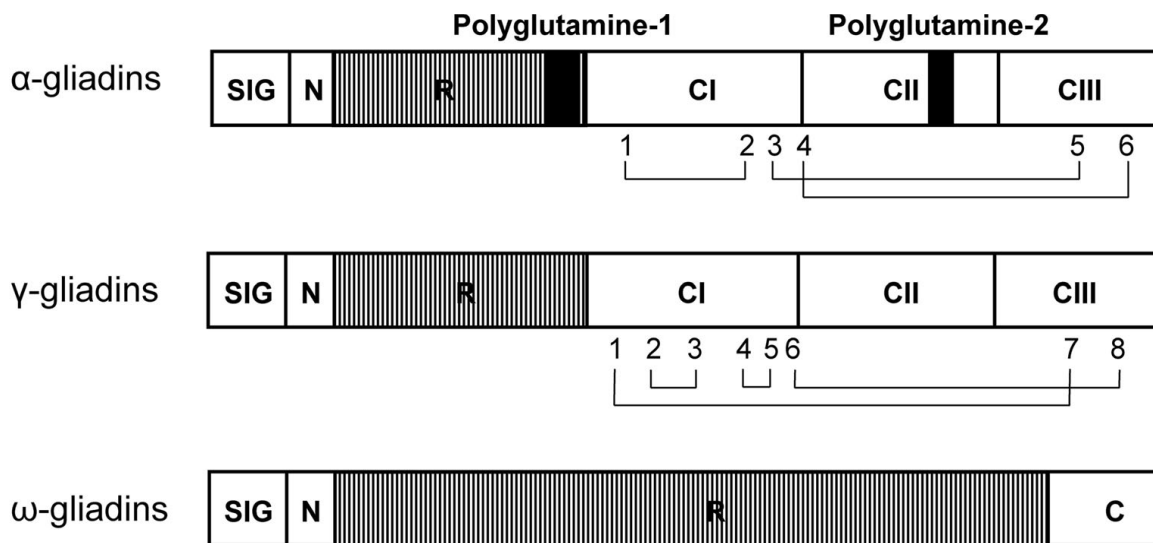


Рис. 1.1. Схематичне зображення α -, γ -, та ω -гліадинів. SIG – сигнальний пептид, N – N-термінальний пептид, R – повторювальний домен. C1, CII, CIII та C – частини C-термінальна ділянка, чорні блоки – поліглютамінові пептиди, цифрами та лініями показані цистеїни та їх дисульфідні зв'язки, цитується за Reiko Urade (2018)

Незважаючи на високий поліморфізм α -, γ -, δ - та ω -гліадини, мають схожу первинну структуру, для якої характерна наявність наступних частин: сигнальний пептид, N-термінальна ділянка, повторювальний домен та C-термінальна ділянка (домен), до якого можуть входити цистеїн багата (CI), глутамін багата (CII), завершальна ділянка (CIII) (рис. 1.1).

α -гліадини зазвичай містять сигнальний пептид з 20 амінокислот і N-термінальну ділянку з 5 амінокислот, а також повторювальний домен з 110-130 амінокислот і C-термінальну ділянку розміром 140-160 амінокислотних залишків (Kasarda et al., 1987). У C-термінальній ділянці знаходиться цистеїн багата послідовність (CI), яка характеризується чотирма залишками цистеїну, глутамін багата (CII), що містить різну кількість залишків глутаміну, та послідовність CIII з 35-39 амінокислот із завершальними двома залишками цистеїну (Shewry et al., 2009). Усі шість залишків цистеїну утворюють три міжмолекулярні дисульфідні зв'язки, N-термінальний повторювальний домен містить мотив P(F/Y)PQ₃₋₅. Два поліглутамінові блоки присутні у C-термінальній частині повторювального домену та у CII частині C-термінального району. Молекулярна маса α -гліадинів коливається в рамках від 30 до 34 кДа. Їх поліморфізм забезпечується варіацією довжини повторювального домена та двох блоків поліглутамінів (рис. 1.1).

α -гліадини можуть бути розділені за варіаціями у послідовності, що йде після останньої консервативної цистеїнової основи на CSTT та CT типи. α -гліадини CSTT типу містять також амінокислотні заміни у першому поліглутаміновому районі та в першому унікальному районі, їх гени локалізовані в *Gli-D2* та *Gli-B2* локусах, а містять CT α -гліадинів - у *Gli-A2* локусі (Wang et al., 2017).

Вторинна структура α - та γ -гліадинів дуже схожа. Авторами Blanch et al. (2003) було показано, що в α -гліадинів α -спіралі належать C-термінальному домену, β -складчасті структури також присутні, більше їх знаходиться саме у γ -гліадинів. Повторювальний домен α -гліадинів складається з суміші poly-L-

proline II спіралі та β -зворотнього повороту, неповторювальний домен багатий на α -спіралі (Blanch et al., 2003; Hsia et al., 2001; Matsuo et al. 2005; Altenbach et al., 2007).

Сигнальний пептид γ -гліадинів складається з 19 амінокислот, N-термінальної ділянки – з 12 амінокислот, повторювального домену довжиною 80-160 залишків і C-термінального району – 140-150 амінокислотних основ. СІ домен C-термінальної ділянки складається з шести залишків цистеїну, СІІ домену із поліглутаміновими блоками і послідовності СІІІ з 41-43 амінокислотними залишками, та кінцевими двома цистеїнами. Вісім цистеїнових основ формують чотири внутрішньомолекулярні дисульфідні зв'язки. N-термінальний повторювальний домен містить мотив PFPQQ₀₋₁(PQQ)₁₋₂. Маса γ -гліадинів коливається від 26 до 36 кДа, завдяки варіації по довжині повторювального домену (Hsia et al., 2001). Більшість γ -гліадинів мають по 8 залишків цистеїну, проте були знайдені також варіанти з додатковим цистеїном в різних частинах повторювального домену (рис. 1.1).

δ -гліадини є ортологами γ -гордеїнів ячменю, вони виділені в окремий тип на основі амінокислотної послідовності, досить недавно (Anderson et al., 2012). На електрофореграмах запасних білків вони знаходяться між γ - та ω -зонами. Загальна структура δ -гліадинів схожа до γ -гліадинів. Сигнальний пептид відщеплюється при процесингу білка. Домен II є глютамін-багатим і складається з варіацій повторювального домену, IV домен – також глютамін-багатий, але не має чітко вираженої повторювальної структури. Неповторювальними доменами є I, III, та IV, серед яких два останні містять консервативні цистеїнові основи, які можуть формувати внутрішні дисульфідні зв'язки. Повторювальний мотив δ -гліадинів PL/F-P-Q2–3 дуже схожий з повторювальним мотивом γ 3-гордеїнів та α -гліадинів - P-F/Y-P-Q3–5, і значно відрізняється від γ -гліадинового. δ -гліадини, як і γ -гліадини, характеризуються наявністю восьми цистеїнових основ (Anderson et al., 2012).

Послідовність ω -гліадинів складається з сигнального пептиду довжиною 19 амінокислотних залишків, N-термінальної ділянки з 11 основ, повторювального домену приблизно з 238 амінокислотних залишків та C-термінальної ділянки довжиною 12 амінокислот без цистеїну. Повторювальний мотив PFPQ₁₋₂PQ₁₋₂ є подібним до γ -гліадинового (Hsia et al., 2001).

За послідовністю перших чотирьох амінокислотних залишків у сигнальному пептиді, ω -гліадини діляться на декілька типів: AREL і ARQL, які характерні для 1A чи 1D хромосом, та SSRL тип, що кодується 1B хромосоною (Wang et al., 2017). Оскільки у більшості ω -гліадинів відсутній цистеїн, вони можуть взаємодіяти із глютенівим комплексом лише через нековалентні зв'язки.

ω -гліадини за вторинною структурою дещо відрізняються від α - та γ -гліадинів. Їх вторинна структура багата на β -повороти, проте α -спіралі і β -складчасті структури відсутні (Tatham et al. 1985a; Blanch et al. 2003).

Основними характеристиками, що визначають поліморфізм гліадинів є варіації в поліглутамінних послідовностях, повторювальних доменах та кількості цистеїну. Кодони глутаміну САА в поліглутаміновій ділянці можуть формувати мікросателіт у кодуючій послідовності, більшість неглутамінових кодонів цього району, відрізняються лише за одним нуклеотидом, що характерно для одонуклеотидних замін коду протягом еволюції (Hsia et al., 2001). Найбільш високий рівень консервативності послідовностей спостерігається у γ -гліадинів (особливо домену СІІ), в порівнянні з іншими, і вони є найбільш давніми з пшеничних проламінових сімейств генів (Cassidy et al., 1998). Внутрішні послідовності α -гліадинів і LMW-глютенінів є також достатньо консервативними. Ще однією особливістю гліадинових генів є те, що всередині послідовностей ДНК цих генів відсутні інтрони (Qi et al., 2009; Upełniek et al., 1995; Metakovsky, 1990).

Кількість гліадинових генів у локусі є різною. Залежно від сорту буває від 40 до 150 (сорт Cheyenne) копій генів, в локусах, що кодують α -гліадини (Okita et al., 1985; Anderson, Greene, 1996; Huo, Zhu et al., 2018). За γ - та ω -гліадини

відповідають кластери сімейств генів, що досягають 15-40 копій та 15-18 копій відповідно (Hsia et al., 2001).

Гліадин-кодуючі локуси характеризуються також великою кількістю псевдогенів. Найбільше їх міститься серед α -гліадинів. Псевдогени виникають внаслідок одонуклеотидних замінь, найчастіше трансзицій С на Т, які призводять до формування стоп кодонів, в деяких копіях спостерігається до 3 стоп-кодонів (Anderson et al., 1996). Різні дослідники наводять різні дані щодо кількості псевдогенів. Так за даними Zhang et al. (2015), серед α -гліадинових генів близько 72-95% є псевдогенами. ω -гліадинові гени також містять досить велику їх кількість, і тільки 23% γ - гліадинових генів – псевдогени (Zhang et al., 2015). За іншими даними у гексаплоїдній пшениці міститься близько 50% α -гліадинових генів, що є псевдогенами, а в її споріднених диплоїдних видів, предки яких вважаються донорами субгеномів – 87%. (Anderson et al., 1997; Van Herpen et al., 2006).

Експресія псевдогенів є дуже низькою, в порівнянні з генами. Їх транскрипти є нестабільними і регулюються на посттранскрипційному рівні, за рахунок механізму nonsense-mediated mRNA decay (Hug et al., 2016).

Експресія генів гліадинів та глютенінів також може бути взаємозалежною. Chen зі співавторами (2022) показали, що що місенс мутація (заміна С на Т, яка спричинила зміну аланіну на валін) у сигнальному пептиді одного лише γ -гліадинового гену, що кодується *Gli-D1* локусом, привела до різкого зниження кількості як гліадинів, так і глютенінів. А в роботі Zhou et al. (2022a) показано епігенетичний вплив: гіперметилування промотора одного лише гена *TaGli- γ -2.1* знижує загальну експресію гліадинів, що призводить до зміни їх співвідношення з глютенінами та зміни хлібопекарських властивостей.

На основі аналізу секвенованих послідовностей та протеомних досліджень було описано кількість гліадинових поліпептидів/генів для таких сортів як Butte 86, Kembukang, Xiaogan 81, Pegaso, Chinese Spring (Dupont et al., 2011; Noma et al.,

2016; Wang et al., 2017; Camerlengo et al., 2017; Huo, Zhu et al., 2018; Huo, Zhang et al., 2018; Cho et al., 2018).

Використовуючи методи двомірного електрофорезу в тандемної маспектрометрії MS/MS авторами Dupont et al. (2011) було проаналізовано гліадиновий склад сорту Butte 86. На електрофореграмі запасних білків (де були присутні гліадини, глютеніни) було ідентифіковано 34 плями, що містили γ -гліадини, у 16-ти плямах γ -гліадини переважали, в інших вони виступали як домішка. У п'яти плямах було знайдено декілька типів γ -гліадинів. Через програмне забезпечення Scaffold на основі результатів тандемної маспектрометрії MS/MS було ідентифіковано 13 нуклеотидних послідовностей гліадинів, чотири, з яких були з додатковою цистеїновою основою. Аналогічно на електрофореграмі було знайдено 12 плям ω -гліадинів, з них ідентифіковано вісім нуклеотидних послідовностей. Більшість α -гліадинових плям були сумішшю різних α -гліадинів, або містили ще й інші проламіни, всього знайдено 33 плями, а допомогою Scaffold ідентифіковано 23 нуклеотидних послідовності. Аналогічні протеомні дослідження комерційного корейського сорту Kembukang були проведені Cho et al. (2018). На електрофореграмі було виявлено 31 α -, 28 γ - та 6 ω -гліадинових плям, для яких було ідентифіковано 23, 11 та 5 нуклеотидних послідовностей, які належать сортам Chinese Spring та Butte 86. Додаткова цистеїнова основа була присутня у двох γ -гліадинів та по одному α -, ω -гліадину.

Da-Wei-Wang зі співавторами (2017) з використанням методів двомірного електрофорезу, тандемної маспектрометрії MS/MS та РНК-секвенування третього покоління дослідили транскрипти *Gli-1* та *Gli-2* локусів та їх поліпептиди для сорту Xiaoran 81. За результатами РНК-секвенування було ідентифіковано транскрипти для 52 гліадинових генів, серед яких 42 були активні і кодували 25 α -, 11 γ -, один δ - та п'ять ω -гліадинів. Інші 10 транскриптів були псевдогенами і характеризувалися дефектною кодувальною ділянкою – мали зсув рамки зчитування, або передчасний стоп-кодон, серед них було сім α -, два γ -, та один ω -гліадин.

Серед інтактних 25 генів α -гліадинів, вісім належали *Gli-A2* локусу, 10 – *Gli-B2* та сім – *Gli-D2*. Гени *Gli- α 7*, *Gli- α 8*, *Gli- α 18* та *Gli- α 25* характеризувалися значно нижчим рівнем транскрипції. Ідентичність їх нуклеотидних послідовностей була на рівні 75,7%-99,7%, довжина поліпептидів, які вони кодують коливалася від 286 до 325 амінокислотних основ. Гени 24 α -гліадинів кодували амінокислотні послідовності, що містять по шість цистеїнових залишків, і лише в *Gli- α 25* був присутній додатковий цистеїн у послідовності. Одинадцять γ -гліадинових генів належали хромосомам 1A (*Gli- γ 1* – *Gli- γ 3*), 1B (*Gli- γ 4* – *Gli- γ 7*) та 1D (*Gli- γ 8* – *Gli- γ 11*). Гени *Gli- γ 5* і *Gli- γ 10* містили триплет, що кодує одну додаткову цистеїнову основу. Довжина становила 285-357 амінокислотних основ, ідентичність послідовностей коливалася в межах 66,5%-100%. П'ять ω -гліадинових генів належали хромосомам 1A (*Gli- ω 1*), 1B (*Gli- ω 2*, *Gli- ω 3*) та 1D (*Gli- ω 4*, *Gli- ω 5*). До ARQL типу належать *Gli- ω 1*, *Gli- ω 2*, *Gli- ω 3*, до SRLL – *Gli- ω 5*, *Gli- ω 4* належав новому типу ARPL. Одна цистеїнова основа була присутня у амінокислотних послідовностях *Gli- ω 2* і *Gli- ω 5* генів гліадинів (Wang et al., 2017).

Протеомні дослідження ідентифікували лише 38 гліадинів у сорті Xiaoyan 81, серед яких 21 α -, 11 γ -, 1 δ - та 5 ω -гліадинів. Чотири гліадини (*Gli- α 7*, *Gli- α 8*, *Gli- α 18*, та *Gli- α 25*) з низьким рівнем транскрипції не накопичувалися у зернівці і не були виявлені на електрофорезі.

Загалом рівень транскрипції γ -гліадинів був значно вищим, ніж α -гліадинів, а рівень транскрипції δ - та ω -гліадинів був відносно низьким, за виключенням *Gli- ω 4* (Wang et al., 2017).

У дослідженнях Camerlengo et al. (2017) з використанням методів зворотньої ПЛР, та подальшого секвенування отриманих послідовностей, було проаналізовано α -гліадини сорту Regaso та ізольовано 49 унікальних α -гліадинових послідовностей. Серед них 18 належали *Gli-A2* локусу, 12 – *Gli-B2* та 19 – *Gli-D2* локусу. Довжина їх коливалася в межах 283-294 амінокислотних основ для А і D субгеномів та послідовності В субгеному вирізнялися

сигнальним пептидом, і їх довжина становила 282-309 амінокислотних залишків. Поліморфізм в межах одного субгеному здебільшого забезпечувався варіаціями у першому поліглутаміновому блоці.

Кількість та експресія α -гліадинів сорту Chinese Spring була проаналізована групою дослідників Noma et al. (2015). Методами зворотної ПЛР було ампліфіковано з мРНК, а потім клоновано та секвеновано 90 α -гліадинових генів. Знайдено 50 активних генів, серед яких 16, 16 і 18 були віднесені до *Gli-A2*, *Gli-B2* та *Gli-D2* локусів відповідно. Інші 40 послідовностей були псевдогенами з передчасними стоп-кодонами. Найбільша кількість псевдогенів – 25, відносилася до *Gli-B2* локусу, до *Gli-A2* та *Gli-D2* відносилось 7 та 8 послідовностей відповідно. Шість α -гліадинових генів містили додатковий кодон, що кодує цистеїновий залишок.

Інша кількість гліадинових генів Chinese Spring була знайдена групою дослідників Huo, Zhu et al. (2018) та Huo, Zhang et al. (2018), які використовуючи платформу PacBio секвенували і склали великі послідовності ДНК *Gli-1* та *Gli-2* локусів, розміром від 1 млн пн. до 6,5 млн пн. У даних послідовностях було знайдено 14 генів γ -гліадинів (з них три псевдогени), чотири інтактних гени і один псевдоген належали А субгеному, шість генів і два псевдогени – В, та 4 гени – D субгеному. Всього п'ять з 19 генів ω -гліадинів були інтактними, з яких один активний ген і 3 псевдогени належали А субгеному, один ген, шість псевдогенів – В субгеному, три гени і чотири псевдогени – D субгеному. Два псевдогени δ -гліадинів були присутні у локусі *Gli-A1* та один *Gli-D1*, по одному інтактному гену δ -гліадинів *δ -D1* та *δ -B1* виявлено у *Gli-D1* та *Gli-B2* локусах. Також авторами Huo, Zhu et al. (2018) виявлено невеликий рівень експресії деяких псевдогенів, також було описано досить неоднозначний факт для ω -гліадинів: експресія псевдогену *ω -A4* (у якого виявлено стоп-кодон у майже у кінці кодуєчої послідовності) була вищою, ніж експресія гена *ω -B3*.

Сорок сім α -гліадинових генів, з яких лише 26 активних було описано авторами Huo, Zhu et al. (2018). До *Gli-A2* локусу належало вісім генів і два

псевдогени, до *Gli-B2* – 11 генів і 13 псевдогенів, *Gli-D2* – сім генів і чотири псевдогени, що значно менше, ніж описано у роботі Noma et al. (2015).

Опираючись на великі нуклеотидні послідовності, отримані за допомогою PacBio платформи було створено генетичні карти *Gli-1* та *Gli-2* локусів сорту Chinese Spring (Huo, Zhu et al., 2018; Huo, Zhang et al., 2018) (рис. 1.2).

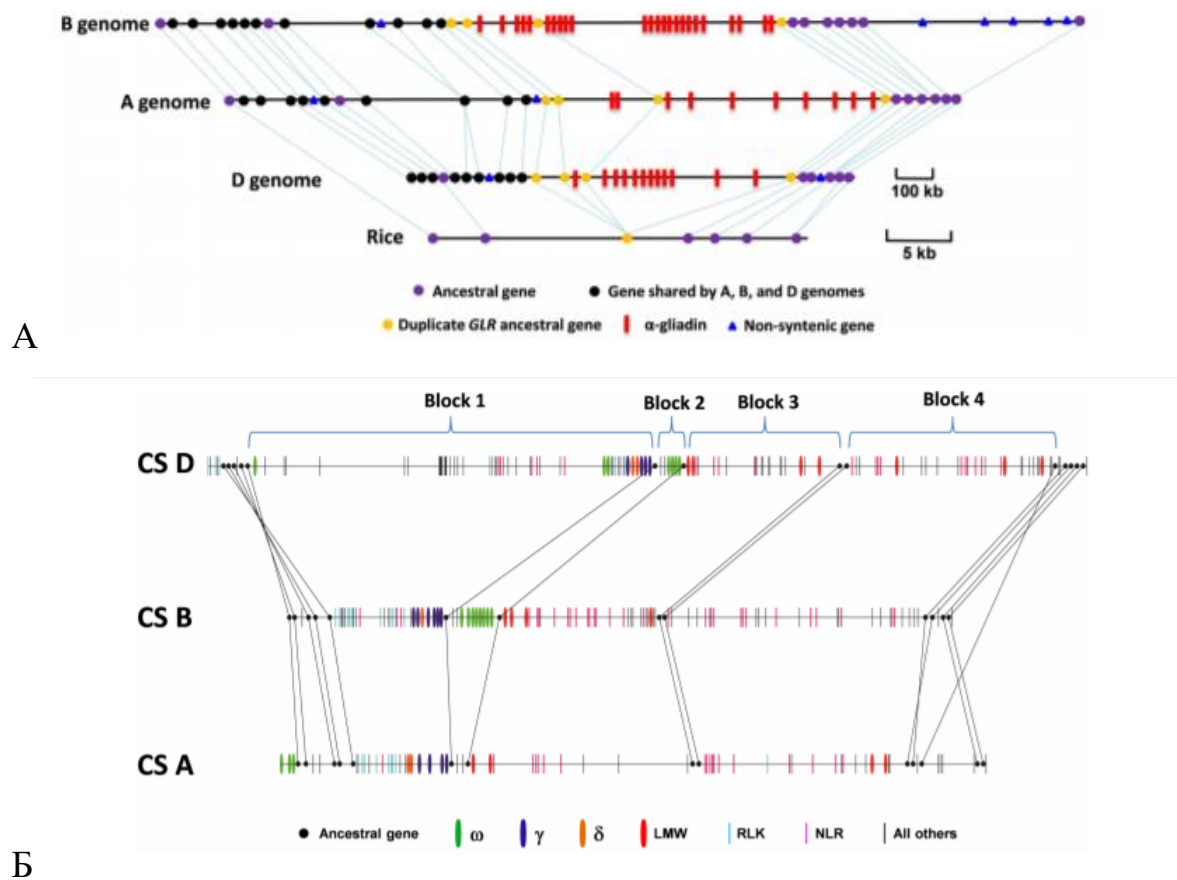


Рис. 1.2. Схематичне зображення *Gli-2* (А) та *Gli-1* (Б) локусів за Huo, Zhu et al. (2018) (А) та Huo, Zhang et al. (2018) (Б)

Для α -гліадинових генів організація кожного локусу залежала від субгегому, наприклад у *Gli-A2* локусі міжгенний простір був значно більшим (71 т.п.н.) і насичений величезною кількістю повторів і транспозонів, таких як *Manor*, *Ada*, *Sabrina*, на відміну від *Gli-B2* локусу багатого на псевдогени, і у якому більшість α -гліадинових генів розташовані щільно (10 т.п.н.), для D субгеному ця відстань становила 27 т.п.н. і містила *Hawi* LTR елементи (Huo,

Zhu et al., 2018; Huo Zhang et al., 2018). Аналогічна тенденція щільності генів зберігалася і для *Gli-1* локусів (рис. 1.2). Експресія генів проламінів А субгеному слабша, в порівнянні з В та D, оскільки в них присутнє лише невелике число інтактних генів. В той же час, експресія ω -гліадинів найбільш активна в D субгеномі (Huo, Zhang et al., 2018). Крім цього було виявлено близько 30 локусів кількісних ознак (*QTL*), які впливають на загальний рівень експресії гліадинів (вплив від 1,97%-12,83%), так і на фракції гліадинів окремо. Основні з них локалізовані на 6A, 6D та 7D хромосомах (Zhou, Geng et al., 2022).

Отже, кількість, різноманітність та довжина поліпептидів, які експресуються з гліадинових локусів є сортовою ознакою. На даний момент точне число цих генів та їхніх копій невідоме. В одному локусі можуть бути як гени різних поліпептидів, так і декілька копій одного і того ж гену. Експресія цих генів залежить від тривалості світлового дня та температури, а також стадії дозрівання (Noma et al., 2016), тому дослідження їх рівня експресії через мРНК, зворотню ПЛР не дає чіткого уявлення про копійність та кількість самих генів у локусах. По кількості смуг чи плям на електрофореграмах також неможливо судити навіть про кількість унікальних поліпептидів, оскільки частина смуг є сумішшю різних гліадинів як одного, так і різних типів. Геномне секвенування, яке б могло дати більш чіткі дані про точну кількість генів у кластері, ускладнене через величезну кількість послідовностей, що повторюються.

1.4 Поширення та різноманітність алельних варіантів гліадинів та їх вплив на хлібопекарську якість

Багатокопійність та структурна гетерогенність гліадинів значно ускладнює визначення функціональної ваги кожного *Gli* локусу та індивідуальних гліадинових генів для хлібопекарської якості зерна.

Хлібопекарська якість є досить відносною величиною і визначається рядом показників, таких як показник седиментації, показник альвеографа, показник фаринографа та якість при лабораторній випічці. Показник седиментації

визначається набуханням частинок муки і швидкістю їх осадження в розчинах слабких органічних кислот. Тривалість осадження частинок наважки муки (0,5-3,2 г) в 2% розчині оцтової кислоти становить 5 хв. Величина осаду (його межа) служить певним критерієм оцінки якості. Чим більший об'єм осаду, тим вища якість борошна (Созинов, 1985).

Альвеограф – прилад, дія якого базується на вимірюванні енергії, що тратиться на роздування кульки із тіста. Чим більше енергії потрібно затратити на цей процес, тим вища якість. Показники фаринографа характеризують фізичні властивості тіста в процесі замішування. Фаринограф вимірює водопоглинальну здатність тіста і його поведінку в процесі замішування. Чим стійкіше тісто витримує енергійне замішування, тим вища якість. Лабораторна випічка хліба є найбільш надійним критерієм оцінки хлібопекарської якості. Основним показником якості при такій випічці служить об'єм хліба. Із 100 грамів борошна хороших сортів пшениці він перевищує 1000 см³, а з поганих – менше 500 см³ (Созинов А. А., 1985).

Отже хлібопекарська якість – це складна ознака, яка залежить від складу і співвідношення глютенінів та гліадинів. Так, сорти з 1BL.1RS транслокаціями мають низький показник седиментації, та об'єм, що значно погіршує якість борошна (Gobaa et al., 2006). Делеція *Gli-D2* локусу, навпаки призводить до покращення хлібопекарської якості за рахунок збільшення експресії інших проламінів через компенсаторні механізми (Galili et al., 1986; Pistón et al., 2011; Camerlengo et al., 2017; Li et al., 2018).

Вивчення гліадинів розпочалося з електрофорезу в крохмальному гелі з алюміній-лактатним буфером, де отриманий спектр було поділено на чотири зони: α -, β -, γ - та ω -гліадини (Woyschik et al., 1964). Перша згадка про особливості генетичного контролю і синтезу гліадинів були у опубліковані у 1967 році. Аргентинські дослідники Solari та Favret (1967) вивчили успадкування спектру гліадинів у декількох комбінаціях схрещування. Аналізуючи популяції, що розчеплюються, після схрещувань різних сортів пшениці, Созиновим і

Поперелею (1970) було показано, що кожен *Gli* локус кодує декілька гліадинових поліпептидів (так званий блок, або алельний варіант), що успадковуються разом як одна Менделівська ознака. Оскільки експресія гліадинів відбувається у тканині триплоїдного ендосперму, то в гетерозиготних генотипів проявляється ефект дози гена, з переважанням материнських форм (Созинов, 1985). Також було описано множинний алелізм кожного *Gli* локусу, оскільки вони характеризуються різною кількістю на різною електрофоретичною мобільністю смуг на електрофореграмах (Sozinov, Popereleya, 1980). Кожен алельний варіант може містити поліпептиди з різних зон, або типів (α , γ , ω) (Gao et al., 2007; Anderson et al., 2009).

Використовуючи стандартний метод – одновимірний електрофорез в кислому поліакриламідному гелі, в одній зернівці пшениці можна ідентифікувати до декількох десятків електрофоретичних компонентів (Bushuk, Zillman, 1978), а методом двовимірного електрофорезу – до декількох десятків поліпептидів (Metakovsky, 2015). Було показано, що гліадинові електрофореграми є специфічними для кожного сорту і не залежать від абіотичних умов росту і розвитку, а також від вмісту інших білків у зерні (Metakovsky, 2015). Крім цього, важливо відзначити, що одна смуга, яка виділяється на електрофореграмі може бути сукупністю декількох поліпептидів (Wang et al, 2017; Dupont et al., 2011).

Сьогодні існує дві класифікації алельних варіантів гліадинів, ідентифікованих варіаціями методу одновимірного електрофорезу в кислому поліакриламідному гелі: за Созиновим і Поперелею та за Метаковським (Созинов, Попереля, 1979; Metakovsky, 1991). Перша – давніша і частіше використовується в Україні, оскільки була розроблена співробітниками Всесоюзного селекційно-генетичного інституту (м. Одеса; зараз Селекційно-генетичний інститут – національний центр насіннєзнавства та сортовивчення), а інша – класифікація Метаковського – більш нова й популярна за кордоном.

Перший каталог, який налічував 111 алельних варіантів за номенклатурою Метаковського вийшов у 1991 році (Metakovsky, 1991). А нещодавно був опублікований новий каталог на основі 1060 сортів пшениці з різних країн світу, де описано 182 алельних варіанти гліадинів (Metakovsky et al, 2018). З них до *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів відносилося 30, 26 та 18 алельних варіантів відповідно, а до *Gli-A2*, *Gli-B2* та *Gli-D2* – 42, 49 та 28 алельних варіанти відповідно (Metakovsky et al., 2018). Новий каталог містить алельні варіанти, доповнені алелями *Gli-A5* та *Gli-A6*.

Так, *Gli-A5* алелями доповнені наступні алельні варіанти: $Gli-A1n + Gli-A5b = Gli-A1m$; $Gli-A1p + Gli-A5b = Gli-A1r$. Алелі *Gli-A6* локусу, присутні у наступних алельних варіантах: $Gli-A1f + Gli-A6a$ (null) = *Gli-A1af*; $Gli-A1af + Gli-A6b = Gli-A1f$; $Gli-A1a + Gli-A6a = Gli-A1a$; $Gli-A1a + Gli-A6b = Gli-A1x$; $Gli-A1b + Gli-A6b = Gli-A1y$ та $Gli-A1af + Gli-A6b = Gli-A1aa$. Омега гліадини *Gli-3* локусів також входять в дану класифікацію, і на думку авторів, даний локус є частиною *Gli-1* (Metakovsky et al, 2018). Отже, алельний варіант гліадинів є комбінацією алелів генів основних та мінорних гліадинових локусів на одному плечі хромосоми, тим самим є зручним і комплексним генетичним маркером для хлібопекарської якості.

Найбільш поширеними алельними варіантами кожного локусу в загальній колекції сортів пшениці були *Gli-A1a* (17,8%), *Gli-B1b* (28,2%), *Gli-D1b* (39,4%), *Gli-A2g* (20,3%), *Gli-B2o* (18,5%), та *Gli-D2a* (24,4%). Серед українських сортів, представлених в каталозі найбільш частими алелями були *Gli-A1b*, *Gli-B1b*, *Gli-D1g*, *Gli-A2f* +(b), *Gli-B2b*, та *Gli-D2e* (Metakovsky et al, 2018).

Проте сорти пшениці з певного регіону чи країни характеризуються власним набором найбільш частих алельних варіантів. Так, для австралійських сортів характерними алелями є *Gli-A2c*, *Gli-A2a* та *Gli-D2w*; для канадських – *Gli-A1m*, *Gli-D1j*, *Gli-A2m* *Gli-A2h*; для румунських і болгарських – алелі «b» по всіх шести локусах; для французьких – *Gli-A1o*, *Gli-B1f*, *Gli-A2g*; для німецьких

– *Gli-A2h*, *Gli-B2ae*; італійські – *Gli-D1k*, *Gli-A2g*, *Gli-B2o*; хорватські – *Gli-A2e*, *Gli-B2e*; англійські – *Gli-A1af*, *Gli-A2l*, *Gli-B2l*, *Gli-D2g* (Metakovsky et al, 2018).

Автори Metakovsky et al. (2018) розділяють сорти пшениці, створені у 20 столітті, на п'ять кластерів залежно від гліадинового складу: перший – озимі сорти пшениці з Північно-Західної Європи (Франція, Німеччина, Нідерланди, Великобританія); другий – ярі сорти пшениці з країн, які не входили до СРСР (Австралія, Канада, Мексика, Португалія); третій – сорти Італії та Іспанії (ярі і зимові); четвертий – озимі сорти з Південно-Східної Європи (Болгарія, Угорщина, Україна, Румунія, Сербія, донські і краснодарські сорти).

В українських дослідженнях класифікація за Метаковським використовується у роботі Kozub et al. (2009), де було проаналізовано 77 українських сортів пшениці лісо-степової зони. Найбільш поширеними алелями виявилися *Gli-A1f*, *Gli-A1b*, *Gli-A1o*, *Gli-B1b*, *Gli-B1l*, *Gli-D1b*. У *Gli-A1* *Gli-B1* *Gli-D1* локусах було знайдено вісім, сім та сім різних алельних варіантів відповідно (Kozub et al., 2009).

У класифікації алельних варіантів гліадинів за Созиновим і Поперелею (1979), кожен блок містить позначення гліадину як *Gld*, тоді назву хромосоми і назву алеля цифрою, наприклад *Gld 1A4*. Каталог містить 39 сортів і кожного гліадинкодуєчого локусу описана наступна кількість алельних варіантів: *Gli-A1* – 16, *Gli-B1* – 18, *Gli-D1* – 9, *Gli-A2* – 12, *Gli-B2* – 11, та *Gli-D2* – 10. Дослідження поліморфізму гліадинових локусів за класифікацією Поперелі та Созинова у вітчизняних сортів пшениці здійснювалося Поперелею, Созиновим, Копусем, Собко, Благодаровою, Рибалкою та ін. (Созинов, Попереля, 1979; Копусь, 1994; Рибалка та ін. 2012).

Комбінації алельних варіантів за даною класифікацією широко досліджувалися за різними показниками хлібопекарської якості, на основі чого було визначено внесок кожного алельного варіанту в хлібопекарську якість. Алельний стан гліадинкодуєчих локусів впливає на показники седиментації, силу муки та на лабораторну випічку. Найбільші відмінності по всіх показниках якості

борошна спостерігалися між лініями, що відрізнялися алельними варіантами, які локалізовані на хромосомі 1В.

На основі великого експериментального матеріалу Ф. А. Попереля та О. О. Сознов (Созинов, Попереля, 1979) провели ранжування алельних варіантів гліадинів за ступенем їх впливу на якість зерна і отримав наступні дані:

GLD 1A7 > GLD 1A4 > GLD 1A2 > GLD 1A5 > GLD 1A3 > GLD 1A1 ≥
GLD 1A6

GLD 1B1 > GLD 1B2 ≥ GLD 1B7 > GLD 1B5 > GLD 1B4 > GLD 1B3 >
GLD 1B6

GLD 1D4 > GLD 1D5 > GLD 1D1 > GLD 1D2 > GLD 1D3

GLD 6A3 > GLD 6A1

GLD 6B2 > GLD 6B1

GLD 6D2 > GLD 6D1 > GLD 6D3

Всі високоякісні сильні пшениці мають, як правило, не один, а два-три «хороших» алельних варіантів гліадинів. Позитивний вплив на якість мають алельні варіанти розташовані у лівій частині ряду, з яких найбільш «хорошими» є GLD 1B1, GLD 1B2, GLD 1A4, алельні варіанти GLD 1A1, GLD 1A6, GLD 1B3 та GLD 1B6 різко знижують якість борошна.

Варто відзначити, що *Gli-1* локус зчеплений з різними генами стійкості *R*, такими як стійкість до листової (*LR* гени), стеблової або бурої іржі (*SR* гени), борошнистої роси (*PM* гени) та групи генів *NLR* (білки, що містять nucleotide-binding site (*NBS*) із повторювальним доменом, багатим на лейцин leucine-rich repeat domains (*LRR*) та *RLK* (receptor-like kinases), що відіграють важливу роль у розпізнаванні патогену (Huang et al., 2003; Spielmeier, Lagudah, 2003; Hafeez et al., 2021; Нuo, Zhu et al., 2018; Dong et al., 2016). Також було показано, що деякі алельні варіанти можуть асоціюватися з проявом морозостійкості, певною висотою рослини, певними показниками маси 1000 зерен. Так, блок GLD 1B3, який є маркером 1B/1R транслокацій, негативно впливає на якість борошна, проте сорти із цим алельним варіантом є несприйнятливим, для всіх рас стеблової

іржі, а також збільшує висоту соломини (Созинов, 1985). Кращу морозостійкість мають лінії з блоками GLD 1D5 та GLD 1A1, на відміну від GLD 1B8, який часто елімінується (при вирощуванні в нашому кліматі) через понижено морозостійкість (Созинов, 1985). Даний факт пояснює географічний розподіл алельних варіантів через природній відбір, а не тільки за рахунок селекції.

Так звані, «ідеальні» генотипові формули гліадину відрізняються залежно від зони вирощування, та часового періоду. Наприклад, у 70-ті роки для степу України такою формулою була 4.1.5.3.1.2, а вже у 80-ті – $(7>4).1.(5\geq 4).3.2.2.$ (Созинов, 1985).

Загалом *Gli-D* локуси проявляють значно менший поліморфізм, а внесок *Gli-B1* локусу є найбільшим. Селекція генотипів, краще пристосованих до специфічного навколишнього середовища, веде до редукції генетичного різноманіття (Allard, 1996).

1.6. Сучасні молекулярно-генетичні дослідження гліадинів

Велика частина сучасних молекулярно-генетичних досліджень гліадинів присвячена вивченню так званих епітопів целіакії та створенню гіпоалергенного глютену, оскільки, окрім високої поживної цінності, продукти виготовлені з пшениці м'якої можуть викликати ряд захворювань – алергію на пшеницю, целіакію, чутливість до клейковини, не пов'язану з целіакією (NCGS/NCWS), та ін (Рибалка, 2017).

Глютен-специфічна відповідь Т-клітин у тонкому кишківнику генетично схильних осіб, викликає аутоімунну хворобу – целіакію. Ген, порушення діяльності якого викликає целіакію, розміщений на короткому плечі шостої хромосоми каріотипу людини називається CELIAC1 (Ludvigsson, 2013), і присутній він у 1-3% людей (Mäkiet et al., 2003; Rewers, 2005; Catassi et al., 2014; Vriezinga et al., 2015). В осіб, які страждають на целіакію, ці пептиди поводяться як стресіндукувальні фактори, що модулюють кишковий епітелій та імунокомпетентні клітини кишківника (Cinova et al., 2007; Thomas et al., 2006).

Специфічні глютеніві пептиди, що утворилися в процесі травлення, можуть вбудовуватися в рецептори антигенів HLA DQ2/8 і спонукати відповідь CD4 Т-клітин власне пластинки слизової оболонки (*lamina propria*) (Vader, Ru et al., 2002; Vader, Kooy et al., 2002). Після чого ініціюється виділення секреторною тканиною трансглютамінази (tTG), яка деамідує глютамін, чим збільшує афінність пептидів до HLA DQ2/8, що у свою чергу збільшує відповідь Т-клітин. Зв'язані з глютенівими пептидами Т-клітини проліферують і диференціюються у Th1 клітинні ефектори, які є медіаторами кишкового запалення опосередковано через секрецію прозапального цитокіну (невеликі сигнальні пептиди) інтерферон-гамма (IFN- γ). Т-клітини також реактивні до тканинної трансамінази, і в кінцевому результаті призводять до деструкції кишкового епітелію шляхом генерування аутореактивних антитіл (Lindfors, Kaukinen, 2012).

Активний пошук і вивчення епітопів (послідовність з дев'яти амінокислот), що викликають целиакію розпочався вже з 2000-х років (Koning et al., 2005; Spaenij-Dekking et al., 2005; Arentz-Hansen et al., 2002; Shan et al., 2005; Sjöström et al., 1998; Vader, Ru et al., 2002; Sollid et al., 2012; Tye-Din et al., 2010). Ці епітопи локалізовані у повторювальних доменах проламінів (пшениці, жита, ячменю), які через високий вміст проліну погано перетравлюються протеолітичними ферментами (Sollid et al., 2012). Деякі з них присутні у глютенінах, але більшість належить саме гліадинам пшениці, особливо α - та γ -типам (Рибалка, 2017).

У роботі Shewry, Tatham (2016) говориться про 31 епітоп, який може викликати целиакію. З них шість, одинадцять та два належать α -, γ - та ω -гліадинам пшениці відповідно, інші відносилися до глютенінів, секалінів чи гордеїнів. Проте, у дослідженнях Qi et al. (2014) присутні дев'ять γ -гліадинових епітопів, з яких лише два зі списку Shewry, Tatham (2016).

Найбільш токсичним (імунодомінантним) вважається 33-мерний пептид (LQLQPFPRQLPYRQPRQLPYRQPRQLPYRQPRQPF), який присутній в α 2-гліадину (Shan et al., 2002; Schalk et al., 2017; Shan et al., 2005). Даний пептид містить три

епітопи, що реагують з Т-клітинами: PFPQPQLPY (DQ2.5-glia- α 1a, одна копія), PYPQPQLPY (DQ2.5-glia- α 1b, дві копії) та PQPQLPYPQ (DQ2.5-glia- α 2, три копії), чим викликає сильну імунну відповідь (Shan et al., 2004; Stepniak et al., 2006; Knorr et al., 2016). Даний пептид стійкий до перетравлювання пепсином і трипсином Tye-Din et al. (2010). Група авторів Arentz-Hansen et al. (2000), були першими, хто ідентифікував 33-мерний пептид у норвезькому сорті Mjølner. ДНК-секвенування показало наявність цього пептиду лише в одній (α 2) із 11 α -гліадинових послідовностей (Arentz-Hansen et al., 2000).

Кількість епітопів і їх різноманітність залежить не тільки від типу гліадину, але й від субгеному. Вченими van Herpen et al. (2006), було проаналізовано чотири епітопи (glia- α , glia- α 2, glia- α 9, glia- α 20) та встановлено їх розподіл серед послідовностей α -гліадинів з різних субгеномів. У *Gli-A2* локусі трапляються лише glia- α 9 та glia- α 20 епітопи, послідовності *Gli-D2* локусу містили усі чотири епітопи, а в *Gli-B2* локусі епітопи були практично відсутні, окрім двох генів з glia- α , тобто гліадини, що кодуються В субгеономом є менш імуногенними, ніж гліадини D субгеному (van Herpen et al., 2006; Anderson et al., 1997).

Широке геномне дослідження епітопів целиакії було здійснене для сорту Xiaoyan 81. Тридцять вісім знайдених гліадинових генів було проаналізовано на наявність 24 епітопів. Одинадцять γ -гліадинів, п'ять α - (з *Gli-D2*), та чотири ω -гліадинові послідовності характеризувалися наявністю великої кількості епітопів, і лише у семи α -, одного ω - та δ -гліадину епітопи повністю відсутні (Wang et al., 2017). Оскільки різні сорти несуть різну кількість епітопів, то імовірно, алельні варіанти гліадинів також можуть відрізнятися за кількістю епітопів та токсичністю при целиакії.

Ведеться багато дискусій щодо широкої варіації в поширенні епітопів целиакії у різних локусах та створення «безпечних» сортів пшениці різними молекулярними методами (Shewry, Tatham, 2016). Варіанти епітопів, які не впізнаються Т-клітинами існують, але завжди вони знаходяться у комбінації з

іншими високоімуногенними епітопами (Mitea et al., 2010; van Herpen et al., 2006; van den Broeck et al., 2010; Salentijn et al., 2013). На даний момент, доведено, що у ліній чи сортів з делеціями *Gli-D2* локусу різко знижується кількість шкідливих епітопів, та, навіть, збільшуються хлібопекарська якість, за рахунок компенсаторної експресії інших проламінів (Li et al., 2018). Випробовується методика редагування генів CRISPR/Cas9 для створення гіпоімуногенного глютену, через точкові мутації для зсуву рамок зчитування, чи делеції послідовностей епітопів, було запропоновано чотири конструкції CRISPR/Cas9_sgRNA для модифікації різних типів гліадинів (Jouanin et al., 2019). Досить часто для створення ліній з низьким рівнем глютену використовують генну інженерію та РНК-інтерференцію (Wieser et al., 2006; Becker et al., 2012; Gil-Humanes et al., 2010). Рядом дослідників було застосовано РНК-інтерференцію, що знизила експресію гліадинів на 97%. Дане зерно не стимулювало Т-клітини, проте його хлібопекарська якість була сильно знижена (Gil-Humanes et al., 2012; Gil-Humanes et al., 2014). Таким же способом авторами Becker et al. (2012) було знижено експресію 20 α -гліадинів, але за рахунок компенсаторних механізмів збільшилася експресія інших запасних білків, в результаті змінилося співвідношення глютенінів і гліадинів та знизилася хлібопекарська якість (зменшився об'єм хліба).

Отже створення безпечних при целиакії сортів є реалістичним завданням, для якого повинні бути залучені як класична селекція та схрещування, так і новітні молекулярні технології.

Крім вище описаного напряму досліджень, гліадинові гени активно використовуються при створенні молекулярних маркерів для відбору та порівняння матеріалу для селекції.

Використання ДНК маркерів для збільшення ефективності і точності звичайної селекції отримало назву маркер-асоційована селекція (MAS). За допомогою молекулярних маркерів можна ідентифікувати локуси кількісних ознак, алелі генів чи мутації, що дозволяє з великої кількості ліній якісно і точно

вести відбір потрібних генотипів, ще до появи у них специфічного фенотипу, цим самим значно пришвидшувати процес селекції. Залежно від типу послідовності є STS (Sequence Tagged Sites), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), IPBS (Inter Primer Binding Site), RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), SNP (Simple Nucleotide Polimorphism) маркери та ін. (Tautz et al., 1986; Röder et al., 1995; Brenchley et al., 2012; Kalendar et al., 2010).

Алельспецифічні маркери дають можливість визначити алель через поліморфізм за довжиною фрагментів ампліфікації або наявністю / відсутністю фрагмента, а, відповідно і конкретного алеля. Складність пошуку алельспецифічних молекулярних маркерів для гексаплоїдної пшениці, які б показували алельний варіант гліадинів *Gli-1* та *Gli-2* локусів полягає у тому, що електрофоретичні блоки гліадинів – це продукти декількох тісно зчеплених генів, схожих між собою, які представляють значну ділянку хромосоми, насичену повторами. Тому на даний момент для гліадинів такі маркери відсутні, на відміну від менш чисельних локусів HMW та LMW глютенінів, для алельних варіантів яких уже розроблено і використовується цілий ряд молекулярних маркерів (Wang et al., 2009; Wang et al., 2010; Liu et al., 2008).

Для гліадин-кодуєчих локусів відомо декілька мікросателітних (SSR) маркерів: *Taglgap* для γ -гліадинового псевдогену з мотивом (CAA)₁₅, (Devos et al., 1995); праймери до внутрішньогенних мікросателітів *wggm-P3-a1* для мотивів (CAG)₆ та (CAA)₈ α -гліадинів, *wggm-N-01* для (CAA)₈ β -гліадинів, *wggm-P3-b1* (CAC)₄ та (CAA)₁₀ ω -гліадинів (Кирієнко, Михайлик, 2015).

На основі секвенованої послідовності ДНК двох псевдогенів (1A та 1B хромосом) та гаммагліадинового гену (1D) Zhang et al. (2003) були розроблені три пари алельспецифічних до SNP праймерів у локусах *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1*. Особливість дизайну таких праймерів заключається в тому, що зворотній праймер (R) у них спільний, а прямі (F) – відрізняються лише за одним нуклеотидом з 3' кінця, що визначає алель SNP. А також F-праймери відрізняються від послідовності матриці ДНК ще на один нуклеотид у третьому

положенні від 3' кінця. Було доведено, що певні місматччі в 3' позиції (Т:Т, Т:С, Т:G, G:G та А:С) можуть призводити до ефективної ампліфікації продукту ПЛР, як з повністю комплементарним праймером, за таких же умов, місматч А:А помірно знижує ампліфікацію, а при А:G і С:С ампліфікація повністю відсутня. Однонуклеотидні місматччі в першій, другій, або третій позиції від першого 3' нуклеотида, між праймером і матрицею ДНК, на вихід продукту ПЛР вагомо не впливають. Проте наявність додаткового місматччу в одній з чотирьох позицій 3'-кінця призводить до відсутності продукту ампліфікації (Kwok et al., 1990).

Праймери, розроблені Zhang et al. (2003) призначалися для детекції 1RS/1BL транслокацій та розглядалися як потенційні маркери для *Glu-3* локусу. Проте, у роботі Поліщук та ін. (2010) на 12 сортах та лініях пшениці була показана відповідність алельних варіантів гліадинів та алелів, визначених за допомогою праймерів Zhang et al. (2003).

Алель-специфічні (STS) праймери до 25 α -гліадинових генів *Gli-A2*, *Gli-B2* та *Gli-D2* локусів, та до двох γ -гліадинів (*Gli-A1*, *Gli-B1* локусів) і одного ω -гліадинового гену (*Gli-D1* локусу) були розроблені авторами Wang et al. (2017) та Kawaura et al. (2005), з метою картування, секвенованих ними послідовностей. У 2015 році Noma et al. (2015) було розроблено 11 пар праймерів до α -гліадинів, які використовувалися в зворотній ПЛР (RT RCR) для картування та аналізу рівня експресії гліадинів. Метод зворотної ПЛР з вісьмома парами праймерів використовується також для ізоляції мРНК гліадинових генів та подальшого їх секвенування у роботі Camerlengo et al. (2017).

Дослідниками Li et al. (2018) було розроблено шість ДНК маркерів, які призначалися для аналізу варіації *Gli-D2* локусу в *Ae. tauschii*, та сортів пшениці Chinese Spring і Xiaoyan 81. *M1* розташований в кодуєчій послідовності α -*D1* гені, *M5* та *M6* – у послідовностях, що повторюються. Дані маркери показали не тільки міжвидовий поліморфізм, але й міжсортний (Li et al., 2018). Відомо також декілька універсальних праймерів до α - та γ -гліадинових генів, які призначені

для ампліфікації різних гліадинових послідовностей, які потім секвенуються (Qi et al., 2014; Arentz-Hansen et al., 2000).

Ще шість та вісім пар праймерів для застосування методу RT-PCR, розроблено авторами Paris et al. (2021) для пшениці твердої для визначення експресії секвенованих і описаних гліадинових генів у сорту Svevo та аторами Zhou, Liu et al. (2022) для пшениці м'якої, відповідно.

Незважаючи на таку велику кількість розроблених молекулярних маркерів, більшість з них не підходять для потреб маркер-асоційованої селекції, оскільки вони не показують алельний стан генів, чи алельних варіантів гліадинів. Але, якщо дані маркери проявляють міжсортовий поліморфізм, вони можуть асоціюватися з певними ознаками і алельними варіантами.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали

У якості матеріалів для дослідження, використовували чотири групи сортів пшениці м'якої:

1. Світова колекція – 50 сортів пшениці м'якої, які походять з 15 різних країн, та відрізняються за алельними варіантами гліадинів, що кодуються локусами *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* (табл. 2.1), створена та надана для дослідження д.б.н. Є. В. Метаковським (Політехнічний університет, м. Мадрид, Іспанія). Дана колекція використовувалася для порівняння з українськими сортами, алельні варіанти гліадинів були визначені заздалегідь у дослідженнях Metakovsky et al., (2018). Колекція створена таким чином, щоб вона відображала максимальний поліморфізм алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом.

Таблиця 2.1

Перелік сортів та ліній пшениці м'якої світової колекції та інших сортів іноземного та українського походження

№	Назва сорту	Країна	Рік реєстрації сорту	Алель <i>Gli-A1</i>	Алель <i>Gli-B1</i>	Алель <i>Gli-D1</i>
Світова колекція сортів надана Є. В. Метаковським						
1	Aragon-03	Іспанія	1940	<i>m</i>	<i>o</i>	<i>i</i>
2	Ardec	Бельгія	1979	<i>f</i>	<i>h</i>	<i>d*</i>
3	Argelato	Італія	1964	<i>a</i>	<i>g</i>	<i>b+a</i>
4	Arminda	Нідерланди	1976	<i>af</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
5	Bezostaya-1*	Росія	1959	<i>b</i>	<i>b+d</i>	<i>b</i>
6	Caia	Португалія	-	<i>a</i>	<i>h</i>	<i>f</i>
7	Cajeme-71	Мексика	1971	<i>o</i>	<i>d</i>	<i>a</i>
8	Capelle-Desprez	Франція	1946	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
9	Cartaya	Іспанія	1983	<i>a</i>	<i>l</i>	<i>b</i>
10	Chinese-Spring	Китай	-	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
11	Cluij-650	Румунія	1954	<i>o</i>	<i>j</i>	<i>a</i>

12	Darius	Франція	1974	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>null</i>
13	Diego	Іспанія	1983	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
14	Donskaya polykarlikovaya	Росія	1984	<i>b+f</i>	<i>d</i>	<i>a</i>
15	Escualo	Іспанія	1981	<i>a</i>	<i>e*</i>	<i>b</i>
16	Federation	Австралія	1901	<i>af</i>	<i>i</i>	<i>i</i>
17	Gabo	Австралія	1942	<i>g</i>	<i>b</i>	<i>f</i>
18	Galahad	Велика Британія	1982	<i>ab</i>	<i>g</i>	<i>b*</i>
19	Gazul	Іспанія	1992	<i>c</i>	<i>r</i>	<i>b</i>
20	Glenlea	Канада	1972	<i>m</i>	<i>e</i>	<i>j</i>
21	Goelent	Франція	1985	<i>af</i>	<i>q</i>	<i>a</i>
22	Inia-69*	Мексика	1966	<i>a</i>	<i>p</i>	<i>i+a</i>
23	Insignia	Австралія	1946	<i>af</i>	<i>i</i>	<i>i+j</i>
24	Intensivnaya	Казахстан	1978	<i>n+b</i>	<i>n</i>	<i>a+b</i>
25	Katerwa	Канада	1981	<i>m</i>	<i>d</i>	<i>j</i>
26	Kavkaz	Росія	1972	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>f+b</i>
27	Krasnodonka	Україна	1969	<i>b</i>	<i>h*</i>	<i>q</i>
28	Laura	Канада	1986	<i>r</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
29	Libero	Італія	1927	<i>a+af</i>	<i>k</i>	<i>b</i>
30	Marquis	Канада	1907	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
31	Mentana	Італія	1913	<i>a</i>	<i>k</i>	<i>a</i>
32	Mironovskaya - 808*	Україна	1963	<i>f</i>	<i>b</i>	<i>g</i>
33	Newcaster	США	1946	<i>l</i>	<i>h</i>	<i>a</i>
34	Pane-247	Іспанія	1960	<i>a</i>	<i>k</i>	<i>b</i>
35	Pavon-F-76 (Betres, Spain)	Мексика	1976	<i>af</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
36	Potam-70	Мексика	1970	<i>a</i>	<i>p+q</i>	<i>f+a</i>
37	Prinqual	Франція	1978	<i>f</i>	<i>c</i>	<i>a</i>
38	Recital	Франція	1986	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
39	Rinconada	Іспанія	1981	<i>o</i>	<i>d</i>	<i>a</i>
40	Roblin	Канада	1986	<i>af</i>	<i>d</i>	<i>f</i>
41	Salmone	Італія	1980	<i>l</i>	<i>s</i>	<i>b</i>
42	Sideral	Франція	1990	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
43	Siete-Cerros-66	Мексика	1966	<i>a+g</i>	<i>c</i>	<i>b</i>
44	Splendeur	Франція	1964	<i>o</i>	<i>f</i>	<i>b</i>
45	Suneca	Австралія	1981	<i>o</i>	<i>d</i>	<i>f</i>
46	Titien	Франція	1985	<i>o</i>	<i>m</i>	<i>b</i>
47	Yecora-Rojo	США	1975	<i>o</i>	<i>d</i>	<i>a</i>
48	1B ⁻ ,1D ⁻ (лінія)			<i>a</i>	-	-
49	N10T1B (лінія)				<i>a</i>	

50	N1BT1D (лінія)			<i>a</i>	-	<i>a</i>
Сорти та лінії пшениці м'якої з дослідження Поліщук та ін. (2010)						
51	Альбатрос од.	Україна		<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
52	Любава одеська	Україна		<i>b</i>	<i>b,d</i>	<i>b,j</i>
53	Струмок	Україна		<i>o</i>	<i>d</i>	<i>b</i>
54	GLI-A1-1	Україна	1994	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
55	GLI-B1-3	Україна	1994	<i>b</i>	<i>l</i>	<i>b</i>
56	GLI-B1-4	Україна	1994	<i>b</i>	<i>g</i>	<i>b</i>
57	GLI-B1-12	Україна	1994	<i>b</i>	<i>o</i>	<i>b</i>
58	GLI-D1-4	Україна	1994	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>j</i>
59	GLI-D1-5	Україна	1994	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>g</i>
Сорти із генбанків Leibniz institute of plant genetics and crop plant research (Німеччина) та Agriculture and Agri-Food Canada (Канада)						
60	Aquila	Велика Британія	1972	<i>af</i>	<i>f</i>	<i>l</i>
61	Bison	Франція	1992	<i>f</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
62	Cheyenne	США	1933	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>g</i>
63	Claudius	Італія	1979	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
64	Girka	Україна		?	?	?
65	Hard Red Calcutta	Індія	1890	?	?	?
66	Kadett	Швеція, Франція	1981	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
67	Ladoga	Росія	1888	?	?	?
68	Pegaso	Італія	1987	<i>a</i>	<i>k</i>	<i>f</i>
69	Red Fife	Канада	1842	?	?	?
70	Skorospelka	Україна		?	?	?
71	Yu tzu mai	Китай		?	?	?
72	Zhemai 1	Китай	1970	?	?	?
73	Zhemai 2	Китай	1973	?	?	?

*Для досліджень використовувалося зерно сортів Безоста 1 та Миронівська 808 із колекції Є В. Метаковського, тому їх назви записані латиницею як у каталозі Metakovsky et al. (2018).

- Сорти та лінії пшениці м'якої, що досліджувалися у роботі Поліщук та ін. (2010) – сорти Любава одеська, Альбатрос одеський, Струмок та шість ізогенних ліній, що створені М. М. Копусем (1994) на основі сорту Безоста 1 й відрізняються за алельними варіантами гліадинів (табл. 2.1). Даний матеріал використовувався для порівняння результатів з ПЛР-аналізу із алель-специфічними праймерами до *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів.

3. Сорти пшениці м'якої із генбанків Leibniz institute of plant genetics and crop plant research (м. Гатерслебен, Німеччина) та Agriculture and Agri-Food Canada (Канада) – чотирнадцять сортів пшениці м'якої, які додатково були взяті для досліджень з метою розширення географії (сорти із Китаю) та аналізу більш давніх українських сортів (сорти, вивезені в Канаду у ХІХ столітті, що використовувалися для створення інших сортів) (табл. 2.1).
4. Українська колекція – 88 сучасних українських сортів пшениці м'якої з провідних селекційних центрів: Селекційно-генетичного інституту – національного центру насіннєзнавства та сортовивчення (25 сортів), Миронівського інституту пшениці імені В. М. Ремесла Національної академії аграрних наук України (22 сорти), Білоцерківської дослідно-селекційної станції (11 сортів), Інституту зрошувального землеробства НААН України (м. Херсон) (10 сортів), Полтавської державної аграрної академії (10 сортів), Носівської селекційно-дослідної станції (9 сортів та ліній), науково-виробничої фірми «Дріада» (1 сорт), Донецького інституту агропромислового виробництва НААН України (1 сорт), Луганського інституту селекції і технологій (2 сорти) (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Колекція сучасних українських сортів пшениці м'якої

№	Назва сорту	Рік реєстрації сорту
Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення		
1	Антонівка	2008
2	Борвій	2010
3	Ватажок	2011
4	Ветеран	2014
5	Відповідь одеська	2020
6	Віген	2014
7	Гурт	2013
8	Жайвір	2010
9	Зміна	2018

10	Куяльник AR	-
11	Ліра одеська	2013
12	Мелодія одеська	2014
13	Мудрість I	-
14	Мудрість II	-
15	Мудрість III	-
16	Мудрість IV	-
17	Наснага	2015
18	Оптіма одеська	2018
19	Панна	2014
20	Подяка	2008
21	Селянка	2003
22	Традиція I	-
23	Традиція II	-
24	Хист	2013
25	Щедрість	2014
Миронівський інститут пшениці		
26	МПП Ассоль	2018
27	Балада Миронівська	2018
28	Вежа миронівська	2018
29	МПП Вишиванка	2017
30	Грація миронівська	2018
31	МПП Дніпрянка	2018
32	Естафета миронівська	2018
33	Зимоярка	2007
34	Крижинка	2002
35	Мадярка	2008
36	Миронівська 61	1989
37	Миронівська 65	2000
38	Миронівська золотоверха	2012
39	Миронівська слава	2017
40	Оберіг миронівський	2014
41	Пам'яті Ремесла	2009
42	Подолянка	2003
43	Світанок миронівський	2014
44	Трудівниця миронівська	2017
45	Ювіляр миронівський	2009
Білоцерківська селекційно-дослідна станція		
46	Білоцерківська напівкарликова	1999
47	Відрода	2010
48	Водограй білоцерківський	2014
49	Либідь	2006

50	Лісова пісня	2008
51	Перлина лісостепу	2001
52	Романтика	2009
53	Царівна	2008
54	Чародійка білоцерківська	2011
55	Щедра нива	2011
56	Ясочка	2006
Інститут зрошувального землеробства НААН України м. Херсон		
57	Анатолія	2015
58	Благо	2011
59	Бургунка	2015
60	Конка	2014
61	Кохана	2009
62	Кошова	2016
63	Ледя	2016
64	Марія	2013
65	Овідій	2009
66	Херсонська безоста	2002
Полтавська державна аграрна академія		
67	Вільшана	2010
68	Говтва	2013
69	Левада	2005
70	Лютенька	-
71	Оржиця	2013
72	Сагайдак	2010
73	Сидор Ковпак	-
74	Соната	2018
75	Українка полтавська	-
76	Царичанка	2013
Носівська селекційно-дослідна станція		
77	Аріївка	2017
78	Зоряна Носівська	-
79	лінія КС1	-
80	лінія КС14	-
81	лінія КС22-04	-
82	лінія Л41/95	-
83	лінія Л59-95	-
84	Ювівата 60	2013
Донецький інститут агропромислового виробництва НААН України		
85	Білосніжка	2006
86	Донецька 48	1997
Науково-виробнича фірма «Дріада»		

87	Кларіса	2014
Луганський інститут селекції і технологій		
88	Металіст	2014

Відомі заздалегідь алельні варіанти гліадинів у сортів, що досліджувалися в роботах Metakovsky et al. (2018), Поліщук та ін. (2010), були внесені у таблицю 2.1. Дані по алельних варіантах гліадинів в українських сортів та деяких зарубіжних сортів, визначалися у наших дослідженнях.

Зернівки досліджуваних сортів було поділено на дві частини. Одну частину використовували для електрофорезу запасних білків, іншу – для виділення ДНК. Для кожного сорту аналізували по п'ять зернівок окремо, алельні варіанти гліадинів позначали за каталогом Метаковського (2018).

2.2. Електрофорез в кислому ПААГ

Алельні варіанти гліадинів для колекції сучасних українських сортів визначали в спільних дослідженнях з О. М. Благодаровою (СГІ – НЦНС) методом електрофорезу в кислому ПААГ за методикою Поперелі (1996).

Екстракція гліадинів. Для проведення електрофорезу запасних білків половинку зернівки гомогенізували до стану борошна, після чого додавали 0,25 мл 70% етанолу та інтенсивно перемішували впродовж 20-30 с. Через 15-20 хвилин проводили центрифугування впродовж 5 хв при 2 000 об/хв. Після чого переносили 0,1 мл спиртового розчину гліадину у нову пробірку, до якого додавали 0,2 мл розчину, що містить 0,5 М/л оцтової кислоти, 9,5 М/л сечовини та 0,001% піроніну Y. Для повної екстракції гліадинів залишок тричі промивають, центрифугуванням із додаванням 0,5 мл 70% етанолу.

Склад кислого поліакриламідного гелю для двох пластин 185x185x1 мм (загальний об'єм 70 мл) згідно з методикою Поперелі Ф. О. (1996):

5,6 г акриламідну;

0,233 г метиленбісакриламідну;

1,4 мл оцтової кислоти;

- 33,6 г сечовини 8 М;
- 58,5 мл дистильованої води;
- 0,14 мл ТЕМЕД;
- 7 мл водного розчину гліцину (1 г / 100 мл);
- 2,4 мл водного розчину аскорбінової кислоти (1 г / 100 мл);
- 1 мл семиводного сірчаноокислого закислого заліза (50 мг / 71 мл);
- 1 мл персульфату калію (525 мг / 25 мл).

Перед нанесенням на гель зразків, пробірки прогрівали у кип'ячій воді впродовж п'яти хвилин без попереднього центрифугування. Для фарбування використовувалася фарба запропонована Fullington et al. (1980) із заміною метанолу на ацетон чи етанол (персональне повідомлення О.М. Благодарової).

Електрофореграми алельних варіантів гліадинів, отримані даним методом виглядають майже ідентично із електрофореграмами, отриманими у крохмальному гелі. Ідентифікацію алельних варіантів гліадинів проводили спільно з О.М. Благодаровою (СГІ –НЦНС) й користувалися двома каталогами: авторів Sozinov, Popereleya (1980) та Metakovsky et al. (2018). Деякі алельні варіанти, які не вдалося ідентифікувати, ні за каталогом Sozinov, Popereleya (1980), ні за каталогом E. V. Metakovsky (2018), оскільки у першому представлена менша кількість алельних варіантів, а в другому алельні варіанти отримані за іншою методикою і можуть відрізнятися від першого, були позначені як нові.

2.3. Метод екстракції ДНК

Екстракцію ДНК більшості сортів здійснювали із половинок сухого зерна пшениці (які залишилися після електрофорезу в кислому ПААГ), за модифікованою методикою з використанням лізуючого СТАВ буферу (Doyle, Doyle, 1990).

Протокол екстракції:

1. Лізис. До подрібненої зернівки додавали 500 мкл лізуючого буферу зі СТАВ (1,4 М NaCl, 20 мМ ЕДТА, 100 мМ Трис-HCl, рН 8 при 25°C, 2% СТАВ (ЦТАБ – цетилтриметиламонійбромід) та залишали на інкубацію протягом 60 хв при температурі 65°C.

2. Осадження білкової фракції. Після інкубації до суміші додавали 500 мкл хлороформ-ізоамілової суміші, у співвідношенні 24:1. Ретельно перемішували на Vortex і центрифугували 5хв при 13 тис. об./хв, використовуючи центрифугу MiniSpin фірми Eppendorf.

3. Осадження ДНК. Після центрифугування переносили супернатант у чисті епандорфи і додавали 0,6 об'єму холодного ізопропілового спирту та залишали зразки на 5 хв в морозильній камері. Обережно перемішували і центрифугували 5хв при 13 тис. об./хв.

4. Промивка осаду ДНК. Зливали супернатант і до отриманого осаду ДНК додавали 1000 мкл 70% спирту. Перемішували на Vortex і центрифугували 5 хв при 13 тис. об./хв, після чого зливали супернатант. Дану процедуру повторювали ще два рази, додаючи вже по – по 500 мкл етанолу.

5. Осад нуклеїнових кислот висушували і розчиняли в дистильованій воді. Залежно від величини осаду додавали 50-100 мкл H₂O.

6. Концентрацію ДНК вимірювали на спектрофотометрі NanoDrop2000 фірми Thermo Scientific.

Для невеликої частини матеріалу (для підготовки ДНК, яка використовувалася в ПЛР для підготовки до секвенування, чи дуже старого зерна) ДНК екстрагували за допомогою набору SureFood PREP Basic фірми CONGEN Biotechnology, BioRad.

Протокол екстракції:

1. Лізис. До подрібненої половинки зернівки у 2 мл пробірку додавали 400 мкл Lysis Buffer та 20 мкл Proteinase K, перемішували та інкубували за температури 65°C впродовж 30 хв.
2. Осадження ДНК. Після інкубації центрифугували 5 хв при 12 000 об/хв, після чого відбирали супернатант у нову 1,5 мл пробірку та додавали до неї 200 мкл Binding Buffer і перемішували.
3. Осадження ДНК на колонку. Отриману суміш наносили на колонку і центрифугували 1 хв при 12 000 об/хв, після чого замінювали нижню частину колонки.
4. Промивання перше. Додавали 550 мкл Pre-Wash Buffer і центрифугували 1 хв при 12 000 об/хв, після чого видаляли відцентрифуговану рідину із нижньої частини колонки.
5. Промивання друге і третє. Додавали 550 мкл Wash Buffer і центрифугували 1 хв при 12 000 об/хв, після чого видаляли відцентрифуговану рідину із нижньої частини колонки, процедуру повторювали двічі.
6. Просушування. Видаляли відцентрифуговану рідину із нижньої частини колонки, після чого центрифугували 2 хв при 12 000 об/хв.
7. Елюція. Верхню частину колонки із фільтром переносили у нову 1,5 мл пробірку додавали 100 мкл попередньо нагрітого до 65°C Elution Buffer, центрифугували 1 хв при 12 000 об/хв.

Концентрацію ДНК вимірювали на спектрофотометрі Nanodrop 2000 фірми ThermoScientific. ДНК розводили до концентрації 100 нг/мкл. Готові розчини ДНК зберігали в морозильній камері при температурі -20°C.

2.4. Алель-специфічна ПЛР, ПЛР з праймерами до мікросателіту, мультиплексна ПЛР

Для аналізу поліморфізму *Gli-1* локусів використовувалися праймери розроблені Zhang et al. (2003) які орієнтовані на SNP (однонуклеотидні поліморфізми), що розташовані у γ-гліадинових генах та псевдогенах локусів *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Нуклеотидні послідовності праймерів, що використовувалися у дослідженні

Локус/алель/праймер*			Нуклеотидна послідовність 5'- -3'
<i>Gli A1</i>	<i>Gli A1.1</i>	F	CATAGCGTCGTGCATTCCAAC <u>G</u>
		R	GCACATGTTTGGGAAGGGATC
	<i>Gli A1.2</i>	F	CATAGCGTCGTGCATTCCAACA <u>A</u>
		R	GCACATGTTTGGGAAGGGATC
<i>Gli B1</i>	<i>Gli B1.1</i>	F	TGATCTGGCCACAAAGGG <u>A</u>
		R	CATTGGCCACCAATTCCTGT
	<i>Gli B1.2</i>	F	TGATCTGGCCACAAAGGG <u>C</u>
		R	CATTGGCCACCAATTCCTGT
<i>Gli D1</i>	<i>Gli D1.1</i>	F	AAGCGATTGCCAAGTGATGCG
		R	GTTTGCAACACC <u>A</u> ATGACGTA
	<i>Gli D1.2</i>	F	AAGCGATTGCCAAGTGATGCG
		R	GCAAGAGTTTGCAACAGC <u>G</u>
<i>Taglgap</i>		F	GCAGACCTGTGTCATTGGTC
		R	GATATAGTGGCAGCAGGATACG
<i>MsA1</i>		F	GCAACAATGTTGCCAACAAC <u>T</u> A
		R	AGCTGAAATAGTGGCCG <u>C</u> A

* F – прямиий праймер, R – зворотній праймер

Крім алель-специфічних праймерів використовували праймери до мікросателіту *Taglgap*, локалізованого у *Gli-B1* локусі, та власні розроблені праймери до мікросателітної посіловності САА *Gli-A1* та *Gli-B1* локусів (табл. 2.3).

Для ПЛР з усіма переліченими у таблиці 2.3 праймерами, використовували стандартні реактиви фірми ThermoScientific. Загальний об'єм реакційної суміші становив 10 мкл. Склад суміші:

- 2,0 мкл ДНК
- 0,5 мкл 25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 1,0 мкл 10x DreamTaq Buffer для ПЛР
- 0,5 мкл F праймер
- 0,5 мкл R праймер
- 0,05 мкл *DreamTaq*-полімераза (0,25U)
- 5,45 мкл H₂O.

Для підвищення специфічності реакції з праймерами до *Gli-A1* та *Gli-D1* для деяких сортів, використовувалася ще одна реакційна суміш на основі iTaq Universal Probes Supermix (виробник BioRad), який в своєму складі містить Hotstart ДНК-полімеразу. Загальний об'єм реакційної суміші становив 10 мкл. Склад суміші:

- 2,0 мкл ДНК
- 5,0 мкл iTaq Universal Probes Supermix
- 1,0 мкл F праймер
- 1,0 мкл R праймер
- 1,0 мкл H₂O

ПЛР проводили на ампліфікаторі «Analytik Jena» (Flex Cycler, Німеччина). Усі алель-специфічні праймери мають однакову температуру відпалу, і для них рекомендована однакова програма ампліфікації (Zhang et al., 2003):

1. Попередня денатурація: 95°C – 1 хв (3 хв при використанні Hotstart ДНК-полімерази);
2. 38 циклів синтезу фрагмента:
 - денатурація 95°C – 30 с;
 - відпалювання: 56°C – 30 с;
 - елонгація: 72°C – 1 хв;
3. заключна елонгація кінців: 72°C – 10 хв.

Дана програма ампліфікації використовувалася також для ПЛР з праймерами до мікросателіту *Taglgap* (табл 2.3) та до власних розроблених праймерів *MsA1*, зі зміною лише температури відпалу на 55°C, що рекомендована Devos et al. (1995) для *Taglgap*, та 54°C для *MsA1*, що була підібрана експериментально через ПЛР з градієнтом температури.

Мультиплексна ПЛР використовувалася для сортів та ліній із 1RS/1BL транслокаціями, або делеціями *Gli-B1* чи *Gli-D1* локусу. У реакційній суміші використовували по дві пари праймерів: одну основну – до алелів *Gli-B1* чи *Gli-D1* локусів, та додаткову у якості позитивного контролю, яка б забезпечувала наявність фрагментів ампліфікації іншого гену, присутнього у всіх зразків. Склад реакційної суміші:

- 0,5 мкл 10mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 1,0 мкл 10x буфер DreamTaq для ПЛР
- 0,5 мкл F праймер основний (*Gli-B1.1 F* або *Gli-B1.2 F* або *Gli-D1 F*).
- 0,5 мкл R праймер основний (*Gli-B1 R* або *Gli-D1.1 R* або *Gli-D1.2 R*)
- 0,5 мкл праймер *Gli-A1.1 F*
- 0,5 мкл праймер *Gli-A1.2 F*

- 0,5 мкл праймер *Gli-A1 R*
- 0,05 мкл *DreamTaq*-полімераза (0,25U)
- 3,95 мкл H₂O.

У якості додаткової пари праймерів було використано комбінацію із трьох алель-специфічних праймерів до *Gli-A1* локусу, які дають фрагменти ампліфікації однакового розміру – 168 п.н., що значно відрізняється від довжини фрагментів ампліфікації основної пари – алель-специфічних праймерів до *Gli-B1* чи *Gli-D1* локусів (264-415 п.н.) та підходять за температурою відпалу.

2.5. Електрофорез продуктів ампліфікації в 7% поліакриламідному гелі

Продукти ампліфікації, фракціонували методом вертикального електрофорезу в 7% поліакриламідному гелі, розміром 200x200x0,75 мм. Для приготування 1 гелю використовували:

3,55 мл 10×TBE буферу (10,8 г Трис, 5,5 г борної кислоти, 0,75 г Трилону Б на 100 мл H₂O); 8,22 мл 30% розчину акриламіду (29 г акриламіду, 1 г бісакриламіду на 100 мл дистильованої води); 23,22 мл дистильованої H₂O. Потім відбирали 2 мл розчину на «смужку», і додавали до нього персульфат амонію 100 мкл та TEMED (тетраметилетилендіамід) – 10 мкл, після полімеризації «смужки», до розчину, що залишився додавали персульфат амонію 350 мкл та TEMED – 35 мкл.

Електрофорез проводили при напрузі 300 В, протягом 2 год для продуктів ампліфікації *Gli-A1* та *Gli-D1* локусів і 2,5 год – для *Gli-B1*.

Поліакриламідні гелі фарбували за допомогою аргентум нітрату згідно рекомендацій Silver sequence TM DNA Sequencing System Technical Manual (Promega, 1999).

Методика фарбування гелів:

1. Поміщали гель у 10% розчин етанолу на 5 хв;
2. Витримували 3 хв в 1% розчині азотної кислоти, промивали 2 рази дистильованою водою.
3. Витримували у 0,12 М розчині AgNO_3 протягом 30 хв в темряві, потім промивали 3 рази.
4. Заливали частину відновного розчину (12 г Na_2CO_3 (безводний) 200 μl 0,019% формальдегід на 400 мл H_2O), після потемніння, повторювали процедуру, після забарвлення ДНК смуг промивали 2 рази H_2O .
5. Для фіксації забарвлення тримали декілька хвилин у 10% оцтовій кислоті і промивали водою.

2.6. Аналіз довжини фрагментів ампліфікації, визначення частот алелів та генетичної різноманітності

Розмір фрагментів ампліфікації, отриманих в ПЛР попередньо визначали в додатку Gel Analyzer для Android, а потім перевіряли у комп'ютерній програмі GelAnalyzer, яка будує криву залежності десяткового логарифму молекулярної маси фрагмента від відстані пройденої під час електрофорезу, відповідно до фрагментів маркерів молекулярної ваги Gene Ruler 100 bp або *pUC19/Msp I* та використовуючи дану залежність, знаходить десятковий логарифм маси відповідного фрагмента та його розмір (Маниатис и др., 1984). Програма доступна за посиланням <http://www.gelanalyzer.com/?i=1>.

Частоту алелів з урахуванням гетерогенності сорту, тобто якщо сорт гетерогенний частота кожного з двох алелів була взята як 0,5, якщо гомогенний – 1 (Kozub et al., 2009) за формулою

$$p_i = \frac{(n_a \div 2) + n_b}{N}$$

Де p_i – частота певного алеля у групі, n_a – кількість гетерогенних сортів, n_b – кількість гомогенних сортів, N – загальна кількість сортів у вибірці.

Для визначення індексу генетичної різноманітності користувалися формулою Нея (Nei M., 1973):

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

Де p_i – частота певного алеля у групі.

2.5. Біоінформаційний аналіз та ПЛР *in silico*

Нуклеотидні послідовності, які відповідають *Gli-1* локусам, знаходили в базі даних NCBI і порівнювали їх за допомогою сервісу BLAST, що дозволяє попарно порівняти схожі секвеновані послідовності ДНК.

Алгоритм пошуку та створення вибірок нуклеотидних послідовностей для проведення *in silico* ПЛР:

1. Знаходили вказані Zhang et al. (2003) нуклеотидні послідовності AF234648.1, AF234646.1, AF234649.1, M13712.1, D78183.1, які містять SNP, що відповідають кожному алелю, в GeneBank або послідовність, що фланкується праймерами до мікросателіту *Taglap*;
2. Знаходили у них ділянки, де відпалюються праймери (зворотній праймер потрібно було переписати комплементарно і справа наліво);
3. Копіювали нуклеотидну послідовність лише в межах праймерів, вставляли у вікно BLASTn, що доступне за посиланням: (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) та здійснювали пошук.

Таким чином формували вибірки із 95-100 нуклеотидних послідовностей для *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* локусів.

Аналіз отриманих вибірок:

Для кожної вибірки проводили *in silico* ПЛР із відповідними парами праймерів, використовуючи програмне забезпечення FastPCR (Kalendar, 2017) для пари праймерів до мікросателіту *Taglap* та власне програмне забезпечення *InSilicoPCR*, створене для пошуку праймерів в нуклеотидних послідовностях, що

дозволяє знайти теоретичні продукти ПЛР у випадках, коли не всі нуклеотиди в праймері комплементарні матриці (програма допускає по три некомплементарні нуклеотиди для кожного із праймерів, які виділяє червоним). Дана програма використовувалася для аналізу праймерів, розроблених Zhang et al. (2003).

Послідовності із позитивним результатом *in silico* ПЛР, використовувалися для мультиплексного вирівнювання за алгоритмом MAFFT (Kato et al., 2019; Kato et al., 2016; Kuraku et al., 2013), доступним за посиланнями: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, <https://www.genome.jp/tools-bin/mafft> та <https://ngphylogeny.fr/workspace/history/8f3a75a6e9bdd304>.

Після вирівнювання повторно знаходили праймери, відзначали однонуклеотидні заміни та порівнювали можливі продукти ПЛР.

Окрім вищеприписаного біоінформаційного аналізу нуклеотидних послідовностей, що фланкуються праймерами, розробленими (Zhang et al., 2003), у ході досліджень методом *in silico* ПЛР, аналізували 20 пар праймерів створеними в ході досліджень гліадинових генів у публікаціях Zhou, Liu et al. (2022), Paris et al. (2021), Wang et al. (2018), Кириєнко та ін. (2015). Для цього формували додаткові вибірки у яких в якості запиту використовувалися нуклеотидні послідовності гліадинових генів *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів сорту Chinese Spring, анотовані у нуклеотидних послідовностях MG560140.1, MG560141.1 та MG560142.1.

Праймери підбирали користуючись онлайн-сервісом PrimerBLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Дендрограми будували за методом UPGMA, на онлайн сервісах <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> та <https://www.genome.jp/tools-bin/mafft>. Для побудови дендрограм використовували нуклеотидні послідовності, отримані під час секвенування та вибірку нуклеотидних послідовностей генів гліадинів із GeneBank, які були створені для аналізу нової пари праймерів до *Gli-A1* локусу.

2.6. Підготовка зразків до секвенування.

Для підготовки зразків до секвенування проводили очистку продуктів ПЛР за допомогою реактивів та колонок компанії Qiagen.

Очистку здійснювали наступним чином:

1. До продукту ПЛР, об'ємом 25-100 мкл (об'єм залежав від інтенсивності забарвлення смуги на ПААГ, для менш концентрованих зразків використовували продукти декількох ПЛР) додавали три об'єми Solubilization Buffer QG та один об'єм ізопропанолу, інкубували при кімнатній температурі впродовж 3 хв.
2. Наносили суміш на колонку, центрифугували 1 хв при 12000 об/хв. Видаляли рідину із нижньої частини колонки.
3. Додавали 700 мкл буферу для промивки PE Buffer, центрифугували 1 хв при 12000 об/хв. Видаляли рідину із нижньої частини колонки.
4. Повторювали промивку.
5. Просушували колонку центрифугуванням впродовж 2 хв при 12000 об/хв.
6. Додавали 30 мкл води, інкубували 3 хв за температури 50°C та центрифугували впродовж 2 хв при 12000 об/хв.

Переносили 5 мкл готової очищеної ДНК у новий епендорф, додавали до неї 5 мкл праймера з концентрацією 5пмол/мкл. Секвенування за Сенгером здійснювала компанія Exprogen, м. Львів. Аналізували отримані нуклеотидні послідовності за допомогою комп'ютерної програми Geneious, доступної за посиланням <https://www.geneious.com/>.

РОЗДІЛ 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ *Gli-B1* ЛОКУСУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

3.1. Генетичний поліморфізм *Gli-B1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у світовій колекції сортів пшениці м'якої

Світова колекція, яка налічує 50 сортів та ліній пшениці м'якої, як було вказано створена й надана Є. В. Метаковським для дослідження як така, що максимально відображає поліморфізм алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом. Сорти відбиралися за заздальгідь, відомими результатами електрофорезу в кислому ПААГ, який проводився у попередніх дослідженнях Є. В. Метаковського (2018). Світова колекція використовувалася у даній роботі як система контролів для порівняння з українською колекцією для забезпечення максимальної різноманітності та для встановлення відповідності між алельними варіантами гліадинів та алелями, що визначаються за допомогою ПЛР. Загалом, у даній вибірці сортів представлено 19 різних алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом. Додатково до колекції, наданої Є. В. Метаковським було проаналізовано ще 14 сортів з різним походженням, отриманих із генбанків Leibniz institute of plant genetics and crop plant research (Німеччина) та Agriculture and Agri-Food Canada (Канада).

На першому етапі досліджень молекулярно-генетичного поліморфізму було проведено ПЛР з використанням алель-специфічних праймерів до *Gli-B1* локусу, що розроблені Zhang et al. (2003). Ці праймери дозволяють виявити два алелі – *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2*, які базуються на SNP поліморфізмі.

За даними Zhang et al.(2003) довжина фрагментів ампліфікації *Gli-B1.1* алеля повинна становити 369 п.н., а для *Gli-B1.2* – основна 397 п.н., але може змінюватися за рахунок мікросателіту. Проте у ПЛР, нами було виявлено поліморфізм фрагментів ампліфікації не тільки *Gli-B1.2* алеля (де виявлено вісім варіантів за довжиною 397 п.н., 398 п.н., 401п.н., 402 п.н., 403 п.н., 406 п.н., 409

п.н., 415 п.н), але й *Gli-B1.1* алеля, який показав наявність чотирьох різних за довжиною фрагментів ампліфікації (369 п.н., 372 п.н., 400 п.н., 403 п.н.).

Додатково, для більш чіткого аналізу поліморфізму *Gli-B1* локусу було проведено ПЛР з праймерами до мікросателіту *Taglgap*, розробленими Devos et al. (1995) та виявлено 12 алелів. За даними Zhang et al. (2003), саме мікросателіт *Taglgap* знаходиться всередині послідовності, що фланкується алель-специфічними праймерами до *Gli-B1.2* алеля.

На основі результатів, отриманих методом ПЛР, усі сорти пшениці м'якої зі світової колекції можна розділити на три основних групи: сорти, що характеризуються *Gli-B1.1* алелем (група I); сорти, що характеризуються *Gli-B1.2* алелем (група II) та сорти із 1RS/1BL транслокацією (група III).

До групи I нами було віднесено 21 сорт пшениці м'якої з *Gli-B1.1* алелем. Наявність поліморфізму у послідовності мікросателіту, дозволила додатково розділити групу I ще на три підгрупи, які характеризуються різними фрагментами ампліфікації *Gli-B1.1* алеля, а саме: 369 п.н. (підгрупа 1), 372 п.н. (підгрупа 2) та 400 п.н. (підгрупа 3) (рис. 3.1).

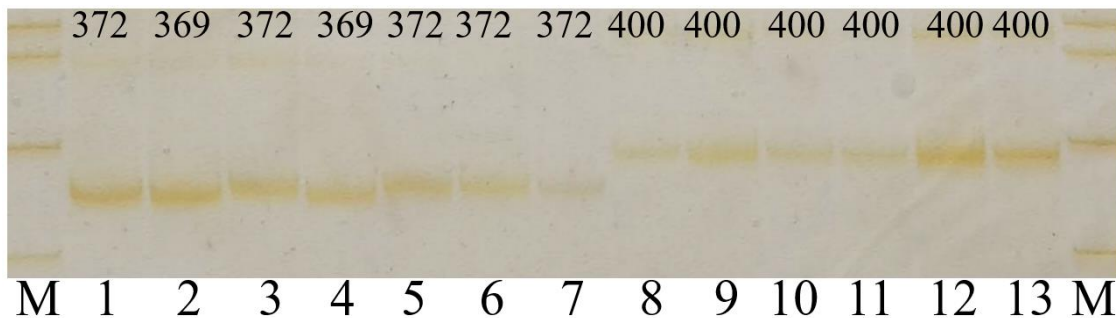


Рис. 3.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ПЛР із алель-специфічними праймерами до алеля *Gli-B1.1* у сортів пшениці м'якої світової колекції, наданої Є. В. Метаковським.

ДНК сортів та ліній: 1 – Mironovskaya-808, 2 – Gabo, 3 – Bezostaya-1, 4 – Marquis, 5 – Intensivnaya, 6 – Goelent, 7 – Salmone, 8 – Federation, 9 – Titien, 10 – Aragon-03, 11 – Insignia, 12 – Mentana, 13 – Gazul, M – маркер молекулярної ваги *pUC19/MspI*

Отже, до першої підгрупи можна віднести два сорти світової колекції – Gabo та Marquis, що характеризувалися наявністю *Gli-B1.1* алеля з розміром фрагментів ампліфікації 369 п.н., що відображено на рисунку 3.1, та Gli-B1b алельним варіантом гліадинів, а також алелем мікросателітного локусу *Taglgap* розміром 213 п.н. (табл. 3.1). В ході досліджень додаткових сортів із генбанків Leibniz institute of plant genetics and crop plant research було виявлено ще один сорт – Claudius, який віднесено до цієї підгрупи.

Підгрупа 2 об'єднує сім сортів із *Gli-B1.1* алелем з розміром фрагментів ампліфікації 372 п.н. та алелем *Taglgap* розміром 216 п.н. Чотири сорти із даної підгрупи – Mironovskaya-808, Bezostaya-1, Cheyenne та Kadett також характеризуються Gli-B1b алельним варіантом гліадинів, в інших – Intensivnaya, Goelent та Salmone знайдено алельні варіанти Gli-B1n Gli-B1q та Gli-B1s, відповідно.

Цікавою особливістю є те, що сорти з алельним варіантом Gli-B1b, відносяться до двох різних підгруп, оскільки розрізняються за довжиною фрагментів ампліфікації *Gli-B1.1* алеля та алелем *Taglgap*.

До підгрупи 3 було віднесено десять сортів пшениці м'якої, що характеризувалися фрагментами ампліфікації *Gli-B1.1* алеля довжиною 400 п.н. та алелем *Taglgap* 248 п.н. Незважаючи на однакові результати молекулярно-генетичного дослідження сортів даної підгрупи, вони проявляють значний поліморфізм за алельними варіантами гліадинів, що визначаються електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ. Загалом у підгрупі 3, ідентифіковано сім різних алельних варіантів гліадинів таких як: Gli-B1i (сорті Federation, Insignia) Gli-B1j (сорт Cluij-650), Gli-B1k (сорті Mentana, Pane-247, Pegaso), Gli-B1m (сорт Titien), Gli-B1o (сорт Aragon-03), Gli-B1p (сорт Potam-70) та Gli-B1r (сорт Gazul) (табл. 3.1). Електрофореграми перелічених алельних варіантів гліадинів, мають однаковий γ -гліадин що, імовірно, і є причиною виявлення однакових алелів у ПЛР, і розрізняються набором ω -гліадинів.

Група II об'єднує 30 сортів пшениці м'якої з *Gli-B1.2* алелем, які аналогічно можна розділити на п'ять підгруп, що різняться фрагментами ампліфікації довжиною 397 п.н. (підгрупа 4), 401 п.н. (підгрупа 5), 402 п.н. (підгрупа 6), 403 п.н. (підгрупа 7), 409 п.н. (підгрупа 8) та 415 п.н. (підгрупа 9) (рис. 3.2).

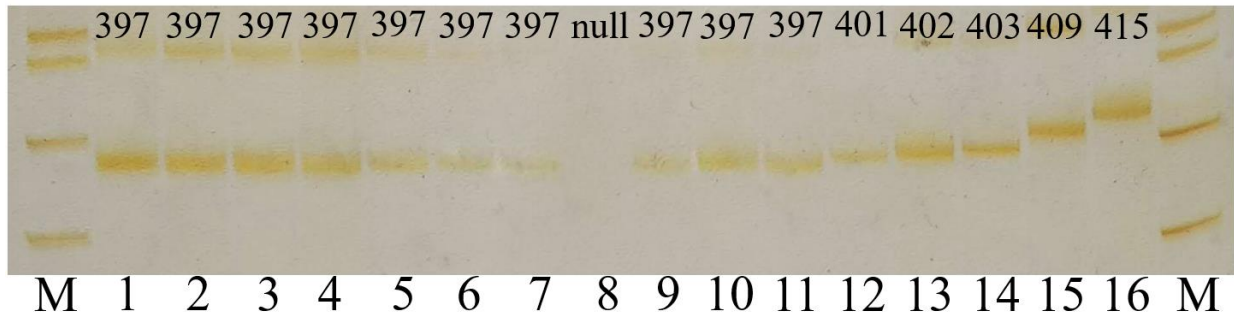


Рис. 3.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ПЛР із алель-специфічними праймерами до алеля *Gli-B1.2* у сортів пшениці м'якої світової колекції, наданої Є. В. Метаковським.

ДНК сортів та ліній: 1 – Arminda, 2 – Capelle-Desprez, 3 – Darius, 4 – Sideral, 5 – Galahad, 6 – Argelato, 7 – Escualo, 8 – Cartaya, 9 – Diego, 10 – Prinqual, 11 – Siete-Cerros, 12 – Krasnodonka, 13 – Ardec, 14 – Caia, 15 – Suneca, 16 – Chinese-Spring, M – маркер молекулярної ваги *pUC19/MspI*

До підгрупи 4 було віднесено 14 сортів пшениці м'якої, що характеризуються наявністю *Gli-B1.2* алеля з фрагментами ампліфікації довжиною 397 п.н. та алелем *Taglgap* 237 п.н. У сортів цієї підгрупи було знайдено чотири алельних варіанти гліадинів: Gli-B1c (сорти Diego, Prinqual, Сiete-Cerros), Gli-B1e (сорти Escualo, Glenlea), Gli-B1f (сорти Sideral, Splendeur та ін.) та Gli-B1g (сорти Argelato, Galahad) (табл. 3.1).

Підгрупи 5, 6 та 7 характеризуються *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 401 п.н., 402 п.н. та 403 п.н., відповідно, та алелями *Taglgap* 246 п.н. 249 п.н. та 252 п.н., відповідно. Сорти, які належать до цих трьох підгруп, мають Gli-B1h алельний варіант гліадинів: Krasnodonka (підгрупа 5),

Ardec (підгрупа 6) та Caia, Newcaster, You tzu mai та Zhengmai 2 (підгрупа 7) (табл. 3.1).

Підгрупа 8 об'єднує десять сортів, що характеризуються *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 409 п.н. та алелем *Taglgap* 270 п.н. До цієї підгрупи належать такі сорти, як Laura, Suneca, Rinconada та ін., усі – мають *Gli-B1d* алельний варіант гліадинів, що визначається електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ (табл. 3.1).

Підгрупа 9 представлена лише одним сортом – Chinese-Spring, та нулі-тетрасомною лінією на основі Chinese-Spring – N10T1B, які характеризуються *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 415 п.н., алелем *Taglgap* 285 п.н. та *Gli-B1a* алельним варіантом гліадинів.

Із додаткової вибірки сортів з Leibniz institute of plant genetics and crop plant research було проаналізовано також три китайські сорти, з метою пошуку *Gli-B1a* алельного варіанту та збільшення вибірки сортів, що відносяться до підгрупи 9 (*Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 415 п.н.), представленої лише сортом Chinese Spring. Проте, за результатами ПЛР два з них – You tzu mai та Zhemaі 2, були віднесені до підгрупи 7 (*Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 403 п.н.), та один – Zhemaі 1 – до підгрупи 3 (*Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 400 п.н.). Таким чином *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 415 п.н. та *Gli-B1a* алельний варіант знайдений лише у сорту Chinese Spring та нулі-тетрасомних ліній, створених на його основі.

Група III – сорти, у яких відсутні фрагменти ампліфікації у ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу, що спричинене пшенично-житніми транслокаціями короткого плеча 1В хромосоми, або повною відсутністю плеча чи хромосоми 1В в цілому. До цієї групи належить два сорти з 1RS/1BL транслокацією – Cartaya та Kavkaz у яких на електрофореграмі запасних білків видно продукти експресії генів секалінів жита, що викликано наявністю плеча 1RS – так званий *Gli-B11* алельний варіант гліадинів. Також сюди входять нулі-

тетрасомні лінії, у яких відсутня 1В хромосома: 1В,1D і N1ВТ1D та відсутні поліпептиди гліадинів, гени яких локалізовані у *Gli-B1* локусі (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Результати ПЛР-аналізу сортів пшениці м'якої
з алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу, розробленими
Zhang et al. (2003), та праймерами до мікросателіту *Taglgap***

№	Назва сорту	Алель <i>Gli-B1</i>	Розмір* фрагментів ампліфікації, п.н.	Алель <i>Taglgap</i> * п.н.	Алельний варіант <i>Gli-B1</i>
Світова колекція сортів надана Є. В. Метаковським					
1	Bezostaya-1	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
2	Gabo	<i>Gli-B1.1</i>	369	213	b
3	Marquis	<i>Gli-B1.1</i>	369	213	b
4	Mironovskaya -808	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
5	Intensivnaya	<i>Gli-B1.1</i>	372	216	n
6	Goelent	<i>Gli-B1.1</i>	372	216	q
7	Salmone	<i>Gli-B1.1</i>	372	216	s
8	Federation	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	i
9	Insignia	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	i
10	Cluij-650	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	j
11	Mentana	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	k
12	Pane-247	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	k
13	Titien	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	m
14	Aragon-03	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	o
15	Potam-70	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	p
16	Gazul	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	r
17	Diego	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	c
18	Prinqual	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	c
19	Siete-Cerros-66	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	c
20	Escualo	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	e
21	Glenlea	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	e
22	Arminda	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f
23	Capelle-Desprez	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f
24	Darius	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f
25	Recital	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f
26	Sideral	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f
27	Splendeur	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f

28	Libero	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f?
29	Argelato	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	g
30	Galahad	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	g
31	Krasnodonka	<i>Gli-B1.2</i>	401	246	h
32	Ardec	<i>Gli-B1.2</i>	402	249	h
33	Caia	<i>Gli-B1.2</i>	403	252	h
34	Newcaster	<i>Gli-B1.2</i>	403	252	h
35	Inia-69*	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
36	Cajeme-71	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
37	Donskaya polukarlikovaia	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
38	Katepwa	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
39	Laura	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
40	Pavon-F-76 (Betres)	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
41	Rinconada	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
42	Roblin	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
43	Suneca	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
44	Yecora-Rojo	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
45	Chinese-Spring	<i>Gli-B1.2</i>	415	285	a
46	Cartaya	-	-	-	l
47	Kavkaz	-	-	-	l
48	1B ⁺ ,1D ⁺ (лінія)	-	-	-	null
49	N10T1B (лінія)	<i>Gli-B1.2</i>	415	285	a
50	N1BT1D (лінія)	-	-	-	null
Сорти та лінії пшениці м'якої з дослідження Поліщук та ін. (2010)					
51	Альбатрос одеський	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
52	Любава одеська	<i>Gli-B1.2/ Gli-B1.1</i>	406/ 369	267/ 216	d/b
53	Струмок	<i>Gli-B1.2</i>	409	270 п.н.	d
54	GLI-B1-3	-	-	-	l
55	GLI-A1-1	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
56	GLI-D1-4	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
57	GLI-D1-5	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
58	GLI-B1-12	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	o
59	GLI-B1-4	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	g
Сорти із генбанків Leibniz institute of plant genetics and crop plant research (Німеччина) та Agriculture and Agri-Food Canada (Канада)					
60	Skorospelka	-	-	-	l
61	Claudius	<i>Gli-B1.1</i>	369	213	b
62	Red Fife	<i>Gli-B1.1</i>	369	213	b

63	Cheyenne	<i>Gli-B1.1</i>	372	216	b
64	Kadett	<i>Gli-B1.1</i>	372	216	b
65	Hard Red Calcutta	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	new
66	Zhemai 1	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	?
67	Pegaso	<i>Gli-B1.1</i>	400	248	k
68	Ladoga	<i>Gli-B1.1</i>	403	252	new2
69	Aquila	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f
70	Girka	<i>Gli-B1.2</i>	398	243	new3
71	You tzu mai	<i>Gli-B1.2</i>	403	252	h?
72	Zhemai 2	<i>Gli-B1.2</i>	403	252	h?
73	Bison	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d?

*Розміри фрагментів ампліфікації, розраховані на основі електрофореграм, уточнення алелів за результатами секвенування описане у розділі 3.4.

Крім результатів ПЛР-аналізу світової колекції сортів пшениці у таблиці 3.1 представлено результати ПЛР-аналізу ще для двох невеликих вибірок сортів пшениці м'якої: таких самих як в дослідженні Поліщук та ін. (2009) та деякі старі Канадські сорти, які створювалися з матеріалу, вивезеного з України у ХІХ столітті.

У роботі Поліщук та ін. (2010), нашу увагу привернуло, порівняння поліморфізму *Gli-1* локусів. У даній роботі використано праймери, розроблені Zhang et al. (2003) для аналізу поліморфізму *Gli-1* локусів та результатів електрофорезу запасних білків *Gli-1* та *Glu-3* локусів, проте вона містила відносно невелику вибірку сортів з СГІ-НЦНС та 6 майже-ізогенних ліній, що розрізнялися алельними варіантами *Gli-1* локусів, які були створені Копусем (1994). Нашу увагу привернуло те, що у роботі зазначалося про наявність «нового алеля» (фрагменти ампліфікації відрізнялися за довжиною від тих, що вказані розробниками – Zhang et al. (2003), в одній із майже-ізогенних ліній, а також неспівпадіння з нашими результатами у відповідності алель *Gli-B1.1* – *Gli-B1d* алельний варіант, тому нами, додатково, було повторено частину експерименту, а саме проаналізовано три сорти та шість ліній із даного дослідження (рис. 3.3).

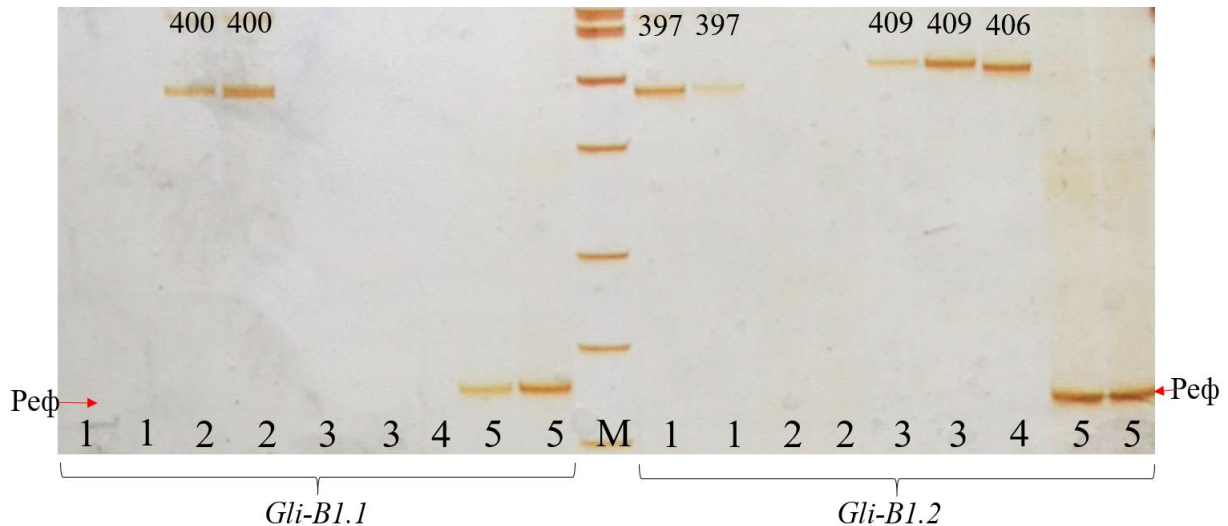


Рис. 3.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ПЛР із алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу сортів та ліній пшениці м'якої із публікації Поліщук та ін., (2010) отримана в ході даного дослідження. ДНК сортів та ліній: 1 – лінія *Gli-B1-4*, 2 – лінія *Gli-B1-12*, 3 – Струмок, 4 – Любава, 5 – лінія *Gli-B1-3*, М – маркер молекулярної ваги *pUC19/MspI*, Реф – референсний ген (*Gli-A1*)

На отриманій нами електрофореграмі продуктів ампліфікації ПЛР із алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу сортів та ліній пшениці м'якої із публікації Поліщук та ін. (2010) (рис. 3.3) видно, що «новим алелем», який був описаний у лінії *Gli-B1-12* виявився *Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 400 п.н. У даної лінії також виявлено *Gli-B1*о алельний варіант, та алель *Taglgap* 248 п.н., що можна віднести до підгрупи 3.

Лінія *Gli-B1-4* характеризувалася *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації 397 п.н., алелем *Taglgap* 237 п.н. та *Gli-B1g* алельним варіантом (підгрупа 4).

У лінії *Gli-B1-3* не виявлено фрагментів ампліфікації *Gli-B1* локусу, на рисунку 3.3 видно лише фрагменти ампліфікації референсного гену (168 п.н.), проте ідентифіковано *Gli-B1* алельний варіант гліадинів (група III).

У сорту Альбатрос одеський методом електрофорезу запасних білків виявлено Gli-B1b алельний варіант гліадинів, а в ПЛР - *Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 372 п.н., алелем *Taglgap* 216 п.н., як у підгрупі 2.

Сорт Любава – гетерогенний. Частину досліджених зернівок, на основі результатів, можна віднести до підгрупи 2. Інша частина характеризується Gli-B1d алельним варіантом гліадинів, проте має унікальний генотип, знайдений лише у сорту Любава: *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 406 п.н., алелем *Taglgap* 267 п.н. (рис. 3.3). Що відрізняється від сорту Струмок, який також має Gli-B1d алельний варіантом гліадинів та походить із СГІ-НЦНС, але у ПЛР характеризується *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації 409 п.н., алелем *Taglgap* 270 п.н., як у підгрупі 8. Отже, генотип сорту Любава можна виділити в окрему підгрупу (підгрупа 11), що відноситься до групи II.

Щодо відповідності, алель *Gli-B1.1* – Gli-B1d алельний варіант, описаний у статті Поліщук та ін. (2010), то у наших дослідженнях вона не підтвердилася. Згідно з нашими результатами, у сортів з Gli-B1d алельним варіантом – Струмок та Любава виявлено *Gli-B1.2* алель, що підтверджує відповідність, установлену на світовій вибірці сортів пшениці м'якої.

Ще одна вибірка – сорти із Agriculture and Agri-Food Canada, була використана у дослідженнях, оскільки представляє ряд старих сортів, що культивувалися на території України та були вивезені у Канаду у XIX столітті та інші старі канадські сорти, які були створені на їх основі.

Лише для двох із п'яти сортів нами було встановлено алельний варіант гліадинів у кислому ПААГ – це Skoropelka (Gli-B11) та Red fife (Gli-B1b). Для інших, таких як Ladoga, Girka та Hard Red Calcutta, алельні варіанти гліадинів були позначені як «new», оскільки нам не вдалося визначити їх точно (табл. 3.1). Складність аналізу електрофореграм полягала у тому, що ці сорти є досить давніми, тому містять комбінації із дуже рідкісних зараз алельних варіантів, ідентифікація ускладнювалася також використанням нами методики електрофорезу розробленої Ф. А. Поперелею (1996) (доступної для нас), яка

орієнтована на класифікацію, відповідно, за Поперелею Ф. А., де алельні варіанти гліадинів можуть дещо по-іншому розділятися, ніж за методикою Метаковського, за яким ми позначаємо алельні варіанти гліадинів.

Результати молекулярно-генетичного аналізу сортів із Канадського генбанку також виявилися цікавими. Сорт Red fife з алельним варіантом гліадинів Gli-B1b характеризувався *Gli-B1.1* алелем з довжиною фрагментів ампліфікації 369 п.н. та алелем *Taglgap* 213 п.н., що відповідає першій підгрупі та відрізняється від українських сортів пшениці м'якої з Gli-B1b алельним варіантом гліадинів, таких як Альбатрос одеський, Myronivska-808 (рис. 3.4). Але, Red fife має українське походження, оскільки, почав культивуватися у Канаді в XIX столітті із зерна привезеного із Галичини, яке мало назву Haluchanka. Це показує, що генотипи, які віднесені до підгрупи 1, вирощувалися на території України раніше. Red fife та Hard Red Calcutta є батьківськими формами для сорту Marquis. Результати ПЛР та електрофорезу запасних білків для сорту Marquis є ідентичними з Red fife, що свідчить про його походження.

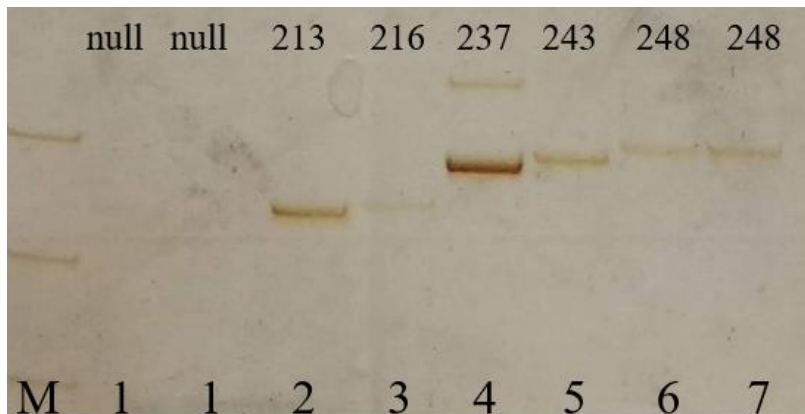


Рис. 3.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з праймерами до мікросателітного локусу *Taglgap* сортів із Канадського генбанку.

1 – Skorospelka; 2 – Red fife; 3 – Myronivska-808; 4 – Prinqual; 5 – Girka; 6 – Federation; 7 – Hard Red Calcutta; М – маркер молекулярної маси *pUC 19/Msp I*

На основі результатів молекулярно-генетичного аналізу, можна припустити, що сорт Hard Red Calcutta для якого виявлено *Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 400 п.н., та алелем *Taglgap* 248 п.н., може мати один із семи алельних варіантів гліадинів, що відносяться до підгрупи 3.

Унікальні результати були отримані для сорту Girka, що характеризується *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації 398 п.н., та алелем *Taglgap* 243 п.н. (рис. 3.3), а також для сорту Ladoga, у якого фрагменти ампліфікації *Gli-B1.1* алеля становили 403 п.н., та алель *Taglgap* 252 п.н. як у сортів 7 підгрупи, але відрізнялися від неї саме за SNP алелем, що виявляється праймерами Zhang et al. (2003), тому ці сорти було віднесено до нових підгруп – 12 і 13, групи II та I, відповідно. Алельні варіанти гліадинів для даних сортів ідентифікувати не вдалося.

На основі результатів, описаних вище, було встановлено чітку відповідність між алелями, що визначаються алель-специфічними праймерами, алелями мікросателіту *Taglgap* і алельними варіантами гліадинів, що визначаються електрофорезом запасних білків, що відображено у Таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 демонструє зв'язок між алелями *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2*, які визначаються однонуклеотидним поліморфізмом (SNP) та алельними варіантами гліадинів: *Gli-B1.1* алель об'єднує 11 алельних варіантів, а *Gli-B1.2* – сім алельних варіантів. Жодного алельного варіанту, якого можна було б пов'язати одразу із двома SNP алелями не знайдено. Те ж саме відноситься і до зв'язку алеля, що визначається SNP та довжиною мікросателіту *Taglgap*, хоча частота виникнення SNP поліморфізмів у геномі пшениці м'якої є значно вищою, ніж мікросателітів, що проявляється у їх кількості в геномі. Стійкий зв'язок «Алель за алель-специфічною ПЛР (SNP алель) – алель *Taglgap* – алельний варіант гліадинів» свідчить про консервативність та важливість даної ділянки геному, що належить γ -гліадиновому псевдогену. Імовірно, ця ділянка *Gli-B1* локусу має певні регуляторні функції.

Таблиця 3.2

Відповідність алелів *Gli-B1* локусу, алелів мікросателіту *Taglgap* та алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом

Алель <i>Gli-B1</i>	Номер підгрупи	Розмір фрагментів ампліфікації <i>Gli-B1</i> алелів, п.н.	Алель мікросателіту <i>Taglgap</i> , п.н.	Алельний варіант <i>Gli-B1</i>
<i>Gli-B1.1</i> (Група I)	1	369	213	Gli-B1b
	2	372	216	Gli-B1b, Gli-B1n, Gli-B1s, Gli-B1q
	3	400	248	Gli-B1i, Gli-B1j, Gli-B1k, Gli-B1m, Gli-B1o, Gli-B1p, Gli-B1r
	13	403	252	new3
<i>Gli-B1.2</i> (Група II)	4	397	237	Gli-B1c, Gli-B1e, Gli-B1f, Gli-B1g
	12	398	243	new2
	5	401	246	Gli-B1h
	6	402	249	Gli-B1h
	7	403	252	Gli-B1h
	11	406	267	Gli-B1d
	8	409	270	Gli-B1d
	9	415	285	Gli-B1a
<i>Null</i> (Група III)	10	-	-	Gli-B1l null

Таблиця 3.2 показує важливі практичні результати дослідження, з неї видно, що молекулярні маркери, які використовувалися у роботі можуть застосовуватися для ідентифікації основних алельних варіантів гліадинів, використовуючи метод ПЛР.

Визначити ряд алельних варіантів гліадинів за допомогою методу ПЛР можна як з праймерами, розробленими Zhang et al. (2003) і з праймерами до мікросателіту *Taglgap*, розробленими Devos et al. (1995), проте, більш точний результат можна отримати, використовуючи дві системи маркерів.

Продукти ПЛР з праймерами до мікросателіту *Taglgap*, розробленими Devos et al. (1995) ампліфікуються меншої довжини (213-285 п.н.), ніж продукти ПЛР з алель-специфічними праймерами, що дозволяє більш точно визначити довжину фрагментів ампліфікації.

За допомогою праймерів, розроблених Devos et al. (1995) було уточнено результати по сортах, що характеризуються алельним варіантом гліадинів Gli-B1b. А саме на електрофореграмах продуктів ампліфікації отриманих у ПЛР з праймерами до міросателітного локусу *Taglgap*, більш чітко було видно різницю між довжиною фрагментів ампліфікації у сортів Gabo і Marquis (213 п.н.) та сортами Марія (даний сорт має ідентичні результати до Myronivska-808) і Goelent (213 п.н.), (рис. 3.5).

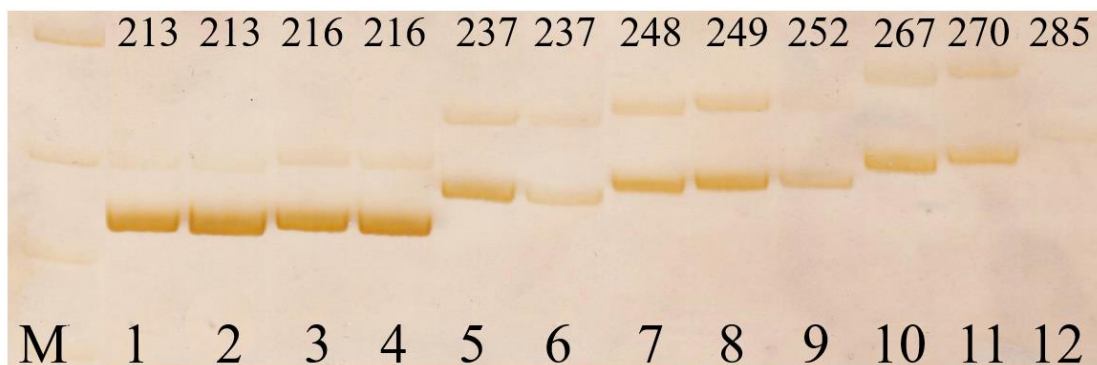


Рис. 3.5. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з праймерами до міросателітного локусу *Taglgap*.

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

Використання алель-специфічних праймерів, не дозволило чітко різніти Gabo, Marquis та Myronivska-808, Bezostaya-1, через довгі продукти ПЛР та різницю в інтенсивності ПЛР між цими сортами, що на ряді електрофореграм показало ідентичність результатів у цих чотирьох сортів, на основі чого нами було зроблено висновок про належність їх до однієї підгрупи, що опубліковано Popovych et al. (2020), Metakovsky et al. (2021). Подальше

використання праймерів до мікросателіту *Taglgap* та великої кількості українських сортів із *Gli-B1b* алельним варіантом та порівняння їх із сортами підгрупи 1 та підгрупи 2, показало більш чітку приналежність Myronivska-808 та Bezostaya-1 до підгрупи 2 (*Gli-B1.1*, з фрагментами ампліфікації 372 п.н.).

Уточнення були зроблені ще по одному сорту – Krasnodonka. На електрофореграмах смуги, що відповідають продуктам ампліфікації даного сорту з праймерами до мікросателіту *Taglgap* розташовані вище смуг, що відповідають сорту Prinqual (237 п.н.) та сорту Federation (248 п.н.), (рис. 3.6), що відрізняється від картини, отриманої з алель-специфічними праймерами Popovych et al. (2020), Metakovsky et al. (2021).

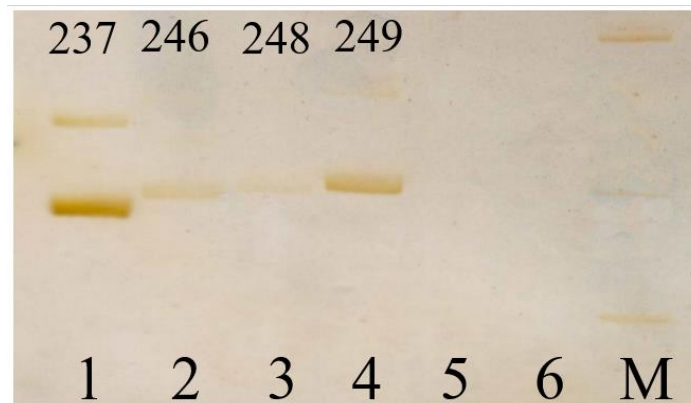


Рис. 3.6. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з праймерами до мікросателітного локусу *Taglgap*.

1 – Prinqual; 2 – Krasnodonka; 3 – Federation; 4 – Ardec; 5 – Щедрість; 6 – Cartaya; М – маркер молекулярної маси *pUC 19/Msp I*

Відмінність у результатах, описана вище, імовірно виникла у зв'язку з різною інтенсивністю ПЛР та малою різницею у довжині продуктів ампліфікації. У такій ситуації, уточнення довжини фрагментів ампліфікації можна отримати лише за допомогою секвенування.

Установлена нами відповідність між «Алель за алель-специфічною ПЛР (SNP алель) – алель *Taglgap* – алельний варіант гліадинів» демонструє потенціал

застосування методу ПЛР з алель-специфічними праймерами та праймерами до мікросателіту *Taglgap* для ідентифікації алельних варіантів гліадинів.

Перевагами використання ПЛР для ідентифікації алельних варіантів гліадинів перед методом електрофорезу запасних білків в кислому ПААГ є: відносно простіша інтерпритація електрофореграм, яка зводиться лише до визначення довжини фрагментів ампліфікації та можливість визначення алельних варіантів гліадинів з будь-якої частини рослини, не чекаючи зрілості зернівки, дозволить пришвидшувати процес відбору рослин під час селекції. Головним недоліком використання методу ПЛР є неможливість визначення алельних варіантів гліадинів, які віднесені до однієї підгрупи.

3.2. Генетичний поліморфізм *Gli-B1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої.

Після аналізу поліморфізму *Gli-B1* локусу на світовій вибірці, сорти якої у подальшому використовувалися як маркерні, досліджували вибірку із сучасних українських сортів та ліній пшениці м'якої із семи провідних селекційних центрів України, переважна більшість з яких були зареєстровані у Державному реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні починаючи з 2000 року.

Електрофорез запасних білків в кислому ПААГ для вибірки українських сортів пшениці м'якої проводили у спільних дослідженнях із О. М. Благодаровою науковим співробітником відділу теоретичних основ селекції СГІ-НЦНС, використовуючи методику Ф.О. Поперелі (1996), проте алельні варіанти гліадинів позначали за класифікацією Є. В. Метаковського.

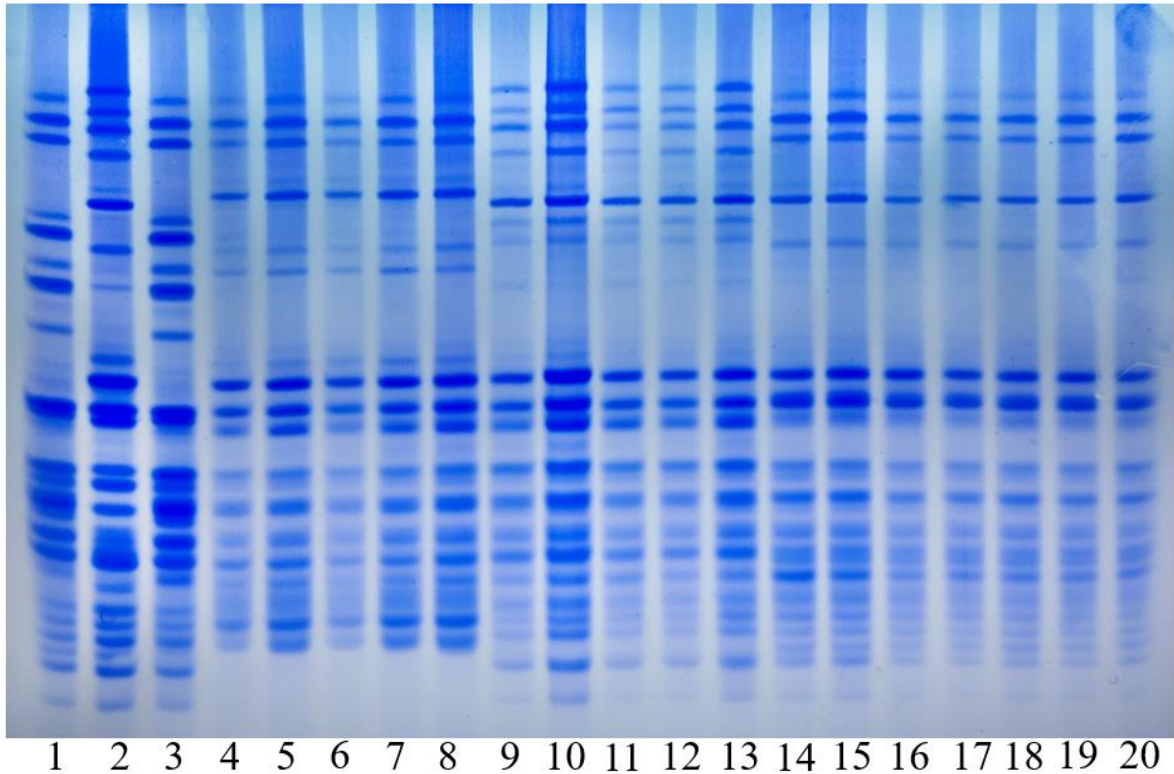


Рис. 3.7. Електрофореграма запасних білків в кислому ПААГ українських сортів пшениці м'якої, селекції Білоцерківської селекційно-дослідної станції. Сорти: 1, 3 – Чародійка білоцерківська; 2 – Куяльник (контроль); 4-8 – Щедра нива; 9-13 – Відрада; 14-18 – Романтика; 19-20 – Лісова пісня

Електрофорез запасних білків та молекулярно-генетичний аналіз *Gli-B1* локусу в українській вибірці сортів демонструє менший поліморфізм, ніж у світовій вибірці, що було очікувано, оскільки дані сорти вирощуються у помірних кліматичних умовах. Загалом в українській вибірці сортів було виявлено сім різних алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом. Так, більшість українських сортів характеризувалися *Gli-B1b* та *Gli-B1l* алельним варіантом гліадинів, представлені на рис. 3.7 (*Gli-B1b* зразки 9-20, *Gli-B1l* – зразки 1 і 3). Рідко зустрічалися такі алельні варіанти як *Gli-B1c*, *Gli-B1d*, *Gli-B1e* (рис. 3.7, зразки 4-8), *Gli-B1f* та *Gli-B1h*.

Відповідність «Алель за алель-специфічною ПЛР (SNP алель) – алель *Taglgap* – алельний варіант гліадинів», визначена у світовій вибірці сортів

пшениці повністю відповідає відповідності, яка проявляється і в сучасній українській колекції пшениці м'якої.

Переважає більшість сортів української колекції відносилися до підгрупи 2 характеризувалися *Gli-B1.1* алелем з розміром фрагментів ампліфікації 372 п.н. та алелем *Taglgap* 216 п.н., поширеність, останнього була встановлена раніше Чеботар С.В. (2009). Перелік сортів даної підгрупи більш наведений у таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Результати ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу, розробленими Zhang et al. (2003) та праймерами до мікросателіту *Taglgap* у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої

№	Назва сорту	Алель <i>Gli-B1</i>	Розмір* фрагментів ампліфікації, п.н.	Алель* <i>Taglgap</i> , п.н.	Алельний варіант <i>Gli-B1</i>
1	Анатолія	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
2	Антонівка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
3	Балада Миронівська	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
4	Білосніжка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
5	Благо	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
6	Борвій	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
7	Бургунка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
8	Ватажок	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
9	Вежа миронівська	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
10	Ветеран	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
11	Відрада	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
12	Грація миронівська	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
13	Гурт	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
14	Донецька 48	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
15	Жайвір	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
16	Зміна	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
17	Кларіса	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
18	Конка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
19	Кохана	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
20	Кошова	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
21	Куяльник AR	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
22	Ліра одеська	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b

23	Лісова пісня	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
24	Марія	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
25	Металіст	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
26	МІП Ассоль	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
27	МІП Вишиванка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
28	Мудрість I	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
29	Мудрість IV	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
30	Мудрість II	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
31	Мудрість III	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
32	Наснага	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
33	Оберіг миронівський	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
34	Овідій	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
35	Оптима одеська	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
36	Оржиця	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
37	Пам'яті Ремесла	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
38	Подолянка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
39	Подяка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
40	Романтика	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
41	Сагайдак	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
42	Селянка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
43	Сидор Ковпак	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
44	Соната	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
45	Традиція I	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
46	Традиція II	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
47	Українка полтавська	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
48	Херсонська безоста	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
49	Царичанка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
50	Царівна	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
51	Ясочка	<i>Gli-B1.1</i>	369	216	b
52	Левада	<i>Gli-B1.1/-</i>	369/-	216 /-	b/l
53	лінія Л59-95	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	c
54	Панна	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	c
55	Говтва	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	e
56	Лютенька	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	e
57	Щедра нива	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	e
58	Мелодія одеська	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	e
59	Зимоярка	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f
60	Миронівська слава	<i>Gli-B1.2</i>	397	237	f
61	Мадярка	<i>Gli-B1.2</i>	403	252	h
62	Білоцерківська напівкарликова	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d

63	Віген	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
64	лінія KC22-04	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
65	Хист	<i>Gli-B1.2</i>	409	270	d
66	Аріївка	-	-	-	1
67	Відповідь одеська	-	-	-	1
68	Вільшана	-	-	-	1
69	Водограй білоцерківський	-	-	-	1
70	Естафета миронівська	-	-	-	1
71	Зоряна Носівська	-	-	-	1
72	Крижинка	-	-	-	1
73	Леда	-	-	-	1
74	Либідь	-	-	-	1
75	лінія KC1	-	-	-	1
76	лінія KC14	-	-	-	1
77	лінія Л41/95	-	-	-	1
78	Миронівська 65	-	-	-	1
79	Миронівська 61	-	-	-	1
80	Миронівська золотоверха	-	-	-	1
81	МІП Дніпрянка	-	-	-	1
82	Перлина лісостепу	-	-	-	1
83	Світанок миронівський	-	-	-	1
84	Трудівниця миронівська	-	-	-	1
85	Чародійка білоцерківська	-	-	-	1
86	Щедрість	-	-	-	1
87	Ювівата 60	-	-	-	1
88	Ювіляр миронівський	-	-	-	1

*Розміри фрагментів ампліфікації, розраховані на основі електрофореграм, уточнення алелів за результатами секвенування описане у розділі 3.4.

Загалом, до підгрупи 2 було віднесено 52 сорти, один з яких – Соната, виявився гетерогенним. Частина зернівок даного сорту відносилася до III групи та характеризувалася наявністю 1RS/1BL транслокації.

Фрагменти ампліфікації українських сортів, отримані у ПЛР, порівнювали із фрагментами ампліфікації світової вибірки для точного встановлення підгруп в сучасній українській колекції сортів пшениці м'якої.

специфічними праймерами до *Gli-B1.2* алеля сорту Мадярка ідентичні з результатами отриманими для сорту Саїа, а результати по лінії Л 59/95 та сорту Лютецька співпадають із результатами по сортах Prinqual та Escualo, лінія КС 22-04 співпадає із сортом Sunesa.

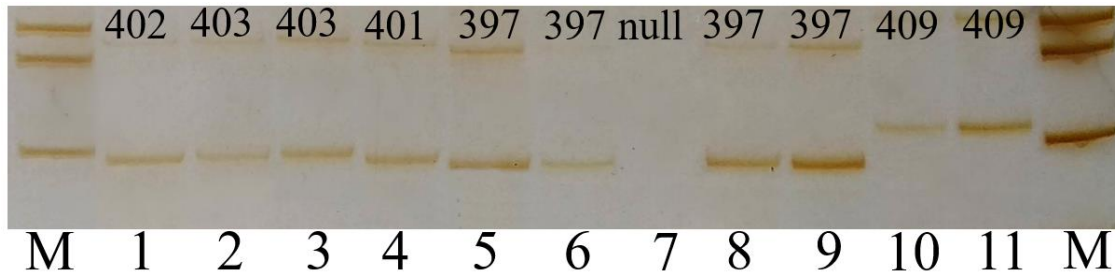


Рис. 3.9. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-B1.2* алеля у сортів української колекції.

1 – Ardec; 2 – Саїа; 3 – Мадярка; 4 – Krasnodonka; 5 – Prinqual; 6 – лінія Л 59/95; 7 – Ледя; 8 – Escualo; 9 – Лютецька; 10 – Sunesa; 11 – лінія КС 22-04; М – маркер молекулярної маси *pUC 19/Msp I*

До підгрупи 4, що характеризується *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 397 п.н. та алелем *Taglgap 237* п.н., у вибірці сучасних українських сортів, можна віднести вісім сортів із трьома різними алельними варіантами гліадинів: *Gli-B1c* (Л59-95 та Панна), *Gli-B1e* (Говтва, Лютецька, Щедра нива, Мелодія одеська) та *Gli-B1f* (Зимоярка і Миронівська слава) (табл. 3.3).

Підгрупа 7 (*Gli-B1.2*, 397 п.н. та *Taglgap 252* п.н.) представлена лише сортом Мадярка.

До підгрупи 8 (*Gli-B1.2*, 409 п.н. та *Taglgap 270* п.н.), було віднесено чотири сорти з *Gli-B1d* алельним варіантом гліадинів: Білоцерківська напівкарликова, Віген, Хист та лінія КС 22-04.

III група, що характеризується відсутністю фрагментів ампліфікації *Gli-B1* локусу, об'єднує 23 сорти української вибірки із алельним варіантом гліадинів Gli-B11, що спричинено 1RS/1BL транслокацією.

Дана транслокація присутня практично у третини сучасних українських сортів (частота становить 0,26), та цінна тим, що привносить у генотип важливі гени стійкості до листової, стеблової та бурої іржі, борошністої роси (Huang et al., 2003; Spielmeier, Lagudah, 2003; Hafeez et al., 2021). хоча при наявності Gli-B11 алельного варіанту гліадинів, значно знижується хлібопекарська якість клейковини.

Загалом, в українській вибірці сортів пшениці м'якої, найбільш поширеним алелем був *Gli-B1.1* з частотою 0,58. Фрагменти ампліфікації даного алелю, у всіх сортів були ідентичними за довжиною (372 п.н.), що спричинено наявністю у них однакового алельного варіанту гліадинів – Gli-B1b, інші алельні варіанти, які можливі у сортів другої підгрупи, в українській колекції не знайдено. У зв'язку з цим, алель-специфічні праймери до *Gli-B1.1* можуть використовуватися для ідентифікації цього алеля у сортів українського походження.

Gli-B1.2 алель в українській вибірці зустрічався досить рідко, з частотою 0,16. Даний алель зручно використовувати як маркер для визначення наступних алельних варіантів гліадинів, що зустрічаються в українських сортів пшениці: Gli-B1d та Gli-B1h за довжиною фрагментів ампліфікації 409 п.н. та 403 п.н., відповідно. Проте, ні алель-специфічні праймери, розроблені Zhang et al. (2003), ні праймери до мікросателіту *Taglgap*, не дозволяють визначити цінний для української селекції алельний варіант гліадинів Gli-B1c, через ідентичність результатів ПЛР із сортами, що характеризуються Gli-B1e та Gli-B1f. Тому, у даному випадку, потрібно шукати додаткові молекулярні маркери.

Для сучасної української вибірки сортів пшениці м'якої та окремо для кожного українського селекційного центру, вираховували частоту алельних

варіантів гліадинів та алеля мікросателіту *Taglgap*, а також індекс генетичної різноманітності, результати відображені у таблицях 3.4 та 3.5.

Індекс генетичної різноманітності (H) у вибірці сучасної українських сортів становив 0,52, а в різних селекційних центрах коливався від 0,18 до 0,64. Найнижчий показник було зафіксовано у вибірці із ІЗЗ, а найвищий – у БЦСДС, що спричинене кількістю та частотою алельних варіантів, представлених у вибірках.

Таблиця 3.4

Частоти алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом, у різних селекційних центрах України

Алельний варіант	СГІ-НЦНС N=28	МІП N=21	БЦСДС N=11	ІЗЗ N=10	ПДАА N=10	НСДС N=8	Українська Колекція N=91
Gli-B1b	0,72	0,40	0,45	0,90	0,65	-	0,58
Gli-B1c	0,04	-	-	-	-	0,13	0,02
Gli-B1d	0,13	-	0,09	-	-	0,13	0,06
Gli-B1e	0,04	-	0,09	-	0,20	-	0,04
Gli-B1f	-	0,10	-	-	-	-	0,02
Gli-B1h	-	0,05	-	-	-	-	0,01
Gli-B1l	0,07	0,45	0,37	0,10	0,15	0,74	0,26
H	0,4566	0,625	0,6444	0,18	0,515	0,4186	0,5213

Як видно із таблиці 3.4, алельний варіант Gli-B1b, який є найбільш поширеним в українській вибірці, та є домінантим у вибірках чотирьох селекційних центрів таких як СГІ-НЦНС, БЦСДС, ІЗЗ, ПДАА з частотою від 0,45 до 0,90. Даний алельний варіант не знайдено лише у сортів НСДС. Оскільки існує відповідність між алельним варіантом гліадинів Gli-B1b та алелем *Taglgap* 216 п.н., то їх частоти ідентичні у досліджених вибірках (табл. 3.5).

Gli-B1l алельний варіант гліадинів та *null* алель *Taglgap*, домінантним виявився для вибірки із МІП та НСДС з частотою 0,45 та 0,74, відповідно (табл. 3.4 та 3.5). Даний алельний варіант знайдений у всіх шести селекційних центрах.

Крім двох основних, у вибірках п'яти селекційних центрів зустрічається від одного до трьох інших алельних варіантів гліадинів. Так, у сортів СГІ-НЦНС зустрічаються ще Gli-B1d (частота 0,13), Gli-B1c та Gli-B1e (частота 0,04).

Таблиця 3.5

Частоти алелів, мікросателітного локусу *Taglgap*, у різних селекційних центрах України

Алель <i>Taglgap</i> , п.н.	СГІ- НЦНС N=28	МПП N=21	БЦСДС N=11	ІЗЗ N=10	ПДАА N=10	НСДС N=8	Українська Колекція N=91
216	0,72	0,40	0,45	0,90	0,65	-	0,58
337	0,08	0,10	0,09	-	0,20	0,13	0,09
252	-	0,05	-	-	-	-	0,01
270	0,13	-	0,09	-	-	0,13	0,06
null	0,07	0,45	0,37	0,10	0,15	0,74	0,26

У сортів МПП зустрічаються ще Gli-B1f (частота 0,10) та Gli-B1h (частота 0,05) алельні варіанти, які характерні лише для даного селекційного центру.

Крім основних, по два додаткових алельних варіанти було знайдено для БЦСДС (Gli-B1d та Gli-B1e з частотою 0,09) та НСДС (Gli-B1d та Gli-B1c з частотою 0,13) та один для ПДАА (Gli-B1e з частотою 0,20).

Найменший рівень поліморфізму спостерігався у сортів ІЗЗ – знайдено лише два алельних варіанти гліадинів (табл. 3.4 та 3.5).

У більшості випадків, частота алелів мікросателіту *Taglgap* повністю повторює частоту відповідного їм алельного варіанту гліадинів (табл. 3.4 та 3.5). Відрізняється лише алель *Taglgap* 237 п.н., який відповідає одразу Gli-B1c, Gli-B1e та Gli-B1f алельним варіантам, проте частота його залишається незначною та становить від 0,08 до 0,20.

Отже, крім двох основних та важливих для України алельних варіантів гліадинів – Gli-B1b та Gli-B1l, майже всі селекційні центри України використовують 1-3 інших алельних варіанти гліадинів у селекційних програмах.

3.3. Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей *Gli-B1* локусу пшениці м'якої та споріднених видів злаків

Проаналізувавши результати щодо *Gli-B1* локусу та виявивши поліморфізм у довжині фрагментів ампліфікації *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2* алелів, нами був проведений біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей гліадинових генів, що кодуються цим локусом, для підтвердження результатів ПЛР, пошуку нових імовірних алелів у *T. aestivum* L. та інших видів роду *Triticum*. Крім цього, методом *in silico* ПЛР, було проаналізовано ряд праймерів, розроблених до послідовностей γ - та ω -гліадинів у роботах Zhou, Liu et al.(2022), Paris et al. (2021), Wang et al. (2018), Кирієнко та ін. (2015), з метою пошуку додаткових маркерів, які можна було б використати для визначення алельних варіантів гліадинів.

На першому етапі, у нуклеотидних послідовностях, які були використані при розробці алель-специфічних праймерів до *Gli-B1* локусу, вказаних у роботі Zhang et al. (2003), шукали послідовності, які відповідають праймерам. На другому етапі, здійснювали BLAST пошук на платформі NCBI. У якості запиту використовували лише частину послідовності, яка відноситься до потенційного продукту ПЛР з відповідними праймерами, після чого, аналізували перших 100 найбільш подібних послідовностей, проводили *in silico* ПЛР з отриманої вибірки по кожному пошуку.

Загалом, із вибірки V-Gli-B1.1/2, отриманої за результатами BLAST пошуку із запитом у вигляді нуклеотидних послідовностей, що відповідають *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2* алелям, у базі даних Nucleotide, методом ПЛР *in silico*, було

знайдено лише два імовірні продукти ПЛР у нуклеотидних послідовностях AF234648.1 та M13712.1.

У нуклеотидній послідовності AF234648.1, яка належить псевдогену *T. aestivum* L. та використовувалася для розробки алель-специфічних праймерів, було знайдено SNP, що відповідає *Gli-B1.1* алелю, довжина послідовності, що фланкується праймерами, становила 379 п.н., що не співпадає з даними, вказаними у статті розробників Zhang et al. (2003), які зазначають довжину – 369 п.н.

Аналогічно у M13712.1, яка також використовувалася для розробки праймерів, було підтверджено наявність *Gli-B1.2* алеля, теоретична довжина продуктів, становила 397 п.н., що вказанно у роботі Zhang et al. (2003).

Ділянки послідовностей AF234648.1 та M13712.1, що фланкуються праймерами, відрізнялися за кількістю повторів мікросателіту з мотивом САА – дев'ять та 15 відповідно, що доводить причину поліморфізму довжини продуктів ампліфікації, виявлену у ПЛР.

Також на вибірці V-Gli-B1.1/2 було проведено ПЛР *in silico* із праймерами до мікросателіту *Taglgap*, та виявлено 16 теоретичних продуктів ампліфікації. Більшість нуклеотидних послідовностей, у яких було знайдено послідовності праймерів до *Taglgap*, були короткими, тому в них був відсутній зворотній праймер Gli-B1 R.

Лише три нуклеотидні послідовності з вибірки V-Gli-B1.1/2 - AF234648.1, M13712.1 та KC715968.1 мали достатню довжину, щоб проаналізувати взаємну локалізацію цих двох пар праймерів, тому, для їх порівняння було застосовано мультиплексне вирівнювання (рис. 3.10).


```

1. M13712.1 Whe gcagacctgtgtcattgggtctcatccctctgggtcaatgatctggccacaaagcgttgcc
2. AF234648.1 T gcagacctgtgtcattgggtctcatccctctgggtcaatgatctggccacaaagcgttgcc
3. KC715968.1 T gcagacctgtgtcattgggtctcatccctctgggtcaatgatctggccacaaagcgttgcc

1. M13712.1 Whe aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtg
2. AF234648.1 T aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtg
3. KC715968.1 T aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtg

1. M13712.1 Whe cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----aac
2. AF234648.1 T cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----aac
3. KC715968.1 T cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaagaacaacaacaacaacaac

1. M13712.1 Whe aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatgctgtatcctgc
2. AF234648.1 T -----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatgctgtatcctgc
3. KC715968.1 T aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatgctgtatcctgc

1. M13712.1 Whe tgccactatatacagcaacaacaggtgggtcaaggtactctcgtccagggccagggcatca
2. AF234648.1 T tgccactatatacagcaacaacaggtgggtcaaggtactctcgtccagggccagggcatca
3. KC715968.1 T tgccactatatacagcaacaacaggtgggtcaaggtactctcgtccagggccagggcatca

1. M13712.1 Whe tccaaccccaacaaccagctcaattggaggcgcaggtcattggtgttgcaaaactcttc
2. AF234648.1 T tccaaccccaacaaccagctcaattggaggcgcaggtcattggtgttgcaaaactcttc
3. KC715968.1 T tccaaccccaacaaccagctcaattggaggcgcaggtcattggtgttgcaaaactcttc

1. M13712.1 Whe caaccatgtgcaacgtgtatgtcccacctgagtgctctatcatcaaggcaccatttgcca
2. AF234648.1 T caaccatgtgcaacgtgtatgtcccacctgagtgctctatcatcaaggcaccatttgcca
3. KC715968.1 T caaccatgtgcaacgtgtatgtcccacctgagtgctctatcatcaaggcaccatttgcca

1. M13712.1 Whe gcatagtcaccggaattggtggccaatg
2. AF234648.1 T gcatagtcaccggaattggtggccaatg
3. KC715968.1 T gcatagtcaccggaattggtggccaatg

```

Рис. 3.10. Мультиплексне вирівнювання нуклеотидних послідовностей із вибірки V-Gli-B1.1/2, отримане за алгоритмом MAFFT

Послідовності: 1 - M13712.1 Wheat (*T.aestivum*) gamma gliadin pseudogene, complete; 2 - AF234648.1 *Triticum aestivum* clone G6 gamma-gliadin pseudogene; 3 - KC715968.1 *Triticum aestivum* cultivar Yumai34 clone 14 gamma-gliadin pseudogene. Блакитним кольором виділені послідовності, що відповідають алель-специфічним праймерам (Zhang et al., 2003), жовтим – праймерам до *Taglgap* (Devos et al., 1995), зеленим – однонуклеотидні поліморфізми (SNP).

Як видно із мультиплексного вирівнювання (рис. 3.10), нуклеотидні послідовності, які фланкуються алель-специфічними праймерами, та праймерами до мікросателіту *Taglgap*, перекриваються. Поліморфізм довжини фрагментів ампліфікації *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2* алелів спричинений поліморфізмом мікросателіту *Taglgap*, що підтверджується результатами ПЛР у даному дослідженні.

Однак, у випадку із нуклеотидною послідовністю KC715968.1, ПЛР можлива лише із парою праймерів до мікросателіту *Taglgap*. SNP, у послідовності, що відповідає прямому прамеру *Taglgap* F, не критична, для проходження реакції Kwok et al. (1990), на відміну від *Gli-B1* R (рис. 3.10).

У 97 інших нуклеотидних послідовностях із вибірки V-*Gli-B1.1/2*, або були знайдені одонуклеотидні поліморфізми в послідовності, що відповідає праймерам, (переважно у зворотньому), або вони були короткими, у зв'язку з чим неможливо було проаналізувати послідовність зворотнього праймера та довжину імовірного продукту ампліфікації.

Вибірка V-*Taglgap*, отримана із BLAST пошуку із запитом у вигляді нуклеотидної послідовності, що відповідає фрагментам ампліфікації локусу *Taglgap* сорту Chinese Spring, наведеній у статті Devos et al. (1995), та вибірка V-*Gli-B1.1/2*, були практично ідентичними та відрізнялися лише порядком у переліку номерів ідентифікатора. Із цих вибірок, методом ПЛР *in silico* із праймерами до *Taglgap*, було знайдено 16 нуклеотидних послідовностей. Три з них - AF234648.1, M13712.1 та KC715968.1, частково описані вище, оскільки у них знайдено ще й алелі *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2*, за локусом *Taglgap* ці послідовності характеризуються наступними алелями: 219 п.н., 237 п.н. та 252 п.н., відповідно.

В інших 13-ти нуклеотидних послідовностях теоретичні продукти ампліфікації виявлені лише для пари праймерів до мікросателіту *Taglgap*. Оскільки дані послідовності були короткими, у них було знайдено лише прямі праймери до *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2* алелів, зворотній праймер у них відсутній. Тому в цих послідовностях, крім алеля *Taglgap*, можна визначити ще й SNP алель - *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2*, але без розміру фрагментів ампліфікації (табл. 3.6).

Так, знайдено три короткі нуклеотидні послідовності, що належать виду *T. aestivum* L.: AJ389690.1 (сорт Forno), AJ389693.1 (сорт Катерва), AJ389689.1 (Chinese Spring) із алелями *Taglgap* 237 п.н., 270 п.н. та 285 п.н. відповідно, та алелем *Gli-B1.2*. Алелі сортів Катерва та Chinese Spring підтверджуються ще й у лабораторних дослідженнях даної роботи. Загалом, усі алелі, виявлені у ПЛР *in*

silico для виду *T. aestivum* L, були знайдені також під час лабораторного експерименту у світовій чи українській вибірці сортів пшениці м'якої.

Таблиця 3.6

**Результати ПЛР *in silico* у вибірках нуклеотидних послідовностей
V-Gli-B1.1/2 та V-Taglgap**

Ідентифікатор	Вид/сорт	Алель за <i>Gli-B1</i> локусу за Zhang et al. (2003)	Алель <i>Taglgap</i> ,
M13712.1	<i>T. aestivum</i>	<i>Gli-B1.2</i> *	237
AF2344648.1	<i>T. aestivum</i>	<i>Gli-B1.1</i> *	219
KC715968.1	<i>T. aestivum</i> /Ymai34	<i>Gli-B1.2</i> **	252
AJ389690.1	<i>T. aestivum</i> /Forno	<i>Gli-B1.2</i>	237
AJ389693.1	<i>T. aestivum</i> /Katepwa	<i>Gli-B1.2</i>	270
AJ389689.1	<i>T. aestivum</i> /Chinese-Spring	<i>Gli-B1.2</i>	285
AJ389702.1	<i>T. durum</i> /Fortore	<i>Gli-B1.2</i>	249
AJ389699.1	<i>T. durum</i> /Astrodour	<i>Gli-B1.2</i>	249
AJ389704.1	<i>T. durum</i> /Wascana	<i>Gli-B1.1</i>	222
AJ389705.1	<i>T. dicoccum</i>	<i>Gli-B1.2</i>	240
AJ389706.1	<i>T. dicoccum</i>	<i>Gli-B1.2</i>	243
AJ389707.1	<i>T. dicoccoides</i>	<i>Gli-B1.2</i>	255
AJ389708.1	<i>T. dicoccoides</i>	<i>Gli-B1.2</i>	279
AJ389696.1	<i>T. spelta</i> /Obercumber	<i>Gli-B1.2</i>	243
AJ389709.1	<i>T. timophevii</i>	<i>Gli-B1.1</i>	237
AJ389710.1	<i>T. timophevii</i>	<i>Gli-B1.1</i>	234

* Довгі нуклетидні послідовності, у яких знайдено *Gli-B1* R праймер.

** Довга нуклеотидна послідовність, у якій знайдено поліморфізм у *Gli-B1* R праймері.

Ще три послідовності належали виду *Triticum durum*: AJ389702.1 (сорт Fortore) та AJ389699.1 (сорт Astrodour) із алелями *Taglgap* 249 п.н. та *Gli-B1.2*, та AJ389704.1 (сорт Wascana) із алелями *Taglgap* 222 п.н. та *Gli-B1.1*. Алель *Taglgap* 249 п.н. виявлений нами також і під час лабораторного експерименту у сорту пшениці м'якої Ardec.

По дві нуклеотидні послідовності, які містять ділянку, що франкується праймерами до *Taglgap*, було знайдено для видів *Triticum dicoccum* (AJ389705.1 та AJ389706.1 із алелями *Taglgap* 231 п.н. та 243 п.н., відповідно і алелем *Gli-*

B1.2), *Triticum diccoccoides* (AJ389707.1 та AJ389708.1 із алелями *Taglgap* 255 п.н. та 279 п.н., відповідно, та алелем *Gli-B1.2*), *Triticum timophevii* (AJ389709.1 та AJ389710.1 із алелями *Taglgap* 237 п.н. та 234 п.н., відповідно і алелем *Gli-B1.1*). Та одна послідовність відносилася до виду *Triticum spelta*, сорту Obercumber із алелями *Taglgap* 243 п.н. та *Gli-B1.2*.

Більшість видів із позитивним результатом *in silico* ПЛР з праймерами до *Taglgap* є носіями В субгену: тетраплоїдні *T. durum*, *T. diccoccum* та *T. diccoccoides*, з геномом А^uВ, та гексаплоїдні *T. aestivum* L та *T. spelta* А^uВD. Винятком із цього була пшениця *T. timophevii* із геномом А^bА^bGG. Імовірно, *Taglgap* локус присутній саме у G субгені, оскільки В та G субгені мають спільне походження із *Aegilops speltoides* (геном S) (Yadav et al., 2023).

Для нуклеотидних послідовностей, у яких було знайдено ділянку, що фланкується праймерами до *Taglgap*, було застосовано мультиплексне вирівнювання для більш детального порівняння (рис. 3.11) Із мультиплексного вирівнювання видно, що, крім поліморфізму самого мікросателіту *Taglgap*, із мотивом САА, у деяких нуклеотидних послідовностях присутні ще й одностандартні поліморфізми в межах ділянки, яка теоретично може ампліфікуватися з використанням праймерів, розроблених Devos et al. (1995).

Із 16 послідовностей, що вирівнювалися, у п'яти присутній SNP поліморфізм у другій позиції із 5' кінця *Taglgap* F праймера, проте така позиція не є критичною для ДНК-полімерази, тому не завадить ампліфікації (рис. 3.11). Ці п'ять послідовностей, що належать видам *T. aestivum*, *T. durum*, *T. spelta*, *T. diccoccum*, мають ще один спільний SNP поліморфізм (послідовності 5-9, рис. 3.11).

1. AJ389689.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. aestivum
2. AJ389708.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. dicoccoides
3. AJ389693.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. aestivum
4. AJ389707.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. dicoccoides
5. KC715968.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. aestivum
6. AJ389702.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. durum
7. AJ389699.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. durum
8. AJ389696.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. spelta
9. AJ389706.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. dicoccum
10. AJ389705.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. dicoccum
11. AJ389690.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. aestivum
12. M13712.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. aestivum
13. AJ389709.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. timopheevii
14. AJ389710.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. timopheevii
15. AJ389704.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. durum
16. AF234648.1	gcagacctgtgtcattgggtc	atccctctgggcaatgatctggccacaagcgcttgcc	Tr. aestivum
1. AJ389689.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. aestivum	
2. AJ389708.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. dicoccoides	
3. AJ389693.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. aestivum	
4. AJ389707.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. dicoccoides	
5. KC715968.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. aestivum	
6. AJ389702.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. durum	
7. AJ389699.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. durum	
8. AJ389696.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. spelta	
9. AJ389706.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. dicoccum	
10. AJ389705.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. dicoccum	
11. AJ389690.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. aestivum	
12. M13712.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. aestivum	
13. AJ389709.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. timopheevii	
14. AJ389710.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. timopheevii	
15. AJ389704.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. durum	
16. AF234648.1	aagtgatgaggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtggtg	Tr. aestivum	
1. AJ389689.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaagaacaacaacaacaac	Tr. aestivum	
2. AJ389708.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaaga	-----aacaacaacaac	Tr. dicoccoides
3. AJ389693.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----aac	Tr. aestivum
4. AJ389707.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. dicoccoides
5. KC715968.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. aestivum
6. AJ389702.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. durum
7. AJ389699.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. durum
8. AJ389696.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. spelta
9. AJ389706.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. dicoccum
10. AJ389705.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. dicoccum
11. AJ389690.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. aestivum
12. M13712.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. aestivum
13. AJ389709.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. timopheevii
14. AJ389710.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. timopheevii
15. AJ389704.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. durum
16. AF234648.1	cagccatccatagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag	-----	Tr. aestivum
1. AJ389689.1	aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. aestivum	
2. AJ389708.1	aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. dicoccoides	
3. AJ389693.1	aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. aestivum	
4. AJ389707.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. dicoccoides	
5. KC715968.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. aestivum	
6. AJ389702.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. durum	
7. AJ389699.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. durum	
8. AJ389696.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. spelta	
9. AJ389706.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. dicoccum	
10. AJ389705.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. dicoccum	
11. AJ389690.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. aestivum	
12. M13712.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. aestivum	
13. AJ389709.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. timopheevii	
14. AJ389710.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. timopheevii	
15. AJ389704.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. durum	
16. AF234648.1	-----aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	Tr. aestivum	
1. AJ389689.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. aestivum
2. AJ389708.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. dicoccoides
3. AJ389693.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. aestivum
4. AJ389707.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. dicoccoides
5. KC715968.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. aestivum
6. AJ389702.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. durum
7. AJ389699.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. durum
8. AJ389696.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. spelta
9. AJ389706.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. dicoccum
10. AJ389705.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. dicoccum
11. AJ389690.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. aestivum
12. M13712.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. aestivum
13. AJ389709.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. timopheevii
14. AJ389710.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. timopheevii
15. AJ389704.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. durum
16. AF234648.1	aacaacaacaacaacaaggcatgggtatcctgctgccaactatatac	agcaacaacaggtggg	Tr. aestivum

Рис. 3.11. Мультиплексне вирівнювання нуклеотидних послідовностей, що містять *Taglgap* локус, отримане за алгоритмом MAFFT. Жовтим кольором виділені послідовності, що відповідають праймерам до *Taglgap* (Devos et al., 1995), зеленим – однонуклеотидні поліморфізми (SNP)

Виявлений SNP поліморфізм, у чотирьох інших нуклеотидних послідовностях, що належать видам *T. aestivum*, *T. durum*, *T. timophevii*, (рис. 3.11, 13-16), був використаний при розробці алель-специфічних праймерів, та визначає *Gli-B1.1* алель у цих послідовностей. Цікавим є те, що *Gli-B1.1* алель зустрічається у послідовностей з меншою кількістю повторів корового мотиву мікросателіту, у порівнянні із тими, у яких знайдено *Gli-B1.2* алель (рис. 3.11).

Нуклеотидні послідовності виду *T. timophevii*, відрізнялися від інших послідовностей, наявністю ще двох SNP поліморфізмів (рис. 3.11).

Було виявлено, як мінімум два алелі мікросателіту *Taglgap*, які зустрічалися більше, ніж в одного виду. Так, алель 237 п.н., виявлений у *T. aestivum* та *T. timophevii*, алель 249 п.н., знайдений у *T. durum*, був виявлений у *T. aestivum*, в ході лабораторного експерименту.

В інших нуклеотидних послідовностях з вибірок V-Gli-B1.1/2 та V-*Taglgap*, виявлено SNP поліморфізми у послідовностях праймерів, що робить неможливим проходження ПЛР. Усі ці послідовності належать генам та псевдогенам гліадинів та містять повторювальну ділянку з мотивом САА різної довжини, що очікувано, оскільки даний триплет є кодоном глутаміну, на який багаті гліадини та інші запасні білки пшениці. Частіше SNP поліморфізми були виявлені у послідовності зворотнього праймера Gli-B1 R, тому у таких випадках умовно можна було проаналізувати алель, що визначається SNP на 3'-кінці прямого праймера: *Gli-B1.1* (аденін) та *Gli-B1.2* (цитозин).

У шести послідовностей, що належали гліадиновим генам виду *Aegilops bicornis*, одної послідовності *T. spelta*, та 23 послідовностей різних γ -гліадинових генів *T. aestivum*, SNP було знайдено лише у послідовності зворотнього праймера, та прямий праймер, до *Gli-B1.1* алеля. В інших нуклеотидних послідовностей SNP були зафіксовані у F та R праймерах одночасно, до них належали нуклеотидні послідовності *Aegilops longissima* (5 послідовностей), *Aegilops sharonensis* (8 послідовностей), *Aegilops speltoides* (5 послідовностей), *Critopsis delineana* (одна послідовність), *Pseudoroegneria stripifolia* (одна

послідовність), *Lyopyrum elongatum* (4 послідовності), *Lyopyrum elongatum***T. aestivum* (5 послідовностей), *T. turgidum* (11 послідовностей), *Triticum taushii* (12 послідовностей). Також всі ці послідовності містили SNP в послідовностях праймерів до *Taglgap*.

Відповідність між алелями мікросателіту *Taglgap* та алелями *Gli-B1.1/Gli-B1.2*, що визначаються SNP, у знайдених послідовностях в базі даних Nucleotide та визначена в ході експериментальної роботи зберігається: алелі *Taglgap* 237 п.н., 249 п.н., 252 п.н., 270 п.н., 285 п.н. відповідають *Gli-B1.2* алелю, причому навіть у виду *T. durum* (249 п.н. - *Gli-B1.2*). Вийняток, була лише нуклеотидна послідовність *T. timophevii*, з алелем *Taglgap* 237 п.н. та *Gli-B1.1*, чого не було зафіксовано для виду *T. aestivum* у ПЛР *in silico* та у сортів пшениці м'якої української та світової колекції даної роботи.

Порівнюючи відповідність між алелями мікросателіту *Taglgap* та алелями *Gli-B1.1/Gli-B1.2*, що визначаються SNP, виявлену у ПЛР *in silico* та в ході експериментальної роботи у сортів пшениці м'якої української та світової колекції, спостерігається наступна тенденція: сорти та види з алелями *Taglgap* 216 п.н.- 237 п.н., характеризуються *Gli-B1.1* алелем, а сорти та види з алелями *Taglgap* 237 п.н.- 285 п.н., характеризуються *Gli-B1.2* алелем. Алель *Taglgap* 237 п.н. зустрічається у комбінації із *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2* алелями. Одним вийнятком є лише алель *Taglgap* 248 п.н., який відповідає *Gli-B1.1*.

Незрозумілою є приналежність ділянки, що ампліфікується із праймерами до мікросателіту *Taglgap* до гену чи псевдогену. Оскільки, послідовності AF234648.1, M13712.1 та KC715968.1 за описом, належать γ -гліадиновому псевдогену, а всі інші 13 – є γ -гліадиновим геном GAG56B, тому окрема увага приділялася великій нуклеотидній послідовності всього B1 локусу, яка є анотованою, і була використана для з'ясування локалізації ділянок *Gli-B1* локусу, які ампліфікувалися з алель-специфічними праймерами та праймерами до мікросателіту *Taglgap*.

У великій нуклеотидній послідовності *Gli-B1* локусу MG560141.1 довжиною 6 535 908 п.н. в ході, BLAST пошуку було знайдено ділянку, ідентичну до запиту, у вигляді нуклеотидної послідовності фрагментів ампліфікації із праймерами до мікросателіту *Taglgap*, у сорту Chinese Spring (Devos et al., 1995), (рис. 3.12). При використанні у якості запиту нуклеотидних послідовностей, які відповідали алелям *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2* у BLAST пошуку послідовність MG560141.1 потрапила у вибірку V-*Gli-B1.1/2*, але співпадіння було видно лише частково, послідовність запиту була розділена на два ранги посередині мікросателіту.

Query	1	<u>GCAGACCTGTGTCATTGGTCT</u> CATCCCTCTGGTCAATGATCTGGCCACAAAGCGCTTGCC	60
Sbjct	3377023	<u>GCAGACCTGTGTCATTGGTCT</u> CATCCCTCTGGTCAATGATCTGGCCACAAAGCGCTTGCC	3377082
Query	61	AAGTGATGAGGCAACAATGCTGCCAACAAC TAGCACAGATTCTCAGCAGCTCCAGTGTG	120
Sbjct	3377083	AAGTGATGAGGCAACAATGCTGCCAACAAC TAGCACAGATTCTCAGCAGCTCCAGTGTG	3377142
Query	121	CAGCCATCCATAGCGTCGTGCATTCCATCAGCATGTAGCAAGaacaacaacaacaacaac	180
Sbjct	3377143	CAGCCATCCATAGCGTCGTGCATTCCATCAGCATGTAGCAAGAACAACAACAACAACAAC	3377202
Query	181	aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaac	240
Sbjct	3377203	AACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC	3377262
Query	241	aacaacaacaacaacaacaaGGCATGCGTATCCTGCTGCCACTATATC	285
Sbjct	3377263	AACAACAACAACAACAAGGCATGCGTATCCTGCTGCCACTATATC	3377307

Рис. 3.12. Порівняння нуклеотидних послідовностей у сервісі BLAST.

Query – нуклеотидна послідовність, що фланкується праймерами до мікросателіту *Taglgap*, наведена у статті Devos et al., (1995)

Sbjct – MG560141.1

Червоним підкреслені послідовності, що відповідають праймерам до мікросателіту *Taglgap*

Проте, після використання власної програми InSilicoPCR, було виявлено, що нуклетидні послідовності, які відповідають *Gli-B1.1/Gli-B1.2* алелям та мікросателіту *Taglgap* перекриваються, як це було описано у випадку із AF234648.1, M13712.1 та KC715968.1. BLAST пошук не дозволив виявити *Gli-B1.1/Gli-B1.2* алелі, через присутність мікросателіту з більшою кількістю

повторів корового мотиву у порівнянні із послідовністю запиту, розділивши її на ранги.

У послідовності MG560141.1 методом ПЛР *in silico* виявлено наступні алелі: *Taglgap* 285 п.н. та алель *Gli-B1.2*, що відповідає сорту Chinese Spring. Проте, теоретична довжина фрагментів ампліфікації *Gli-B1.2* алеля становила 445 п.н., що відрізняється від результатів, отриманих в ПЛР у лабораторному експерименті, для сорту Chinese Spring на 30 п.н. Імовірно, це може бути похибкою, оскільки при середній тривалості електрофорезу 2,5 години, відстань між смугами маркера молекулярної маси *pUC/MspI*, довжиною 501 п.н. на 489 п.н. становила в середньому 0,3 см, тобто різниця у 30 п.н. на гелі буде виражатися у 0,75 мм проходження на доріжці гелю. У зв'язку з цим, уточнення довжини фрагментів ампліфікації можливо отримати лише методом секвенування.

Послідовності, що фланкуються праймерами до *Taglgap* та алеля *Gli-B1.2* локалізовані у наступних ділянках 3377023-3377308 п.н. та 3377059-3377504 п.н. від 5'-кінця MG560141.1, відповідно, що підтверджує їх прекривання. Згідно з анотацією MG560141.1, дана ділянка послідовності є некодуючою та знаходиться між генами «gamma-gliadin B4» (3338800-3339906 п.н.) та «gamma-gliadin B6» (3381440-3382315 п.н.).

За анотацією MG560141.1, дана нуклеотидна послідовність охоплює наступні гени *Gli-B1* локусу: gamma-gliadin B1, gamma-gliadin B2, delta-gliadin B1, gamma-gliadin B4, gamma-gliadin B6, omega-gliadin B3, omega-gliadin B6, LMW glutenin B2, LMW glutenin B3.

Згідно із публікацією Huo, Zhang et al. (2018), у *Gli-B1* локусі сорту Chinese Spring (рис. 1.2, Б) вісім генів ω -гліадинів, шість γ -гліадинів, один δ -гліадин та чотири LMW глютеніни.

На електрофореграмах запасних білків сорту Chinese Spring видно шість смуг гліадинів, які визначають *Gli-B1a* алельний варіант Metakovsky et al. (2018).

Крім послідовностей праймерів, які використовувалися в роботі у ПЛР *in silico* аналізували й інші праймери, що були розроблені до γ -гліадинових чи ω -гліадинових генів. Для цього було створено ще додаткові вибірки. У якості запиту для BLAST пошуку використовували нуклеотидні послідовності генів, анотованих у MG560141.1. Всього для *Gli-B1* локусу було сформовано сім вибірок, названих відповідно до гену, послідовність якого використовувалася як запит: V-gamma-gli-B, V-gamma-gli-B2, V-delta-gli-B1, V-gamma-gli-B4, V-gamma-gli-B6, V-omega-gli-B3, V-omega-gli-B6.

Отже, ПЛР *in silico*, показала, можливість застосування праймерів до мікросателіту *Taglgap*, для досліджень інших видів пшениць.

3.4. Секвенування найбільш поширених алелів *Gli-B1* локусу

Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей *Gli-B1* локусу показав, що послідовності, які фланкуються алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу, та праймерами до мікросателіту *Taglgap* перекриваються та їх алелі залежать від кількості повторів мотиву САА, тому вони повинні відповідати один одному.

Проте, в ході експерименту виявилось, що сорти Bezostaya-1 та Myronivska-808 характеризуються алелем *Taglgap* 216 п.н., а за алель-специфічними праймерами – *Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 369 п.н. (спостерігалось на більшості електрофореграм), коли інші сорти цієї групи мали алель *Taglgap* 216 п.н., проте довжина фрагментів ампліфікації *Gli-B1.1* алеля становила 372 п.н. Незрозумілими були також алелі сорту Krasnodonka, оскільки у неї виявлено алель *Taglgap* 246 п.н., що менше від сорту Federation (248 п.н.), а за алель-специфічними праймерами фрагменти ампліфікації Krasnodonka становили 401 п.н., що більше, ніж у сорту Federation (400 п.н.) Крім цього, існує імовірність, що такі алелі як 401 п.н., 402 п.н., 403 п.н., відрізняються мотивом, тобто на 3 п.н.

У зв'язку з цим було обрано для секвенування 12 різних алелів, отриманих із застосуванням алель-специфічних праймерів до *Gli-B1* локусу: *Gli-B1.1*, 369 п.н. (сорт Gabo, Myronivska-808); *Gli-B1.1*, 372 п.н. (сорт Goelent); *Gli-B1.1*, 400 п.н. (сорт Federation); *Gli-B1.2*, 397 п.н. (сорт Prinqual); *Gli-B1.2*, 401 п.н. (сорт Krasnodonka); *Gli-B1.2*, 402 п.н. (сорт Ardec); *Gli-B1.2*, 403 п.н. (сорт Caia); *Gli-B1.2*, 406 п.н. (сорт Любава); *Gli-B1.2*, 409 п.н. (сорт Suneca); *Gli-B1.2*, 415 п.н. (сорт Chinese-Spring); *Gli-B1.2*, 398 п.н. (сорт Girka).

Із дванадцяти зразків, для чотирьох, що належать сортам Goelent, Federation, Krasnodonka та Chinese-Spring не вдалося отримати якісну нуклеотидну послідовність.

Результати секвенування показали, що сорти Gabo та Myronivska-808, які характеризуються *Gli-B1b* алельним варіантом гліадинів, відрізняються на один повтор мотиву мікросателіту – (CAA)₇ та (CAA)₈, відповідно (рис. 3.13). Референсна нуклеотидна послідовність – AF234648.1, яка була вказана Zhang et al. (2003) для *Gli-B1.1* алеля є довшою на один повтор мотиву – (CAA)₉. Отже, алель, присутній у референсній послідовності AF234648.1, у досліджених збірках не знайдено.

У нуклеотидній послідовності отриманій для сорту Prinqual, який характеризується *Gli-B1c* алельним варіантом гліадинів, виявлено 15 повторів корового мотиву, вона є ідентичною до референсної послідовності M13712.1 (рис. 3.3). Референсні послідовності та послідовності сортів Gabo, Myronivska-808 та Prinqual відрізняються між собою лише алелем мікросателіту. Сорт Girka відрізняється від сорту Prinqual на один мотив мікросателіту – (CAA)₁₆, а також рядом SNP.

Нуклеотидні послідовності сортів із *Gli-B1h* алельним варіантом гліадинів – Ardec та Caia містили однакову кількість повторів (CAA)₁₉, проте відрізнялися між собою декількома SNP. У цих послідовностей виявлено також два SNP (заміна С на А та С на Т, рис. 3.13), що відрізняє їх від сортів, що

характеризуються іншими алельними варіантами гліадинів (рис. 3.13, перша частина вирівнювання, SNP виділено жовтим).

```

1. Gabo_Y1_A08.  aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
2. Myron-808_Y4  aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
3. AF234648.1   aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
4. Prinqual_Y9_ aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
5. M13712.1     aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
6. Girka_Y6_D09  aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
7. Ardec_Y7_D08  aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
8. Caia_Y11_F08  aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
9. Liubava_Y10_  aggcaacaatgatgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc
10. AJ389693.1   aggcaacaatgctgccaacaactagcacagattcctcagcagctccagtgtgcagccatc

1. Gabo_Y1_A08.  catagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----
2. Myron-808_Y4  catagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----
3. AF234648.1   catagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----
4. Prinqual_Y9_  catagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----
5. M13712.1     catagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----
6. Girka_Y6_D09  caagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----
7. Ardec_Y7_D08  catagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----aaca
8. Caia_Y11_F08  catagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----aaca
9. Liubava_Y10_  cataagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaag-----aacaacaacaacaaca
10. AJ389693.1   catagcgtcgtgcattccatcagcatgtagcaagaacaacaacaacaacaacaaca

1. Gabo_Y1_A08.  -----aacaacaacaacaacaacaacaaggcatg
2. Myron-808_Y4  -----aacaacaacaacaacaacaacaaggcatg
3. AF234648.1   -----aacaacaacaacaacaacaacaaggcatg
4. Prinqual_Y9_  -----aacaacaacaacaacaacaacaaggcatg
5. M13712.1     -----aacaacaacaacaacaacaacaaggcatg
6. Girka_Y6_D09  ----aacaacaacaacaacaacaacaaggcatg
7. Ardec_Y7_D08  caacaacaacaacaacaacaaggcatg
8. Caia_Y11_F08  caacaacaacaacaacaacaaggcatg
9. Liubava_Y10_  caacaacaacaacaacaacaaggcatg
10. AJ389693.1   caacaacaacaacaacaacaaggcatg

1. Gabo_Y1_A08.  cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
2. Myron-808_Y4  cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
3. AF234648.1   cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
4. Prinqual_Y9_  cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
5. M13712.1     cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
6. Girka_Y6_D09  cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
7. Ardec_Y7_D08  cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
8. Caia_Y11_F08  cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
9. Liubava_Y10_  cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc
10. AJ389693.1   cgtatcctgctgccactatatcagcaacaacaggtgggtcaaggtaactctcgtccagggc

```

Рис. 3.13. Фрагмент мультиплексного вирівнювання нуклеотидних послідовностей, отриманих в результаті секвенування отримане за алгоритмом MAFFT. Жовтим позначено SNP поліморфізми

Хоч нуклеотидна послідовність для сорту Krasnodonka, була неякісна, у ній ми змогли отримати кількість повторів корового мотиву мікросателіту, що становила (CAA)₁₇. Тобто сорти, що характеризуються Gli-B1h алельним варіантом гліадинів, відрізняються як алелем мікросателіту, так і SNP, тому продукти ампліфікації отримані із алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу, можуть відрізнятися навіть на один нуклеотид, що пояснює отримані нами результати ПЛР. Із двох сортів, що характеризуються Gli-B1d алельним варіантом гліадинів, результат вдалося отримати лише для сорту Любава, для порівняння, як референсу було взято нуклеотидну послідовність AJ389693.1 сорту Katerwa із GeneBank (що також має Gli-B1d). Виявлено, що сорт Любава має на два повтори мікросателіту менше, ніж інші сорти цієї групи, а також має ряд SNP (рис. 3.13).

На основі отриманих в результаті секвенування послідовностей, була побудована дендрограма (рис. 3.14). У ній в один кластер об'єднуються п'ять нуклеотидних послідовностей, які розділяються на два підкластери.

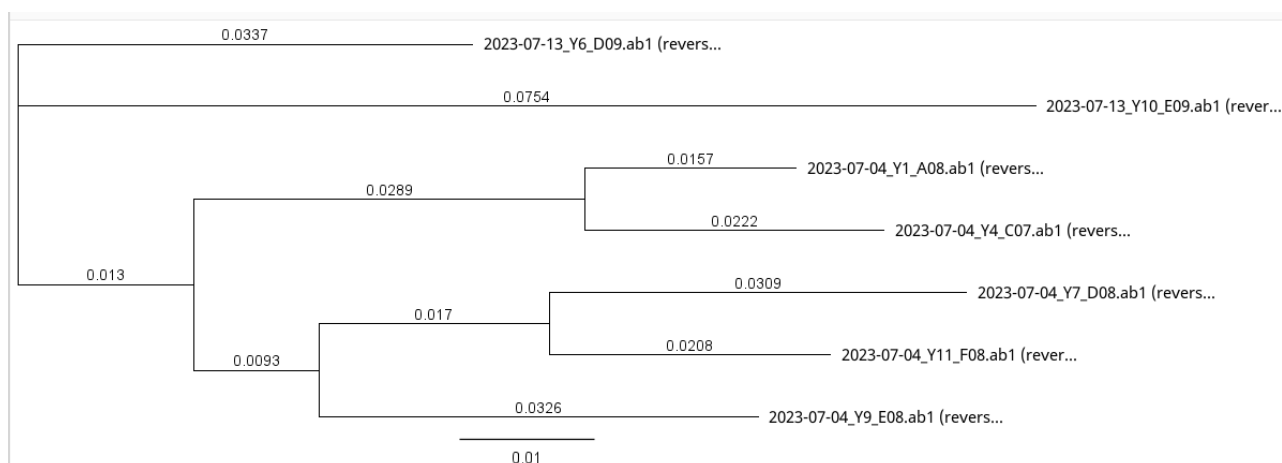


Рис. 3.14. Дендрограма нуклеотидних послідовностей отриманих в результаті секвенування, побудована методом Neighbor-Joining. Y1 – Gabo; Y4 – Myronivska-808; Y6 – Girka; Y7 – Ardec; Y9 – Prinqual; Y10 – Любава; Y11- Caia

До першого підкластеру входять сорти Gabo та Myronivska-808 (рис. 3.14, Y1 та Y4), які характеризуються Gli-B1b алельним варіантом гліадинів та *Gli-*

B1.1 алелем за результатами ПЛР, до другого – сорти Ardec, Caia та Prinqual (рис. 3.14, Y7, Y11 та Y9). Окремо на дендрограмі відділені сорт Любава (рис. 3.14, Y10), що характеризується *Gli-B1d* алельним варіантом, та давній український сорт Girka (рис. 3.14, Y6).

Хоч секвенування ПЛР-продукту не дозволяє отримати повну послідовність фрагмента ампліфікації, перші 20-30 нуклеотидів відсутні, проте воно охоплює найбільш важливу, на нашу думку, ділянку – мікросателіт, що дозволить точно визначити кількість повторів корового мотиву у різних сортів, пов'язану з тим чи іншим алельним варіантом гліадинів (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Коригування довжини фрагментів ампліфікації алелів *Gli-B1* локусу та мікросателіту *Taglgap*, отриманої різними методами

Група сортів	Алель-специфічна ПЛР (SNP-алель)	Алелі <i>Gli-B1</i> , визначені в ПЛААГ, п.н.	Алелі <i>Gli-B1</i> , п.н. (GeneBank)	Алелі <i>Taglgap</i> , визначені в ПЛААГ п.н.	Алелі <i>Taglgap</i> , п.н. (GeneBank)	Кількість повторів корового мотиву**	Відкорегований розмір <i>Gli-B1</i> , п.н.	Відкорегований розмір <i>Taglgap</i> , п.н.
1	<i>B1.1</i>	369	379	213	-	7	373	213
2	<i>B1.1</i>	372	-	216	-	8	376	216
3	<i>B1.1</i>	400	-	248	-	?	406*	246*
13	<i>B1.1</i>	403	-	252	-	?	409*	249*
4	<i>B1.2</i>	397	397	237	237	15	397	237
12	<i>B1.2</i>	398	-	243	240	16	400	240
5	<i>B1.2</i>	401	-	246	243	17	403*	243*
6	<i>B1.2</i>	402	-	249	-	19	409	249
7	<i>B1.2</i>	403	-	252	-	19	409	249
11	<i>B1.2</i>	406	-	267	-	24	424	264
8	<i>B1.2</i>	409	-	270	270	26	430	270
9	<i>B1.2</i>	415	-	285	285	31	445	285

*коригування зроблене відносно результатів, отриманих для інших груп, оскільки дані для цих груп отримати не вдалося.

Враховуючи отримані секвеновані послідовності, кількість повторів корового мотиву, нуклеотидні послідовності, наявні у GeneBank, було

відкореговано розміри фрагментів ампліфікації ряду алелів (табл. 3.7), що визначаються алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу та мікросателіту *Taglgap*.

Отже, відкорегована довжина фрагментів ампліфікації ряду алелів та характеристика підгруп буде виглядати наступним чином:

1. Підгрупа 1 – *Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 373 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 213 п.н.
2. Підгрупа 2 – *Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 376 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 216 п.н.
3. Підгрупа 3 – *Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 406 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 246 п.н.
4. Підгрупа 4 – *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 397 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 237 п.н.
5. Підгрупа 5 – *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 403 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 243 п.н.
6. Підгрупи 6 та 7 – *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 409 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 249 п.н.
7. Підгрупа 8 – *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 430 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 270 п.н.
8. Підгрупа 9 – *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 445 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 285 п.н.
9. Підгрупа 11 – *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 424 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 264 п.н.
10. Підгрупа 12 – *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 400 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 240 п.н.
11. Підгрупа 13 – *Gli-B1.1* алель з фрагментами ампліфікації 409 п.н, та алель мікросателіту *Taglgap* – 249 п.н.

Загалом, більш точні розміри, отримані з електрофореграм фрагментів ампліфікації були отримані для мікросателіту *Taglgap*, що було очікувано, оскільки праймери до *Taglgap*, фланкують меншу за довжиною діляну, яка краще розділяється в ході електрофорезу в 7% ПААГ.

РОЗДІЛ 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ *GLI-A1* ЛОКУСУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

4.1. Генетичний поліморфізм *Gli-A1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої

Для аналізу генетичного поліморфізму *Gli-A1* локусу було застосовано 2 пари алель-специфічних праймерів, розроблених Zhang et al. (2003) до алелів, що визначаються SNP: *Gli-A1.1* (гуанін) та *Gli-A1.2* (аденін) (Більш детально описано у підпункті 4.3, та продемонстровано на нуклеотидних послідовностях рис. 4.4). На відміну від аналогічних праймерів до *Gli-B1* локусу, фрагменти ампліфікації *Gli-A1.1* та *Gli-A1.2* алелів були однакової довжини, що вказана розробниками – 168 п.н., проте, виникали труднощі із специфічністю ПЛР з даними праймерами (рис. 4.1).

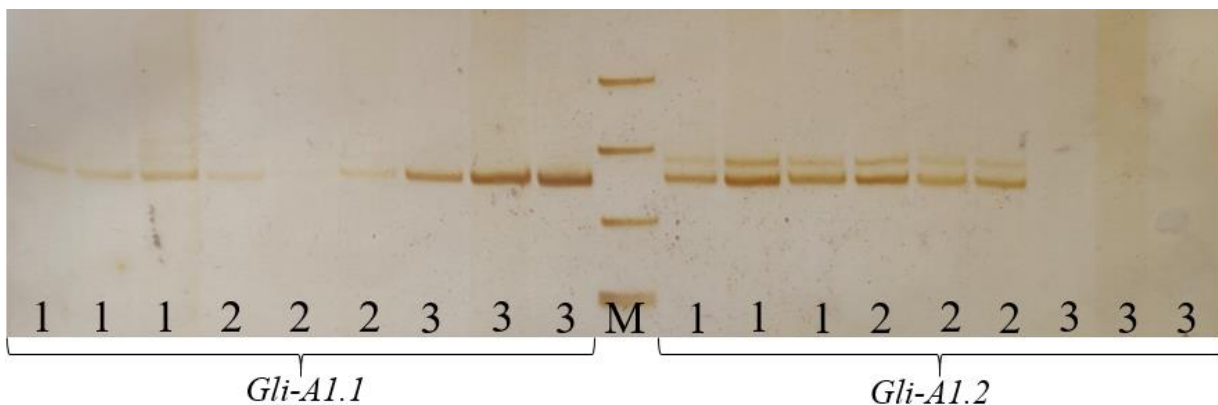


Рис. 4.1. Електрофореграми продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелів сортів пшениці м'якої з української колекції з використанням DreamTaq ДНК-полімерази. ДНК сортів: 1 – Чародійка білоцерківська, 2 – Водограй білоцерківський, 3 – Зоряна носівська, М – маркер молекулярної маси *pUC19/MspI*

На рівні із гетерогенними за *Gli-A1* локусом сортами, у деяких сортів було зафіксовано одразу два алеля у кожній перевірній зернівці, у деяких ефективність реакції була однаковою для двох алелів, в інших, більш вираженим був один. Така особливість, швидше, залежала від сорту (рис. 4.1).

На рисунку 4.1 відображена електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1.1/Gli-A1.2* з використанням DreamTaq ДНК-полімерази, для сортів Чародійка білоцерківська та Водограй білоцерківський, у яких присутні фрагменти ампліфікації двох алелів, проте з більш вираженим *Gli-A1.2*, коли у сорту Зоряна носівська лише *Gli-A1.1*, хочь реакційна суміш для них використовувалася одна.

Зміна температури відпалу чи концентрації йонів магнію дозволяла лише знизити ефективність, але не підвищувала специфічність для одного з алелів. У такій ситуації виникає ряд питань: якщо позитивний результат ПЛР для двох алелів одночасно, спричинений саме складом реакційної суміші, то чому тоді у більшості сортів, із тієї ж реакційної суміші проявляється лише один алель? Якщо дані сорти є гетерогенними, або навіть триплоїдний ендосперм є гетерогенним, то чому тоді у них не виявлено гомозигот взагалі? Чому тоді з аналогічними праймерами до *Gli-B1* локусу не виникало таких результатів? Ми висунули гіпотезу, що імовірно, причиною цього може бути копійність нуклеотидної послідовності, що досліджується.

Частковим вирішенням даної проблеми стало застосування іншої ДНК полімерази – HotStart, яка проявляє дуже високу специфічність. На рис. 4.2 , показана електрофореграма продуктів ПЛР, отриманих із праймерами до *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелів сортів пшениці м'якої, у яких проявлялися одразу два алелі. Проте, все одно, у деяких зразків ледь помітно проявлявся другий алель.

Результат враховували, опираючись на дані, отримані у ПЛР із HotStart ДНК-полімеразою та більш виражену ефективність реакції з праймерами до відповідного алеля (табл. 4.1).

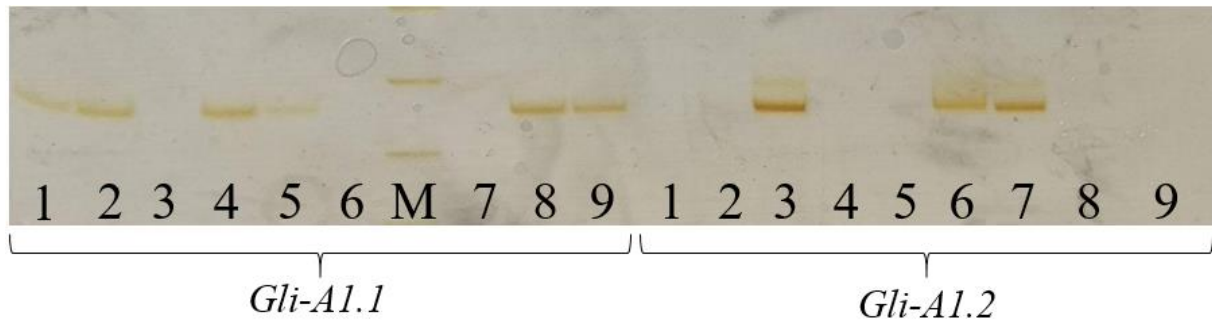


Рис. 4.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелів сортів пшениці м'якої з української колекції з використанням HotStart ДНК-полімерази. ДНК сортів: 1 – Лісова пісня , 2 – Світанок миронівський, 3 – Водограй білоцерківський, 4 – Вільшана, 5 – Естафета миронівська, 6 – Перлина лісостепу, 7 – Чародійка білоцерківська, 8 – лінія КС1, 9 – Говтва, М – маркер молекулярної маси *pUC19/MspI*

Алельні варіанти гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом, визначали у спільних дослідженнях із О. М. Благодаровою – провідним науковим співробітником СГІ-НЦНС. Постановку електрофорезу проводили за методикою Поперелі, алельні варіанти гліадинів позначали за каталогом Є. В. Метаковського (2018) (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Результати ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу, розробленими Zhang et al. (2003) та електрофорезу запасних білків у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої

№	Назва сорту	Алель <i>Gli-A1.1</i>	Алель <i>Gli-A1.2</i>	Алельний варіант <i>Gli-A1</i>
1	Грація миронівська	-	+	o
2	Донецька 48	-	+	o
3	Миронівська золотOVERХА	-	+	o
4	Мудрість I	-	+	o

5	Оберіг миронівський	-	+	o
6	Подолянка	-	+	o
7	Ювівата 60	-	+	o
8	Крижинка	-	+	x
9	Перлина лісостепу	-	+	x
10	Трудівниця миронівська	-	+	x
11	Ювіляр миронівський	-	+	x
12	Водограй білоцерківський	-	+	x
13	Миронівська 65	-	+	x
14	МІП Ассоль	-	+	x
15	Чародійка білоцерківська	-	+	x
16	Аріївка	+	-	b
17	Балада Миронівська	+	-	b
18	Білосніжка	+	-	b
19	Благо	+	-	b
20	Борвій	+	-	b
21	Бургунка	+	-	b
22	Ватажок	+	-	b
23	Віген	+	-	b
24	Відрада	+	-	b
25	Вільшана	+	-	b
26	Говтва	+	-	b
27	Гурт	+	-	b
28	Естафета миронівська	+	-	b
29	Конка	+	-	b
30	Кошова	+	-	b
31	Левада	+	-	b
32	Леда	+	-	b
33	лінія КС1	+	-	b
34	лінія КС14	+	-	b
35	лінія Л41/95	+	-	b
36	Ліра одеська	+	-	b
37	Лютецька	+	-	b
38	Марія	+	-	b

39	Мелодія одеська	+	-	b
40	Металіст	+	-	b
41	Мудрість II	+	-	b
42	Мудрість III	+	-	b
43	Овідій	+	-	b
44	Оржиця	+	-	b
45	Подяка	+	-	b
46	Світанок миронівський	+	-	b
47	Українка полтавська	+	-	b
48	Хист	+	-	b
49	Царичанка	+	-	b
50	Щедра нива	+	-	b
51	Ветеран	+	-	b+g
52	Кохана	+	-	b+g
53	лінія Л59-95	+	-	b+g
54	Наснага	+	-	b+g
55	Оптима одеська	+	-	b+g
56	Пам'яті Ремесла	+	-	b+g
57	Соната	+	-	b+g
58	Анатолія	+	-	c
59	Білоцерківська напівкарликова	+	-	c
60	Зимоярка	+	-	c
61	Лінія КС22-04	+	-	c
62	Лісова пісня	+	-	c
63	Романтика	+	-	c
64	Сидор Ковпак	+	-	c
65	Херсонська безоста	+	-	c
66	Царівна	+	-	c
67	Ясочка	+	-	c
68	Вежа миронівська	+	-	f
69	Зоряна Носівська	+	-	f
70	Либідь	+	-	f
71	Мадярка	+	-	f
72	Миронівська слава	+	-	f
73	Сагайдак	+	-	f
74	МПП Дніпрянка	+	-	f
75	Відповідь одеська	+	-	g

76	Жайвір	+	-	g
77	Зміна	+	-	g
78	Кларіса	+	-	g
79	Куяльник AR	+	-	g
80	Мудрість IV	+	-	g
81	Панна	+	-	g
82	Селянка	+	-	g
83	Традиція I	+	-	g
84	Традиція II	+	-	g
85	Антонівка	+	+	b+o
86	МПП Вишиванка	+	+	f+o
87	Миронівська 61	+	+	f+x
88	Щедрість	+	+	m+b

Складність визначення деяких алельних варіантів, що кодуються *Gli-A1* локусом, полягала у тому, що методика електрофорезу в кислому ПААГ, якою користувалися у роботі краще підходить для визначення алельних варіантів за каталогом Поперелі Ф. О. (Sozinov, Popereleya, 1980), проте вона не є міжнародною. Так, алельний варіант GLD 1A10 за Поперелею Ф. О., може бути *Gli-A1g* або *Gli-A1x* за каталогом Метаковського. А GLD 1A10 та GLD 1A3 (*Gli-A1f* за Метаковським) є досить подібними, тому складно розрізняються. Таким чином, алельні варіанти *Gli-A1f*, *Gli-A1g* та *Gli-A1x* за міжнародною класифікацією важко розрізняються у електрофорезі за методикою Поперелі Ф. О. Результати по значній кількості сортів із сучасної української колекції співпадають з дослідженнями алельного стану *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів, проведеними Н. А. Козуб (Kozub et al., 2020; Козуб, 2021).

Загалом, у 70 сортів української колекції, в ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу було виявлено *Gli-A1.1* алель. Також ці сорти характеризувалися наступними алельними варіантами гліадинів: *Gli-A1b* (35 сортів), *Gli-A1c* (10 сортів), *Gli-A1f* (7 сортів) та *Gli-A1g* (11 сортів). Ще сім сортів, що характеризувалися *Gli-A1.1* алелем були гетерогенними за алельними варіантами: *Gli-A1b* + *Gli-A1g*.

Лише чотирнадцять сортів пшениці м'якої характеризувалися *Gli-A1.2* алелем. З них, у шести було виявлено *Gli-A1o* алельний варіант, у восьми – *Gli-A1x* алельний варіант гліадинів. А також чотири сорти виявилися гетерогенними як за результатами ПЛР з алель-специфічними праймерами, так і за результатами електрофорезу запасних білків (табл. 4.1).

Із отриманих результатів по *Gli-A1* локусу, видно, що між алелями *Gli-A1.1/Gli-A1.2* та алельними варіантами гліадинів існує відповідність: сорти з *Gli-A1.2* алелем характеризуються *Gli-A1o* або *Gli-A1x* алельними варіантами гліадинів, а сорти з *Gli-A1.1* алелем мають *Gli-A1b*, *Gli-A1c*, *Gli-A1f* та *Gli-A1g* алельні варіанти.

Отримані результати також показали значне домінування *Gli-A1.1* алеля у вибірці сучасних українських сортів пшениці м'якої, частота становила 0,82, коли для *Gli-A1.2* алеля – 0,18 (табл. 4.2). У двох із шести селекційно-генетичних центрів – ІЗЗ та ПДАА, *Gli-A1.2* алель не виявлений взагалі, найбільша частота даного алеля спостерігалася у сортів МПП і становила 0,42 (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Частоти алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом та алелів *Gli-A1.1/Gli-A1.2*, у різних селекційних центрах України

Назва	СГІ-НЦНС N=28	МПП N=21	БЦСДС N=11	ІЗЗ N=10	ПДАА N=10	НСДС N=8	Українська Колекція N=91
Алельний варіант							
<i>Gli-A1b</i>	0,50	0,18	0,18	0,75	0,75	0,56	0,43
<i>Gli-A1c</i>	-	0,05	0,45	0,20	0,10	0,13	0,11
<i>Gli-A1f</i>	0,02	0,25	0,09	-	0,10	0,13	0,10
<i>Gli-A1g</i>	0,41	0,03	-	0,05	0,05	0,06	0,16
<i>Gli-A1m</i>	0,02	-	-	-	-	-	0,01
<i>Gli-A1o</i>	0,05	0,23	-	-	-	0,13	0,10
<i>Gli-A1x</i>	-	0,28	0,27	-	-	-	0,09
H	0,58	0,77	0,68	0,40	0,42	0,63	0,75
Алель <i>Gli-A1</i>							
<i>Gli-A1.1</i>	0,93	0,52	0,73	1	1	0,87	0,82
<i>Gli-A1.2</i>	0,07	0,48	0,27	0	0	0,13	0,18

Індекс генетичної різноманітності *Gli-A1* локусу в колекції сучасних українських сортів був дость високим, у порівнянні і із *Gli-B1* локусом, і становив 0,75. Найменший показник 0,40 був зафіксований у вибірці сортів із ІЗЗ. Найвищий рівень генетичної різноманітності спостерігався у вибірці сортів із МП (H=0,77).

Найбільш поширеним алельним варіантом у вибірці із сучасних українських сортів пшениці м'якої був *Gli-A1b*, з частотою 0,43. Даний алельний варіант асоціюється із хорошою хлібопекарською якістю (Созінов, 1985), та за даними Metakovsky et al. (2018) є найбільш поширеним у таких країнах як Україна, Болгарія, Угорщина, Хорватія, Сербія.

Gli-A1g алельний варіант гліадинів виявлений у п'яти із шести селекційних центрів, з найбільшою частотою 0,41 у вибірці із СГІ-НЦНС. У каталозі Metakovsky et al., (2018) даний алельний варіант гліадинів найчастіше зустрічається в австралійських сортів, рідше в іспанських, вірменських.

Gli-A1f алельний варіант також знайдений у сортів п'яти селекційних центрів, крім ІЗЗ, найбільша частота даного алельного варіанту становить 0,25 у вибірці із МП. *Gli-A1f* є характерним для сортів пшениці м'якої у Росії та Нідерландах (Metakovsky et al., 2018).

Gli-A1c найчастіше зустрічався у вибірці із БЦСДС, з частотою 0,45 та не знайдений у сортів СГІ-НЦНС. Даний алельний варіант є домінантним у сортів французького походження (Metakovsky et al., 2018).

Gli-A1o алельний варіант виявлений у сортів трьох селекційних центрів: СГІ-НЦНС та НСДС з низькою частотою – 0,05-0,13 відповідно та у МП з частотою 0,23. *Gli-A1o* часто зустрічається у сортів пшениці м'якої Швеції, Норвегії, Фінляндії, Великобританії, Франції (Metakovsky et al., 2018).

Gli-A1x алельний варіант гліадинів виявлений лише у вибірках двох селекційних центрів: МП та БЦСДС з частотою 0,28 та 0,27, відповідно. *Gli-A1x* є комбінацією *Gli-A1a* та *Gli-A6b* (додатковим гліадином, що кодується *Gli-A6* локусом). *Gli-A1a* є найбільш поширеним алельним варіантом *Gli-A1* локусу у

світовій колекції сортів, досліджених (Metakovsky et al., 2018), а Gli-A1x у каталозі зустрічається переважно у французьких сортів.

Із отриманих результатів видно, що у кожному селекційному центрі більшу частину сортів пшениці м'якої займають сорти із Gli-A1b алельним варіантом, проте майже кожен селекційний центр відрізняється від інших присутністю ще одного-двох алельних варіантів гліадинів у значній кількості сортів. Так, для СГІ-НЦНС, крім Gli-A1b, характерний Gli-A1g алельний варіант, для БЦСДС – Gli-A1c та Gli-A1x, для МІП Gli-A1x, Gli-A1o та Gli-A1f (табл. 4.2).

4.2. Генетичний поліморфізм *Gli-A1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у світовій колекції сортів пшениці м'якої

За результатами ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелів сортів пшениці м'якої із світової колекції, наданої Є В. Метаковським, як і в українській колекції, було виявлено ряд сортів, які демонстрували позитивний результат для двох алелів одночасно. Тому для цих випадків було використано HotStart ДНК-полімеразу (рис. 4.3).

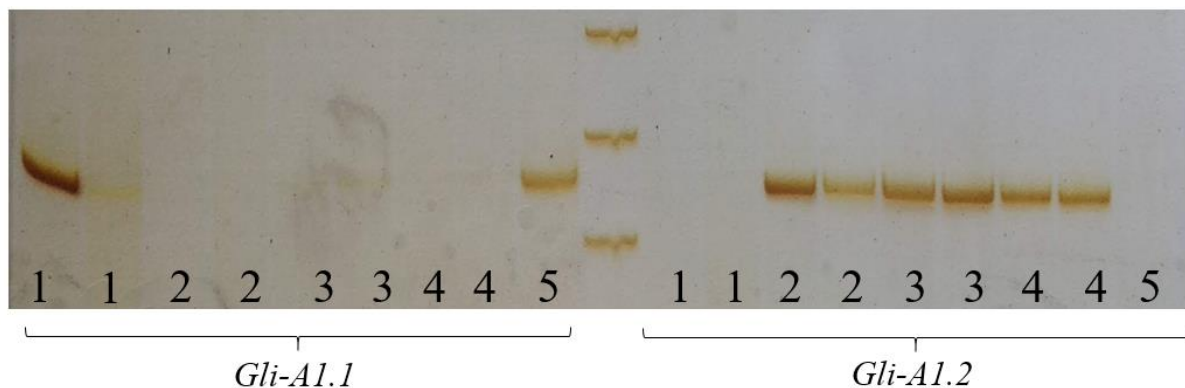


Рис. 4.3. Електрофореграми продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелів сортів пшениці м'якої із світової колекції, наданої Є В. Метаковським з використанням HotStart ДНК-полімеразу. ДНК сортів: 1 – Siete-Cerros, 2 – Darius, 3 – Sideral, 4 – Splendeur, 5 – Prinqual, M – маркер молекулярної ваги *pUC19/MspI*

Гетерогенних сортів із світової вибірки, за результатами ПЛР, не знайдено. Більшість сортів характеризувалися *Gli-A1.1* алелем, у 16-ти сортів виявлено *Gli-A1.2* алель (табл. 4.3). Частота *Gli-A1.1* алеля становила 0,70, *Gli-A1.2* – 0,30.

Таблиця 4.3

Результати ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу, розробленими Zhang et al. (2003) та електрофорезу запасних білків у світовій вибірці сортів пшениці м'якої

№	Назва сорту	Алель <i>Gli-A1.1</i>	Алель <i>Gli-A1.1</i>	Алельний варіант <i>Gli-A1</i>
Світова колекція сортів надана Є. В. Метаковським				
1	Inia-69*	-	+	?
2	Aragon-03	-	+	m
3	Katerwa	-	+	m
4	Marquis	-	+	m
5	Cajeme-71	-	+	o
6	Capelle-Desprez	-	+	o
7	Cluij-650	-	+	o
8	Darius	-	+	o
9	Recital	-	+	o
10	Rinconada	-	+	o
11	Sideral	-	+	o
12	Splendeur	-	+	o
13	Suneca	-	+	o
14	Titien	-	+	o
15	Yecora-Rojo	-	+	o
16	Laura	-	+	r
17	Argelato	+	-	a
18	Caia	+	-	a
19	Cartaya	+	-	a
20	Chinese-Spring	+	-	a
21	Diego	+	-	a
22	Escualo	+	-	a
23	Mentana	+	-	a
24	Panc-247	+	-	a
25	Potam-70	+	-	a
26	1B ⁻ ,1D ⁻ (лінія)	+	-	a
27	N10T1B (лінія)	+	-	a

28	N1BT1D (лінія)	+	-	a
29	Libero	+	-	a+af
30	Siete-Cerros-66	+	-	a+g
31	Galahad	+	-	ab
32	Arminda	+	-	af
33	Federation	+	-	af
34	Goelent	+	-	af
35	Insignia	+	-	af
36	Pavon-F-76 (Betres)	+	-	af
37	Roblin	+	-	af
38	Bezostaya-1	+	-	b
39	Krasnodonka	+	-	b
40	Donskaya polukarlikovaia	+	-	b+f
41	Gazul	+	-	c
42	Ardec	+	-	f
43	Mironovskaya -808	+	-	f
44	Prinqual	+	-	f
45	Gabo	+	-	g
46	Newcaster	+	-	l
47	Salmone	+	-	l
48	Glenlea	+	-	m
49	Intensivnaya	+	-	n+b
50	Kavkaz	+	+	b?
Сорти та лінії пшениці м'якої з дослідження Поліщук та ін. (2010)				
51	Струмок	-	+	o
52	Альбатрос од.	+	-	b
53	Любава одеська	+	-	b
54	GLI-A1-1	-	+	m
55	GLI-B1-3	+	-	b
56	GLI-D1-4	+	-	b
57	GLI-D1-5	+	-	b
58	GLI-B1-12	+	-	b
59	GLI-B1-4	+	-	b
Сорти із генбанків Leibniz institute of plant genetics and crop plant research (Німеччина) та Agriculture and Agri-Food Canada (Канада)				
60	Red Fife	+	+	m
61	Hard Red Calcutta	+	-	?
62	Ladoga	+	-	?
63	Girka	+	-	?
64	Skorospelka	+	-	b
65	Aquila	+	-	af/k

66	Bison	+	-	f
67	Cheyenne	+	-	b
68	Claudius	-	+	b
69	Kadett	+	-	c
70	Pegaso	+	-	a
71	You tzu mai	+	-	?
72	Zhemai 1	+	-	?
73	Zhemai 2	+	-	?

Загалом, у світовій вибірці сортів пшениці м'якої представлено 11 алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом. Більшість сортів характеризувалися *Gli-A1a* алельним варіантом (12 сортів), що відповідає даним, наведеним у статті Metakovsky et al. (2018), значна частина сортів у вибірці характеризувалася також *Gli-A1o* (11 сортів) та *Gli-A1af* (6 сортів) алельними варіантами гліадинів. Крім цього, зустрічалися *Gli-A1ab*, *Gli-A1b*, *Gli-A1c*, *Gli-A1f*, *Gli-A1g*, *Gli-A1m* та *Gli-A1r* алельні варіанти в одного, двох чи трьох сортів.

У вибірці сортів та ліній пшениці м'якої із дослідження Поліщук та ін. (2009) виявлено три алельні варіанти гліадинів: *Gli-A1b* (сім сортів та ліній), *Gli-A1o* – сорт Струмок та *Gli-A1m* у лінії GLI-A1-1 (табл. 4.3).

Спільними алельними варіантами для сучасної української вибірки та світової вибірки сортів пшениці м'якої, були *Gli-A1b*, *Gli-A1c*, *Gli-A1f*, *Gli-A1g* та *Gli-A1m* (табл. 4.4), проте їх частота у двох вибірках значно відрізнялася, на відміну від частоти алелів *Gli-A1.1* та *Gli-A1.2*.

Gli-A1a, *Gli-A1ab*, *Gli-A1af*, *Gli-A1r* та *Gli-A1l* були знайдені тільки у світовій вибірці сортів, а *Gli-A1x* – тільки в українських сортах.

Цікавим є те, що в українській колекції не зустрічалися *Gli-A1a* та *Gli-A1af*, які відрізняються від *Gli-A1x* та *Gli-A1f*, поширених в українських сортах, лише алелем мінорного локусу *Gli-A6b*, що кодує один ω -гліадин (Metakovsky et al., 2018).

Таблиця 4.4

Відповідність алелів *Gli-A1* локусу, алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом

Алель <i>Gli-A1</i>	Алельний варіант <i>Gli-A1</i>	Українська колекція сортів		Світова колекція сортів	
		Кількість гомогенних сортів	Частота алельного варіанту	Кількість гомогенних сортів	Частота алельного варіанту
<i>Gli-A1.1</i>	Gli-A1a	-	-	12	0,26
	Gli-A1ab	-	-	1	0,02
	Gli-A1af	-	-	6	0,13
	Gli-A1b	36	0,43	2	0,08
	Gli-A1c	10	0,11	1	0,02
	Gli-A1f	7	0,10	3	0,07
	Gli-A1g	11	0,16	1	0,03
	Gli-A1l	-	-	2	0,04
	Gli-A1m	-	-	1	0,02
<i>Gli-A1.2</i>	Gli-A1m	1	0,01	3	0,06
	Gli-A1r	-	-	1	0,02
	Gli-A1o	7	0,10	11	0,11
	Gli-A1x	8	0,09	-	-

Проаналізувавши результати, отримані в усіх вибірках, було встановлено наступну відповідність: сорти з алелем *Gli-A1.1* характеризувалися Gli-A1a, Gli-A1ab, Gli-A1af, Gli-A1b, Gli-A1c, Gli-A1f, та Gli-A1l алельними варіантами гліадинів, а сорти із алелем *Gli-A1.2* характеризувалися Gli-A1o, Gli-A1r та Gli-A1x алельними варіантами. Відповідність не зберігалася лише у випадку із Gli-A1m алельним варіантом: три сорти – Aragon-03, Katerwa, Marquis та лінія GLI-A1-1 характеризувалися алелем *Gli-A1.2*, та один сорт – Glenlea, *Gli-A1.1* алелем (табл. 4.3 та 4.4).

Незрозумілою залишається відповідність алелів *Gli-A1.1/Gli-A1.2* та алелів мінорного локусу *Gli-A6a* (є нуль-алелем *Gli-A6* локусу) та *Gli-A6b*, що також локалізований на короткому плечі 1А хромосоми. В одному випадку, сорти, що характеризуються Gli-A1af (Gli-A1af + *Gli-A6a*) та Gli-A1f (Gli-A1af + *Gli-A6b*) алельними варіантами мають *Gli-A1.1* алель, що може вказувати на відсутність

відповідності алелів *Gli-A1.1/Gli-A1.2* та алелів *Gli-A6*. Проте, випадок із аналогічною парою алельних варіантів *Gli-A1a* (*Gli-A1a* + *Gli-A6a*) та *Gli-A1x* (*Gli-A1a* + *Gli-A6b*), демонструє протилежне, оскільки сорти із цими алельними варіантами характеризуються різними алелями: *Gli-A1.1* та *Gli-A1.2*, відповідно.

4.3. Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей *Gli-A1* локусу пшениці м'якої та низки інших видів злаків

Для *Gli-A1* локусу, у статті розробників праймерів Zhang et al. (2003), було вказано лише одну нуклеотидну послідовність із Genebank, яка відповідала *Gli-A1.1* алелю – AF234646.1. Тому, у якості запиту для BLAST пошуку використовували частину цієї послідовності, що фланкується праймерами до *Gli-A1.1* алеля.

В результаті BLAST пошуку, було отримано 100 нуклеотидних послідовностей, найбільш подібних до фрагментів ампліфікації *Gli-A1.1* алеля. Серед них було знайдено також послідовності із *Gli-A1.2* алеля. Тому, одну із них – MH89987.1, було використано у якості запиту для BLAST пошуку по нуклеотидній послідовності, що фланкується праймерами *Gli-A1.2* алеля. Із цих двох BLAST пошуків було виключено послідовності, що дублювалися, та сформовано одну вибірку – V-*Gli-A1.1/2*, що у подальшому використовувалася для *in silico* ПЛР.

Вибірка V-*Gli-A1.1/2* складалася із 122 нуклеотидних послідовностей гліадинових генів. Методом *in silico* ПЛР із алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу, у семи послідовностях були знайдені 2-3 SNP поліморфізми, у послідовності праймера, тому в даному випадку, ПЛР буде негативною. Позитивний результат було отримано для 115 нуклеотидних послідовностей із вибірки V-*Gli-A1.1/2*.

У 65 нуклеотидних послідовностях гліадинових генів, що становить 56% із вибірки, виявлено *Gli-A1.1* алель, що визначається наявністю гуаніну в позиції SNP. *Gli-A1.2* алель, що визначається аденином в SNP, знайдено у 50

послідовностях, що становлять 44%. Крім виду *Triticum aestivum* L., послідовність, що фланкується алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу, присутня у γ -гліадинових генах ще у шести видів (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Розподіл алелів *Gli-A1* локусу, у нуклеотидних послідовностях із GeneBank, визначених методом *in silico* ПЛР

Вид	<i>Gli-A1.1</i> алель		<i>Gli-A1.2</i> алель	
	Кількість послідовностей	%*	Кількість послідовностей	%*
<i>Triticum aestivum</i> L.	60	75	19	25
<i>Triticum turgidum</i>	1	25	3	75
<i>Triticum urartu</i>	-	-	13	100
<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>	-	-	7	100
<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	-	-	8	100
<i>Taeniatherum caput-medusae</i>	3	100	-	-
<i>Australopyrum retrofractum</i>	1	100	-	-
Загальна кількість	65	56	50	44

*Відсоток визначався від загальної кількості послідовностей з позитивним результатом *in silico* ПЛР.

Gli-A1.1 алель виявлений у чотирьох видів злаків: *Triticum aestivum* L. (60 нуклеотидних послідовностей, що становлять 93% від послідовностей із *Gli-A1.1*), *Triticum turgidum* (одна послідовність), а також у двох видів, що входять до підтриби *Hordeinae*: *Taeniatherum caput-medusae* (три послідовності), *Australopyrum retrofractum* (одна послідовність), (табл. 4.5).

Gli-A1.2 алель було знайдено у нуклеотидних послідовностях, що належать чотирьом видам злаків: *T. aestivum* L. (19 нуклеотидних послідовностей, що становлять 38% від послідовностей із *Gli-A1.2*), *Triticum turgidum* (три послідовності), *T. monococcum subsp. monococcum* (вісім послідовностей), *T. monococcum subsp. aegilopoides* (сім послідовностей) та *T. urartu* (13 послідовностей), (табл. 4.5).

Більшість видів із позитивним результатом *in silico* ПЛР з праймерами до *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелів, є ди-, тетра- та гексаплоїдними пшеницями, що мають субгеном А двох типів: *T. urartu* (A^u), *T. turgidum* (A^uB), *T. aestivum* L (A^uBD) та *T. monococcum* (A^bA^b). У даному випадку донором A^u є *T. urartu*, а A^b – *Triticum beoticum* (Yadav et al., 2023; Gholamian et al., 2019; Liu et al., 2020; Adhikari et al., 2022). Ще один поширений та окультурений вид тетраплоїдної пшениці, пшениця тверда – *Triticum durum*, також має генوم (A^uB), проте для даного виду нуклеотидних послідовностей, ідентичних до *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелів – не знайдено, позитивний результат було отримано лише для В субгеному із праймерами до *Taglgap*. Імовірно, це обумовлено відсутністю або значними змінами у нуклеотидній послідовності аналогічних генів у *T. durum*, чи недостатньою кількістю секвенованих гліадинових генів для цього виду.

Крім цього, досить дивним, на рівні з відсутністю нуклеотидних послідовностей *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелів у видів із А субгеномом, було знайти цю послідовність у γ -проламінових генах злаків, що відносяться до підтриби *Hordeinae*, триби *Triticaceae*, таких як *T. caput-medusae* (стрічноосник шорсткий) – злакова рослина (2n=2x=14), поширена в Північній Африці та Південній Європі, Азії, на території України зустрічається у степах Криму, рідко в Одеській, Миколаївській та Херсонській областях (інші назви *Elymus caput-medusae* (L.) Nevski, *Hordeum asperum* (Simonkai) Deagen, *Hordeum caput-medusae* (Linnaeus) Cosson & Durieu, *Hordeum critinum* (Schreber) Desfontaines) та *Australopyrum retrofractum* (Vickery) A. Love (інша назва *A. Pectinatum*) злак поширений в Австралії та Новій Зеландії (Доброчаева и др., 1987; Clayton et al., 2006; Schoch et al., 2020).

Розподіл алелів *Gli-A1.1/Gli-A1.2* серед різних видів відрізнявся. У двох видів – *T. aestivum* L. та *T. turgidum* зустрічалися як *Gli-A1.1* алель, так і *Gli-A1.2* алель. Серед нуклеотидних послідовностей, що належали пшениці м'якій, у 75% було знайдено *Gli-A1.1* алель та у 25% – *Gli-A1.2* алель, коли у виду *T. turgidum* переважав *Gli-A1.2* алель (табл. 4.5).

Виключно *Gli-A1.2* алель виявлений у *T. urartu* та двох підвидів *T. monosocum*, що у даному випадку може бути пов'язаним із певними характерними для цих видів алельними варіантами гліадинів.

Лише *Gli-A1.1* алель, знайдений у *T. caput-medusae*, *A. retrofractum*, що може бути спричинене видоспецифічністю або ж, скоріше, малою кількістю проаналізованих нуклеотидних послідовностей для цих видів.

Більшість нуклеотидних послідовностей, у яких було знайдено *Gli-A1.1/Gli-A1.2* алелі, за описом у базі даних Nucleotide, були генами γ -гліадинів, або γ -проламінів (у *T. caput-medusae*, *A. retrofractum*), проте зустрічалися послідовності і псевдогенів.

З 115 нуклеотидних послідовностей, що були знайдені, 18, за описом, належали псевдогенам, що становило 15%. Із них у п'яти виявлено *Gli-A1.1* алель, а в 13 – *Gli-A1.2* алель.

Серед нуклеотидних послідовностей пшениці м'якої, було знайдено чотири псевдогени із *Gli-A1.1* алелем, серед послідовностей *T. aestivum L.* із *Gli-A1.2* алелем, псевдогенів не було. Також один псевдоген із *Gli-A1.1* алелем виявлено для виду *T. caput-medusae*.

П'ять із 13 нуклеотидних послідовностей, що належать виду *T. urartu* були псевдогенами, усі характеризувалися *Gli-A1.2* алелем.

Псевдогенами також були усі нуклеотидні послідовності, що належали до підвиду *T. monosocum subsp. monosocum* (вісім послідовностей із *Gli-A1.2* алелем), проте ті, що відносилися до іншого підвиду – *T. monosocum aegilopoides* – за описом, були генами (сім послідовностей із *Gli-A1.2* алелем).

Знаходження нуклетидної ділянки, що фланкується алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу, у послідовностях і генів і псевдогенів пшениці м'якої, може свідчити про наявність більш, ніж однієї копії цієї послідовності, або ж про поліморфізм між сортами, коли в одних дана послідовність є частиною гену, а в інших – вже є псевдогеном.

Мультиплексне вирівнювання нуклеотидних послідовностей із позитивним результатом *in silico* ПЛР, показало що деякі нуклеотидні послідовності містять SNP поліморфізми у ділянці, що фланкується праймерами до *Gli-A1* локусу (рис. 4.4).

```

1. MN347517.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
2. MN899883.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
3. AF234646.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
4. MN899855.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
5. KC715988.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
6. KC715999.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
7. JX828397.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
8. KC715976.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
9. JX828393.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
10. KF412611.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
11. MN882475.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
12. MN882474.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc
13. FJ006621.1 T catagcgtcgtgcatccatcgtcatgcaagaagaacaacaagaagcatacagatcctc

1. MN347517.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
2. MN899883.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
3. AF234646.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
4. MN899855.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
5. KC715988.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
6. KC715999.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
7. JX828397.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
8. KC715976.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
9. JX828393.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
10. KF412611.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
11. MN882475.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
12. MN882474.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa
13. FJ006621.1 T cggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctcaacaaccagctcaa

1. MN347517.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
2. MN899883.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
3. AF234646.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
4. MN899855.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
5. KC715988.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
6. KC715999.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
7. JX828397.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
8. KC715976.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
9. JX828393.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
10. KF412611.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
11. MN882475.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
12. MN882474.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc
13. FJ006621.1 T tatgaggtgatcaggtcattggtattgagaacccttccaacatgtgcaacgtgtatgtc

```

Рис. 4.4. Мультиплексне вирівнювання нуклеотидних послідовностей виду *Triticum aestivum* L. із *Gli-A1.1* алелем, що містять SNP поліморфізм отримане за алгоритмом MAFFT.

Жовтим кольором позначено праймери; зеленим кольором SNP поліморфізми

Послідовності MN347527.1 та MN899883.1, у яких знайдені різні алелі *Gli-A1* локусу, відрізняються всього на один нуклеотид, який саме і визначає *Gli-A1.1* (гуанін) та *Gli-A1.2* алель (аденін, позначено зеленим), відповідно (рис. 4.4). Крім

цього, у десяти позиціях нуклеотидної послідовності пшениці м'якої, що фланкується праймерами до *Gli-A1* локусу, знайдено SNP поліморфізми, позначені зеленим кольором на рисунку 4.4.

У нуклеотидних послідовностях із *Gli-A1.2* алелем було знайдено сім різних SNP поліморфізмів, позначених зеленим на рисунку 4.5. Три з них – FJ595936.1, MH899891 та MH899868.1 належать пшениці м'якій.

```

1. MH899890.1 T gtgtgcagccatccatagcgtcgtgcattccatcatcatgcagcaagaacaacaacaagg
2. FJ006632.1 T gtgtgcagccatccatagcgtcgtgcattccatcatatgcagcaagaacaacaacaagg
3. FJ006666.1 T gtgtgcagccatccatagcgtcgtgcattccatcatcatgcagcaagaacaacaacaagg
4. FJ006652.1 T gtgtgcagccatccatagcgtcgtgcattccatcatcatgcagcaagaacaacaacaagg
5. FJ006664.1 T gtgtgcagccatccatagcgtcgtgcattccatcatcatgcagcaagaacaacaacaagg
6. FJ595936.1 T gtgtgcagccatccatagcgtcgtgcattccatcatcatgcagcaagaacaacaacaagg
7. MH899891.1 T gtgtgcagccatccatagcgtcgtgcattccatcatcatgcagcaagaacaacaacaagg
8. MH899868.1 T gtgtgcagccatccatagcgtcgtgcattccatcatcatgcagcaagaacaacaacaagg

1. MH899890.1 T catacagatcctcggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctca
2. FJ006632.1 T catacagatcctcggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctca
3. FJ006666.1 T catacagatcctcggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctca
4. FJ006652.1 T catacagatcctcggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctca
5. FJ006664.1 T catacagatcctcggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctca
6. FJ595936.1 T catacagatcctcggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctca
7. MH899891.1 T catacagatcctcggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctca
8. MH899868.1 T catacagatcctcggccactgtttcagctcgtccaaggtcagggcatcatccaacctca

1. MH899890.1 T acaaccagctcaatatgaggtgatcaggtcattggattgagaacccttccaaacatgtg
2. FJ006632.1 T acaaccagctcaatatgaggtgatcaggtcattggattgagaacccttccaaacatgtg
3. FJ006666.1 T acaaccagctcaatatgaggtgatcaggtcattggattgagaacccttccaaacatgtg
4. FJ006652.1 T acaaccagctcaatatgaggtgatcaggtcattggattgagaacccttccaaacatgtg
5. FJ006664.1 T acaaccagctcaatatgaggtgatcaggtcattggattgagaacccttccaaacatgtg
6. FJ595936.1 T acaaccagctcaatatgaggtgatcaggtcattggattgagaacccttccaaacatgtg
7. MH899891.1 T acaaccagctcaatatgaggtgatcaggtcattggattgagaacccttccaaacatgtg
8. MH899868.1 T acaaccagctcaatatgaggtgatcaggtcattggattgagaacccttccaaacatgtg

```

Рис. 4.5. Мультиплексне вирівнювання нуклеотидних послідовностей із *Gli-A1.2* алелем, що містять SNP поліморфізм отримане за алгоритмом MAFFT.

Жовтим кольором позначено праймери; зеленим кольором SNP поліморфізми

Ще чотири послідовності із виявленими SNP поліморфізмами належали видам *T. urartu* та *T. monococcum subsp. aegilopoides*. У більшості випадків знайдені SNP поліморфізми зустрічалися лише в одній послідовності. Загалом для пшениці м'якої було виявлено 13 різних SNP у нуклеотидній послідовності, що фланкується алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу, проте даний поліморфізм неможливо виявити на електрофореграмах продуктів ампліфікації

Gli-A1.1 та *Gli-A1.2* алелів, оскільки не змінюється розмір фрагментів ампліфікації.

Загалом, із 65 нуклеотидних послідовностей із *Gli-A1.1* алелем у 18 було знайдено SNP поліморфізм, що становило 27% (табл. 4.6). Із них 13 належали пшениці м'якій, одна – виду *T. turgidum* та усім нуклеотидним послідовностям видів *T. caput-medusae* і *A. retrofractum*.

Таблиця 4.6

Розподіл SNP мутацій, знайдених у межах послідовностей, що фланкуються праймерами до алелів *Gli-A1* локусу, у нуклеотидних послідовностях низки видів злаків із Генбанку, визначених методом *in silico* ПЛР

Вид	<i>Gli-A1.1</i> алель		<i>Gli-A1.2</i> алель	
	Кількість послідовностей	%	Кількість послідовностей	%
<i>Triticum aestivum L</i>	13	21	3	15
<i>Triticum turgidum</i>	1	100	-	0
<i>Triticum urartu</i>	-	-	4	30
<i>Triticum monococcum subsp. aegilopoides</i>	-	-	5	71
<i>Triticum monococcum subsp. monococcum</i>	-	-	-	-
<i>Taeniatherum caput-medusae</i>	3	100	-	-
<i>Australopyrum retrofractum</i>	1	100	-	-
Загальна кількість	18	27	12	24

Із нуклеотидних послідовностей із *Gli-A1.2* алелем SNP поліморфізм, було знайдено у 12 послідовностей що становило 24% від загальної кількості. До них відносилися більшість нуклеотидних послідовностей *T. monococcum* підвиду *aegilopoides*, а також послідовності виду *T. urartu* та *T. aestivum L.* (всього 3 послідовності), (табл. 4.6).

Отже, проведена *in silico* ПЛР з алель-специфічними праймерами, розробленими Zhang et al. (2003), показала, що нуклеотидна послідовність, яка фланкується праймерами до *Gli-A1* локусу присутня не тільки у пшениці м'якої, але ще й, як мінімум у п'яти видів злаків, та може бути частиною як генів, так і псевдогенів, а також може містити SNP поліморфізми, які не можна виявити на електрофорегамах продуктів ампліфікації з даними праймерами.

Крім описаних вище нуклеотидних послідовностей, було знайдено та проаналізовано окремо, ще дві великі за розміром послідовності, що належать пшениці м'якій: MG560140.1 (5 335 195 п.н.), що охоплює весь *Gli-A1* локус та належить сорту Chinese Spring та EF426565.1 (157 918 п.н.).

У нуклеотидній послідовності MG560140.1 *in silico* ПЛР показала наявність двох копій послідовності, що фланкується праймерами до *Gli-A1.1* алеля, розробленими Zhang et al. (2003), що у такому випадку не може бути виявленим за допомогою звичайної ПЛР. *Gli-A1.1* алель у сорту Chinese Spring був підтверджений також в ході лабораторного експерименту.

За анотацією MG560140.1 містить гени наступних гліадинів та глютенінів: «gamma-gliadin A1», «gamma-gliadin A3», «gamma-gliadin A4», «LMW-A2». Перша копія нуклеотидної послідовності, що фланкується праймерами до *Gli-A1.1* алеля, займає діапазон 2014306-2014473 п.н. та знаходиться в рамках кодуючої послідовності гена «gamma-gliadin A1». Друга копія, входить до кодуючої ділянки гена «gamma-gliadin A3» та займає діапазон 2022026-2022193 п.н.

В іншій нуклеотидній послідовності – EF426565.1, методом *in silico* ПЛР, також було знайдено дві копії послідовності, що фланкується праймерами до *Gli-A1* локусу. Проте, на відміну від MG560140.1, у даній послідовності знайдено нуклеотидні послідовності *Gli-A1.1* та *Gli-A1.2* алелів (рис. 4.6).

За анотацією EF426565.1 містить ряд транспозонів та ретротранспозонів, таких як Fatimah, Angela, Sabrina, три псевдогени LMW глютенінів, один псевдоген γ -гліадину та три гени γ -гліадинів. Послідовність, що відповідає *Gli-*

A1.2 алелю входить до кодуєчої ділянки гена гліадину «gamma-gliadin 2», а послідовність, що відповідає *Gli-A1.1* алелю є частиною гена гліадину «gamma-gliadin 3».

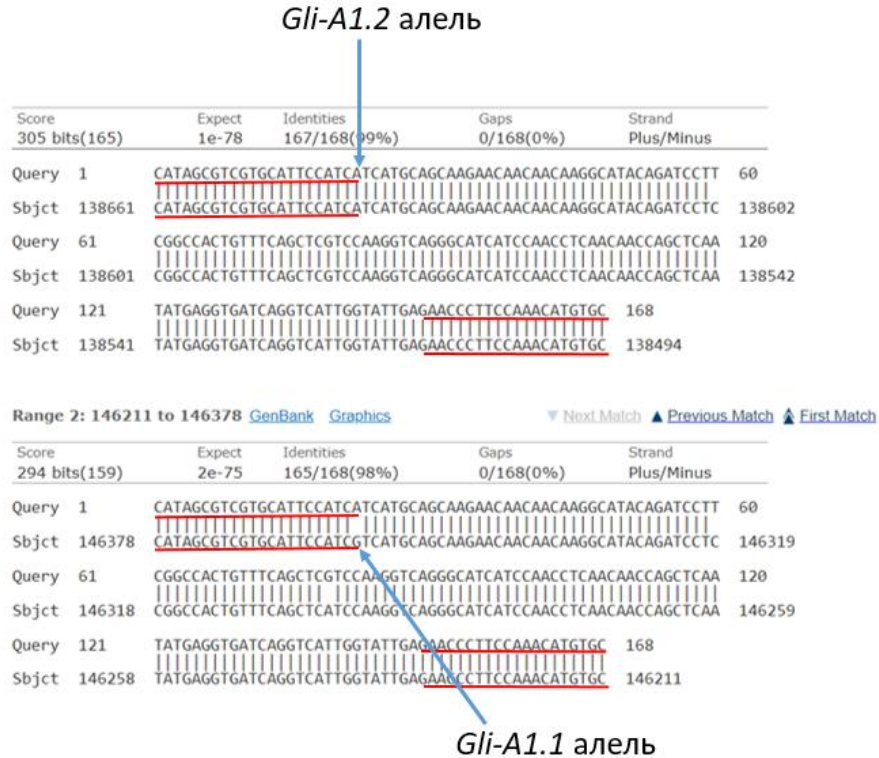


Рис. 4.6. Порівняння нуклеотидних послідовностей у сервісі BLAST.

Query – нуклеотидна послідовність, що фланкується праймерами до *Gli-A1.1* алеля; Sbjct – EF426565.1

Червоним підкреслені послідовності, що відповідають праймерам до *Gli-A1.1* та *Gli-A1.2* алелів

Отже, у двох великих нуклеотидних послідовностях *Gli-A1* локусу із бази даних GeneBank, було знадено дві копії послідовності, що фланкується алель-специфічними праймерами, розробленими Zhang et al. (2003), у всіх випадках ця послідовність є частиною кодуєчої ділянки генів γ -гліадинів, що пояснює наявність чіткої відповідності між алелями SNP та алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом, а також наявність сортів із позитивним результатом одразу для *Gli-A1.1* та *Gli-A1.2* алелів. Проте, врахування результатів, отриманих у лабораторному експерименті, по більш вираженому

алелю було зручнішим для встановлення відповідності, оскільки у випадках із двома позитивними алелями *Gli-A1* локусу, завжди один проявлявся сильніше, а інший слабше, або навіть був ледь помітним на електрофореграмах, що значно ускладнювало аналіз результатів, та виявлення гетерогених сортів.

4.4. ПЛР *in silico* та пошук інших праймерів до гліадинових генів. Розробка та аналіз потенціалу праймерів до мікросателіту *Gli-A1* локусу

Додатково до вищеприведеного біоінформаційного аналізу нуклеотидних послідовностей, що фланкуються праймерами, розробленими (Zhang et al., 2003), було створено ще 17 вибірок по 95-100 послідовностей кожна, і перевірено їх методом *in silico* ПЛР. Дані вибірки були сформовані, використовуючи BLAST пошук, у якому в якості запиту використовувалися нуклеотидні послідовності гліадинових генів *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів сорту Chinese Spring, анотовані у нуклеотидних послідовностях MG560140.1 (три γ -гліадинові гени), MG560141.1 (чотири γ -гліадинові, один δ -гліадиновий та два ω -гліадинових гени) та MG560142.1 (чотири γ -гліадинові, один δ -гліадиновий та три ω -гліадинових гени).

In silico ПЛР була проведена із 20 парами праймерів, створеними в ході досліджень гліадинових генів у публікаціях Zhou, Liu et al. (2022), Paris et al. (2021), Wang et al. (2018), Кирієнко та ін.(2015). Більшість перевірених праймерів не були знайдені ні в одній вибірці, або ж мали не менше 2-3 однонуклеотидних неспівпадінь в послідовності праймера, що унеможливило ампліфікацію.

Позитивний результат в ході *in silico* ПЛР був отриманий для чотирьох пар праймерів. Праймери, розроблені для пшениці твердої у роботі Paris et al. (2021) *Gli- γ 3a+ γ 4* та *Gli- γ 5b* були знайдені у двох та 42 послідовностях вибірки, сформованої з найбільш подібних послідовностей до гену Gamma gliadin-B6 (*Gli-B1* локус), відповідно. Пара праймерів *Gli- γ 1* (із публікації Wang et al. (2018)) знайдена у послідовності гену Gamma gliadin-A1 (*Gli-A1* локус) сорту Chinese Spring та ще восьми нуклеотидних послідовностях найбільш подібних до гену

Gamma gliadin-A1, із фрагментами ампліфікації довжиною 167 п.н. Праймери Gli- γ 11 (із публікації Wang et al. (2018)) були знайдені у 43 послідовностях вибірки, сформованої із подібних до гену Gamma gliadin-D1 (*Gli-D1* локус), з довжиною фрагментів ампліфікації 135 п.н.

В усіх випадках позитивного результату в ході *in silico* ПЛР були отримані неполіморфні теоретичні продукти ПЛР, тому дані праймери не використовувалися нами у лабораторному експерименті. Поліморфізм за даними праймерами, якщо і є, то він може проявлятися лише у випадках присутності/відсутності даного гену в сорті, проте, цього не показує *in silico* ПЛР.

Відсутність позитивного результату в *in silico* ПЛР для більшості перевірених пар праймерів може бути спричинена тим, що вибірки формувалися на основі нуклеотидних послідовностей сорту Chinese Spring, який характеризується рідкісними алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-B1*, *Gli-D1* локусами, тому ряд генів може бути відсутній в інших сортів, для яких створювалися праймери. Крім цього, праймери, що аналізувалися, не були створені для розрізнення алельних варіантів гліадинів, а у більшості випадків, використовувалися для ампліфікації матричної РНК та під час секвенування.

Проте, в ході *in silico* ПЛР з праймерами Gli- γ 11 (до *Gli-D1* локусу), з допуском некомплементарності з праймером до трьох нуклеотидів, було знайдено ще й інші послідовності, які належали гену Gamma gliadin-B2 (*Gli-B1* локус) та подібним до нього послідовностям, з імовірними фрагментами ампліфікації довжиною 135 п.н., а також, поліморфні за довжиною (144-177 п.н.) послідовності із вибірки сформованої з подібних до гену Gamma gliadin-A1 (*Gli-A1* локус) послідовностей. Тобто, замінивши три нуклеотиди у парі праймерів Gli- γ 11, отримали пару праймерів – MsA1, що фланкують поліморфну нуклеотидну послідовність *Gli-A1* локусу. З рисунку 4.7, де відображений позитивний результат *in silico* ПЛР з даними праймерами, видно, що

послідовність, яка фланкується ними, містить мікросателіт з мотивом САА, що й визначає поліморфізм.

tatus: Found 99 sequences in file, 20 containing F and R primers.

Load... Load big file... Path to txt file: D:\fasta\genome\Пункт 2\A1\GA1.txt

1) >MH347507.1 Triticum aestivum cultivar Chinese Spring gamma gliadin-A1 (Gli-1) gene, complete cds

GCAACAATGTTGCCAACAACAGCAGATTCCCTCAGCAGCTCCAGTGGCGAGCCATCCATGGCATCGTGCATTCATCATCATGCSAGCAAGAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGGCATACAGATCATGGGCCACTATTTGAGCT

Length:171 (F first index,R last index)->(680,851)

2) >JX679673.1 Triticum aestivum gamma-gliadin 1 mRNA, complete cds

GCAACAATGTTGCCAACAACAGCAGATTCCCTCAGCAGCTCCAGTGGCGAGCCATCCATGGCATCGTGCATTCATCATCATGCSAGCAAGAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGGCATACAGATCATGGGCCACTATTTGAGCT

Length:171 (F first index,R last index)->(729,900)

3) >AF234644.1 Triticum aestivum clone 09df2 gamma-gliadin mRNA, complete cds

GCAACAATGTTGCCAACAACAGCAGATTCCCTCAGCAGCTCCAGTGGCGAGCCATCCATGGCATCGTGCATTCATCATCATGCSAGCAAGAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGGCATACAGATCATGGGCCACTATTTGAGCT

Length:165 (F first index,R last index)->(731,896)

4) >KP280194.1 Triticum urartu cultivar PI428198 gamma-gliadin protein (gli) gene, Gli-gamma-3 allele, complete cds

GCAACAATGTTGCCAACAACAGCAGATTCCCTCAGCAGCTCCAGTGGCGAGCCATCCATGGCATCGTGCATTCATCATCATGCSAGCAAGAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGGCATACAGATCATGGGCCACTATTTGAGCT

Length:177 (F first index,R last index)->(680,857)

Forward primer: GCAACAATGTTGCCAACAAC

R Label reversed: TGCGGCCACTATTTGAGCT
AGCTGAAATAGTGCCCGCA

PCR product length:
From: 100 To: 500

Specific search Approximate search Show only F

Hide sequences in left window, that don't contain F and R primers.

Save selected sequences:
Save full sequences Save only results

Рис 4.7. Результати *in silico* ПЛР із праймерами MsA1

Поліморфні фрагменти ампліфікації, були отримані в ході *in silico* ПЛР із нуклеотидними послідовностями, що належать *Gli-A1* локусу, або іншим видам пшениць, що мають субгеном А. Підтвердження приналежності до *Gli-A1* локусу було отримано також в *in silico* ПЛР з великою послідовністю MG560140.1 (хромосома 1A), у якій знайдено одну ділянку на якій можуть відпалюватися праймери MsA1. Нуклеотидна послідовність, яка ампліфікується у даному випадку належить кодуючій послідовності гена Gamma gliadin-A1.

Загалом *in silico* ПЛР із праймерами MsA1 показала наявність семи різних фрагментів ампліфікації (таблиця 4.7) у 74 нуклеотидних послідовностей, довжиною від 135 п.н. до 177 п.н., що спричинене різною кількістю повторів мотиву САА. Для виду *Tr urartu* із геномом A^u знайдено алель 177 п.н., для виду *Tr monosocum* із геномом A^bA^b було виявлено два алелі – 141 п.н. і 144 п.н.

Таблиця 4.7

Результати *in silico* ПЛР з праймерами MsA1

Кількість нуклеотидних послідовностей	Вид	Алель <i>Gli-A1</i>
4	<i>T. aestivum</i> L. (А субгеном)	171 п.н.
2	<i>T. aestivum</i> L. (А субгеном)	165 п.н.
7	<i>T. aestivum</i> L. (А субгеном)	153 п.н.
2	<i>T. urartu</i>	177 п.н.
2	<i>T. monococcum</i> sbsp. <i>monococcum</i>	141 п.н.
3	<i>T. monococcum</i> sbsp <i>monococcum</i>	144 п.н.
54	<i>T. aestivum</i> L. (В субгеном)	135 п.н.

Для пшениці м'якої, три різних фрагменти ампліфікації: 153 п.н., 165 п.н. та 171 п.н., знайдені в нуклеотидних послідовностях, що належать *Gli-A1* локусу та фрагмент ампліфікації 135 п.н., що належить гену Gamma gliadin-B2, локалізованого у *Gli-B1* локусі. У зв'язку з виявленим поліморфізмом, дані праймери були випробувані у лабораторному дослідженні на колекціях сортів пшениці м'якої, що досліджувалася у даній роботі.

У результаті ПЛР із праймерами MsA1 (рис. 4.8) майже у кожному сорті було отримано декілька фрагментів ампліфікації, що й очікувалося з результатів *in silico* ПЛР. З них, фрагмент 135 п.н., що ампліфікується із *Gli-B1* локусу, був присутній у всіх зразків. Крім нього, дещо меншої інтенсивності були присутні поліморфні фрагменти ампліфікації, розміром від 153 п.н. до 228 п.н. (рис. 4.8).

Загалом за допомогою пари праймерів MsA1 в українській та світовій колекціях було виявлено вісім різних алелів, які відповідають алельним варіантам гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом (рис. 4.8, табл. 4.8).

Сорти пшениці м'якої, що характеризувалися *Gli-A1.2* алелем за результатом ПЛР з алель-специфічними праймерами та алельними варіантами гліадинів Gli-A1o, Gli-A1m із праймерами MsA1 харктеризувалися алелями 228 п.н., 222 п.н. відповідно.

У сортів з *Gli-A1x* алельним варіантом було виявлено два фрагменти ампліфікації: 186 п.н. та 159 п.н., а з *Gli-A1r* – нуль-алель (на електрофореграмі спостерігалися лише фрагменти ампліфікації 135 п.н., що відповідають *Gli-B1* локусу, (рис. 4.8)).

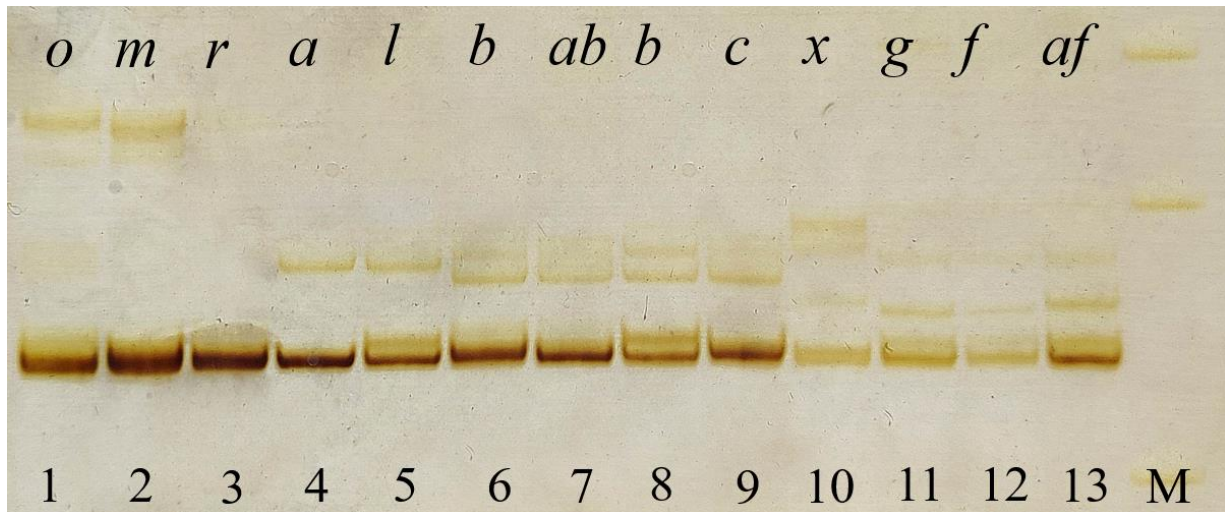


Рис. 4.8. Електрофореграма фрагментів ампліфікації ПЛР із праймерами MsA1.

ДНК сортів та ліній: 1 – Darius, 2 – Катерва, 3 – Laura, 4 – Chinese Spring, 5 – Salmone, 6 – Хист, 7 – Galahad, 8 – Наснага, 9 – Gazul, 10 – Водограй білоцерківський, 11 – Селянка, 12 – Миронівська 808, 13 – Goelent, М – маркер молекулярної ваги *pUC19/MspI*, буквами позначені алельні варіанти гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом

Сорти із алельними варіантами гліадинів *Gli-A1a*, *Gli-A1l* відрізнялися від інших сортів наявністю фрагментів ампліфікації 171 п.н., сорти із *Gli-A1b*, *Gli-A1ab*, *Gli-A1c* характеризувалися алелем 165 п.н., сорти із *Gli-A1g*, *Gli-A1f* алелем 153 п.н., а сорти із *Gli-A1af* – 156 п.н.

Таблиця 4.8

Відповідність між алелями, визначеними з використанням праймерів MsA1, алелями за алель-специфічними праймерами та алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом

Алель відповідно до праймерів, розроблених Zhang et al., (2003)	Алель мікросателіту, визначений з праймерами MsA1	Алельний варіант гліадинів, що кодуються <i>Gli-A1</i> локусом
<i>Gli-A1.2</i>	228	Gli-A1o
<i>Gli-A1.2</i>	222	Gli-A1m
<i>Gli-A1.2</i>	-	Gli-A1r
<i>Gli-A1.2</i>	186, 159	Gli-A1x
<i>Gli-A1.1</i>	171	Gli-A1a, Gli-A1l
<i>Gli-A1.1</i>	165	Gli-A1b, Gli-A1ab, Gli-A1c
<i>Gli-A1.1</i>	156	Gli-A1af
<i>Gli-A1.1</i>	153	Gli-A1g, Gli-A1f

На основі отриманих результатів, можна зробити висновок, що розроблені праймери MsA1 є досить інформативними і дозволяють визначити ряд алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом використовуючи метод ПЛР. Проте, недоліком даних праймерів є те, що крім фрагментів ампліфікації 135 п.н., присутніх у всіх зразків, та специфічних для сортів з різними алельними варіантами поліморфних фрагментів ампліфікації на електрофореграмах (частіше у сортів із Gli-A1g, Gli-A1f або із Gli-B1l) можуть бути присутні й інші слабо виражені смуги. Ми вважаємо їх неспецифічними, що імовірно, спричинене тим, що в геномі є ще досить багато подібних послідовностей, оскільки в *in silico* ПЛР знайдено багато послідовностей, які відрізняються двома-трьома нуклеотидами в праймері.

У зв'язку з цим, ми використали дану ділянку гена Gamma gliadin-A1 для розробки іншої пари праймерів, яка б була більш специфічною саме до субгеному A.

Для цього було створено вибірку V-Gli-ABD із нуклеотидних послідовностей, сформовану із найбільш подібних послідовностей до генів

Gamma gliadin-A1 (20 послідовностей), Gamma gliadin-B2 та Gamma gliadin-D1 по десять послідовностей. Мультиплексне вирівнювання даної вибірки (рис. 4.9) показало наявність поліморфізму спричиненого мікросателітом у послідовностях №1-20, що належать субгеному А, на відміну від послідовностей №21-30 та №31-40, що належать субгеномам В та D, у яких мотив САА присутній, але повторюється три рази, а відрізняються вони рядом SNP.

```

1. MN347507.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaagac----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
2. JX679673.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaagac----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
3. AF234644.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
4. KP280194.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaagaacaacaagaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
5. XM_044596595 ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaagac----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
6. KC715996.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
7. KY316882.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
8. KY316866.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
9. KY316818.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacgacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
10. KY316848.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
11. KY316831.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
12. KY316844.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
13. FJ006635.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
14. AF234643.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
15. GQ871772.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaagac----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcatg
16. JQ269808.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcctg
17. JQ269813.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcctg
18. FJ441094.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcctg
19. FJ441095.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcctg
20. JQ269819.1 T ctccagtgcgagccatccatggcgtcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaacaaggcatacagatcctg
21. MN347509.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
22. JX679675.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
23. FJ006600.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
24. FJ006577.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
25. KC715964.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
26. MN882471.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
27. GQ871777.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
28. GQ871776.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
29. JX828398.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
30. FJ006592.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagaacaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
31. MN899861.1 T ctccagtgtgagccatccatagtgctcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacgacaaggcgtgcccagatcctg
32. MN347513.1 T ctccagtgtgagccatccatagtgctcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacgacaaggcgtgcccagatcctg
33. JX679676.1 T ctccagtgtgagccatccatagtgctcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacgacaaggcgtgcccagatcctg
34. MK390347.1 T ctccagtgtgagccatccatagtgctcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacgacaaggcgtgcccagatcctg
35. FJ006605.1 T ctccagtgtgagccatccatagtgctcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacgacaaggcgtgcccagatcctg
36. FJ006622.1 T ctccagtgtgagccatccatagtgctcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacgacaaggcgtgcccagatcctg
37. KF880538.1 T ctccagtgtgagccatccatagtgctcgtgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacgacaaggcgtgcccagatcctg
38. FJ006643.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
39. FJ006712.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg
40. FJ006704.1 T ctccagtgcgagccatccacagcgtcgcgattccatcatcatcagcagaag----- -aacaacaacaaggcgtgcccagatcctg

```

Рис. 4.9. Фрагмент вирівнювання вибірки нуклеотидних послідовностей, найбільш подібних до генів Gamma gliadin-A1 (20 послідовностей), Gamma gliadin-B2 та Gamma gliadin-D1 за алгоритмом MAFFT

Для більш повного порівняння вибірки V-Gli-ABD була побудована дендрограма (рис. 4.10) методом UPGMA, у якій усі нуклеотидні послідовності розділилися на два кластери. Перший кластер складається із нуклеотидних послідовностей γ-гліадинових генів, що кодуються *Gli-A1* локусом *Tr aestivum* та *Tr monosocum*. Інший кластер до якого входять нуклеотидні послідовності найбільш подібні Gamma gliadin-B2 та Gamma gliadin-D1, що утворюють два підкластери. Тобто, нуклеотидні послідовності Gamma gliadin-B2 та Gamma gliadin-D1 генів є більш подібними між собою.

Нуклеотидні послідовності, що відносяться до *Gli-A1* локусу, утворюють окремий кластер, що показує їх рівень відмінності від гомологічних генів *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів, а тому існує можливість створення праймерів саме для *Gli-A1* локусу.

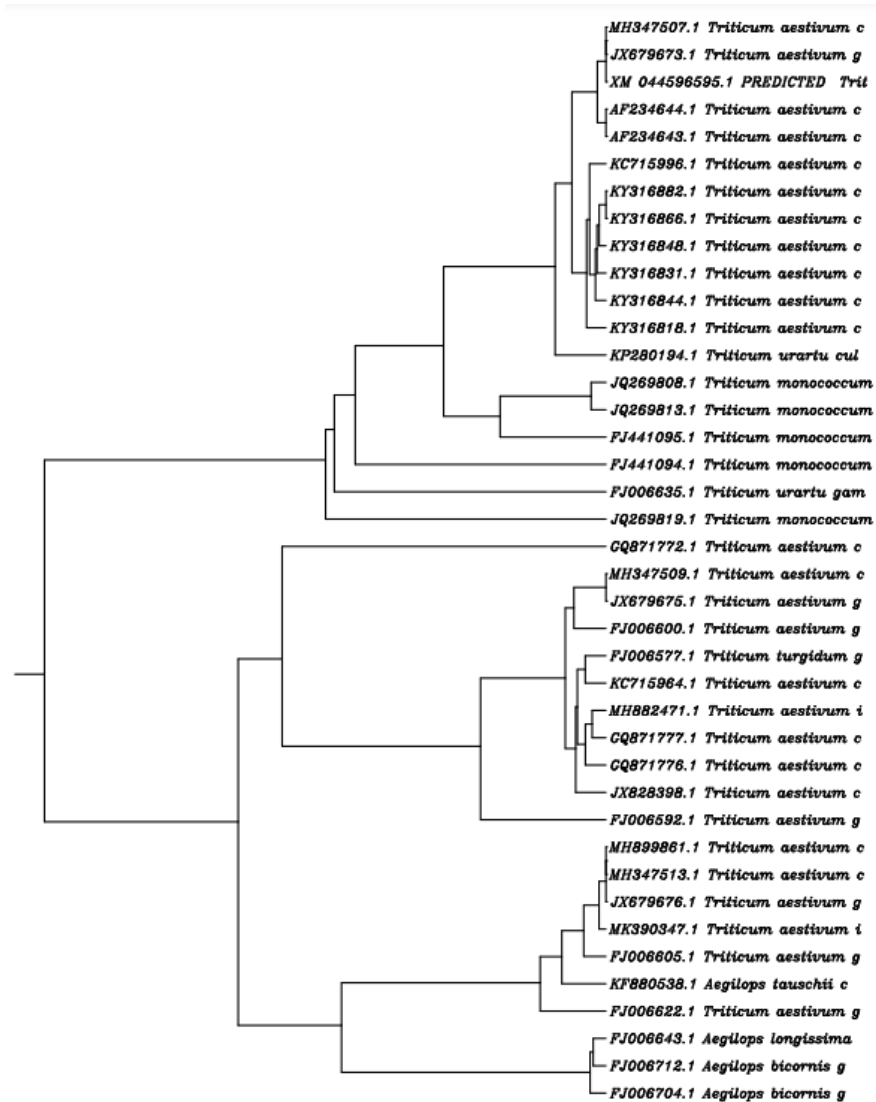


Рис. 4.10. Дендрограма нуклеотидних послідовностей гомологічних γ -гліадинових генів, побудована методом UPGMA

За допомогою Primer-BLAST було отримано десять пар праймерів, які фланкують мікросателіт, що знаходиться у межах нуклеотидної послідовності гена Gamma gliadin-A1. Дані праймери були протестовані методом *in silico* ПЛР на проаналізованій вибірці V-Gli-ABD.

У таблиці 4.9 відображені найбільш відповідні результати із *in silico* ПЛР. Дев'ять із десяти пар праймерів виявилися повністю комплементарні до матриць із нуклеотидних послідовностей, що належать виду *T. aestivum* та дозволяють виявити алелі мікросателіта (MN347507, AF234644, KC715996). Пари праймерів №6, 7, 8 комплементарні також до послідовності KP280194 та JQ269813, FJ441095, що належать видам *T. urartu* та *T. monosocum*.

Таблиця 4.9

**Результати тестування в *in silico* ПЛР потенційних пар праймерів,
розроблених до мікросателіту *Gli-A1* локусу**

№	5'-3' послідовність праймера	MN347507 (<i>Gli-A1</i>), п.н.	AF234644 (<i>Gli-A1</i>), п.н.	KC715996 (<i>Gli-A1</i>), п.н.	KP280194 (<i>Gli-A1</i>), п.н.	FJ441095 (<i>Gli-A1</i>), п.н.	JQ269813 (<i>Gli-A1</i>), п.н.	MN347509 (<i>Gli-B1</i>), п.н.
1	GCCACGAAGTGATTGCAAGG AACACGTTGCACATGGTTGG	297	291	279	303*	267*	-	261**
2	AAGGTGATGCGGCAACAATG CACGTTGCACATGGTTGGAA	279	273	261	285*	249*	-	243*
3	CAAGGTGATGCGGCAACAAT GAGGTTGGATGATGCCCTGA	212	206	194	217*	192*	185*	176*
4	GGTGTCAATCCCTCGTGTCAA ACGTTGCACATGGTTGGAAG	321	315	303	327*	291	-	285*
5	TTGGTGTCAATCCCTCGTGTCA ACACGTTGCACATGGTTGGA	325	319	307	331*	295	-	289*
6	CCTCTTGCAGCAATGCAACC GGTTGGATGATGCCCTGACC	282	276	264*	288	252	255	246*
7	ACCCTGTGTCAATGGTGTCA GTTGAGGTTGGATGATGCCC	270	264	252	276	240	243	234**
8	TCTTGCCACGAAGTGATTGC TGACCCTGGACGAGCTGAAA	214	208	196	220	184	187	178**
9	ATTGGTGTCAATCCCTCGTGT AGCTGGTTGTTGAGGTTGGA	268	262	250	274*	238*	241*	232*
10	GGTGTCAATCCCTCGTGTCAAT ACCTCCAATTGAGCTGGTTGT	276	270	258	282*	246*	249*	240**

* один із пари праймерів має 1-3 некомплементарних матриці нуклеотиди.

** прямий і зворотній праймери мають 1-3 некомплементарні матриці нуклеотиди.

В усіх послідовностях, що належали *Gli-B1* локусу, у прямому чи зворотньому праймері були виявлені некомплементарні матриці нуклеотиди, але пара праймерів №7 виявилася повністю комплементарною нуклеотидним послідовностям, що належать *Gli-D1* локусу.

Враховуючи отримані результати *in silico* ПЛР, можна зробити висновок, що найкращими для ідентифікації алелів мікросателіту, є пара праймерів №1, оскільки вона некомплементарна до нуклеотидних послідовностей *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів.

РОЗДІЛ 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ *GLI-D1* ЛОКУСУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

5.1. Генетичний поліморфізм *Gli-D1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої

Для аналізу генетичного поліморфізму *Gli-D1* локусу також використовували дві пари алель-специфічних праймерів, розроблених Zhang et al. (2003) до алелів, що визначаються SNP: *Gli-D1.1* (тимін) та *Gli-D1.2* (цитозин). Пари праймерів, що використовувалися для ідентифікації *Gli-D1.1/Gli-D1.2* алелів мали однаковий прямий праймер та різні зворотні. Алель SNP, в даному випадку, визначався саме послідовністю зворотнього праймера, на відміну від інших аналогічних алель-специфічних праймерів, розроблених Zhang et al. (2003), що використовувалися у дослідженні.

Поліморфізму за довжиною фрагментів ампліфікації *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2* алелів не виявлено. Продукти ампліфікації *Gli-D1.1* алеля становили 264 п.н., а *Gli-D1.2* алеля – 270 п.н., що і було вказано розробниками праймерів Zhang et al. (2003).

За результатами ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1* локусу у вибірці сучасних українських сортів пшениці м'якої у більшості сортів виявлено *Gli-D1.2* алель (54 сортів), *Gli-D1.1* алель було знайдено у 22 сортів. На відміну від результатів по *Gli-A1* та *Gli-B1* локусах, значна кількість сортів за *Gli-D1* локусом була гетерогенною, або ж позитивною за двома алелями (*Gli-D1.1* та *Gli-D1.2*) одночасно у всіх досліджених зернівках (табл. 5.1). Використання HotStart ДНК-полімерази, у більшості випадків, дозволило лише значно знизити ефективність реакції з праймерами до одного з алелів.

Таблиця 5.1

Результати ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1* локусу, розробленими Zhang et al. (2003) та електрофорезу запасних білків у колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої

№	Назва сорту	Алель <i>Gli-D1.1</i>	Алель <i>Gli-D1.2</i>	Алельний варіант <i>Gli-D1</i>
1	Аріївка	-	+	b
2	Балада Миронівська	-	+	b
3	Ватажок	-	+	b
4	Вільшана	-	+	b
5	Водограй білоцерківський	-	+	b
6	Говтва	-	+	b
7	Грація миронівська	-	+	b
8	Донецька 48	-	+	b
9	Естафета миронівська	-	+	b
10	Зоряна Носівська	-	+	b
11	Крижинка	-	+	b
12	Либідь	-	+	b
13	Лінія КС1	-	+	b
14	Лінія КС14	-	+	b
15	Лісова пісня	-	+	b
16	Мадярка	-	+	b
17	Миронівська 65	-	+	b
18	Миронівська 61	-	+	b
19	МІП Ассоль	-	+	b
20	МІП Дніпрянка	-	+	b
21	Оберіг миронівський	-	+	b
22	Перлина лісостепу	-	+	b
23	Подільянка	-	+	b
24	Романтика	-	+	b
25	Світанок миронівський	-	+	b

26	Трудівниця миронівська	-	+	b
27	Херсонська безоста	-	+	b
28	Царівна	-	+	b
29	Чародійка білоцерківська	-	+	b
30	Щедра нива	-	+	b
31	Ювіляр миронівський	-	+	b
32	Ясочка	-	+	b
33	МПП Вишиванка	-	+	b+g
34	Овідій	-	+	b+g
35	Куяльник AR	-	+	d
36	Металіст	-	+	d
37	Ветеран	-	+	g
38	Жайвір	-	+	g
39	Зміна	-	+	g
40	Левада	-	+	g
41	Лінія КС22-04	-	+	g
42	Мудрість І	-	+	g
43	Подяка	-	+	g
44	Селянка	-	+	g
45	Благо	-	+	j
46	Бургунка	-	+	j
47	Відповідь одеська	-	+	j
48	Конка	-	+	j
49	Кохана	-	+	j
50	Ліра одеська	-	+	j
51	Марія	-	+	j
52	Оржиця	-	+	j
53	Щедрість	-	+	j
54	Анатолія	-	+	new
55	Білоцерківська напівкарликова	+	-	b
56	Зимоярка	+	-	b
57	Кларіса	+	-	b
58	Ледя	+	-	b+f
59	Віген	+	-	f
60	Гурт	+	-	f
61	Хист	+	-	f+b
62	Відрада	+	-	g

63	Мудрість I	+	-	g
64	Мудрість II	+	-	g
65	Панна	+	-	g
66	Традиція I	+	-	g
67	Традиція II	+	-	g
68	Ювівата 60	+	-	g
69	Українка полтавська	+	-	g+new
70	Білосніжка	+	-	j
71	Вежа миронівська	+	-	j
72	Кошова	+	-	j
73	Лінія Л41/95	+	-	j
74	Мелодія одеська	+	-	j
75	Миронівська золотоверха	+	-	j
76	Мудрість IV	+	-	j
77	Царичанка	+	+	4в
78	Лінія Л59-95	+	+	b
79	Миронівська слава	+	+	b
80	Пам'яті Ремесла	+	+	b
81	Наснага	+	+	b+g
82	Оптима одеська	+	+	b+new
83	Соната	+	+	f+b
84	Борвій	+	+	g
85	Сагайдак	+	+	j
86	Антонівка	+	+	j+g
87	Лютенька	+	+	new
88	Сидор Ковпак	+	+	new

Методом електрофорезу в кислому ПААГ в українській колекції було виявлено шість різних аельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-D1* локусом (табл. 5.1). Найбільше сортів української колекції характеризувалися *Gli-D1b* аельним варіантом гліадинів – 35 сортів. Даний аельний варіант є найпоширенішим у світі, та зустрічається у 39,4 % сортів із каталогу Metakovsky et al. (2018). Ще у 17-ти українських сортів пшениці м'якої виявлено *Gli-D1j*, та у 16-ти – *Gli-D1g* аельні варіанти гліадинів. Також у невеликої кількості зустрічалися *Gli-D1d*, *Gli-D1f* аельні варіанти, ще у п'ятох сортів не вдалося ідентифікувати аельний варіант, тому вони були позначені як нові (табл. 5.1).

Крім цього дев'ять сортів української вибірки були гетерогенними за алельними варіантами гліадинів.

Відповідність між алельними варіантами та алелями *Gli-D1* локусу не спостерігалася. Сорти із *Gli-D1b* алельним варіантом гліадинів характеризувалися як *Gli-D1.1* алелем, так і *Gli-D1.2* алелем. Електрофореграма продуктів ампліфікації двох сортів, що характеризуються *Gli-D1b* алельним варіантом гліадинів показана на рис. 5.1.

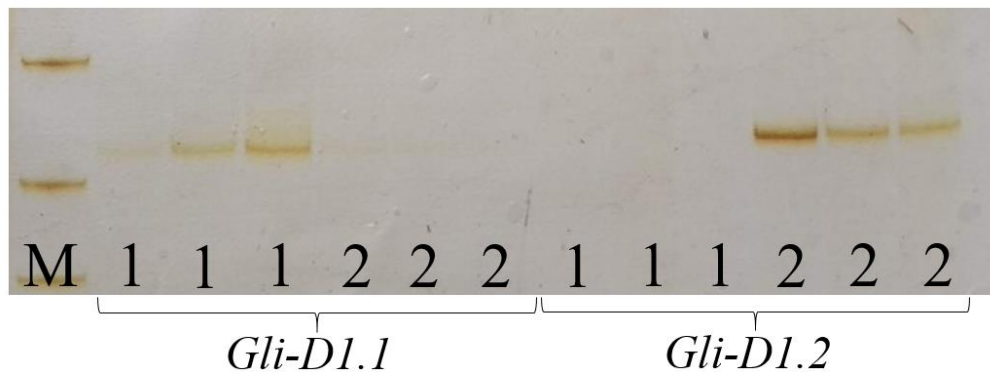


Рис. 5.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих у ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1.1/Gli-D1.2* алелів.

ДНК сортів: ДНК сортів: (Б) 1- Зимоярка, 2 – Естафета миронівська, М – маркер молекулярної ваги *pUC/MspI*

На рисунку 5.1 видно, що в сорту Зимоярка присутні фрагменти ампліфікації, що відповідають *Gli-D1.1* алелю, а в сорту Естафета миронівська *Gli-D1.2* алелю. Крім Зимоярки, в українській колекції було виявлено ще два сорти із таким же результатом: Кларіса та Білоцерківська напівкарликова. Ще три сорти та лінія із *Gli-D1b* алельним варіантом гліадинів, були гетерогенними Миронівська слава, Пам'яті Ремесла та Л59/95, проте значна частина сортів пшениці м'якої характеризувалася *Gli-D1b* алельними варіантом гліадинів та *Gli-D1.2* алелем (рис. 5.1).

Подібні результати ПЛР також були отримані для сортів, що характеризувалися *Gli-D1j* та *Gli-D1g* алельними варіантами: з 17-ти сортів із *Gli-D1j* у семи виявлено *Gli-D1.1*, у дев'яти *Gli-D1.2*, один – гетерогенний, серед

16-ти сортів із Gli-D1g у семи виявлено *Gli-D1.1*, у восьми *Gli-D1.2* та один гетерогенний.

Лише *Gli-D1.2* алельний варіант гліадинів було знайдено у сортів пшениці м'якої, які характеризувалися Gli-D1d (два сорти) та Gli-D1f (два сорти) алельними варіантами гліадинів. Загалом, можна зробити висновок, що алельні варіанти гліадинів, що кодуються *Gli-D1* локусом не залежать від алелів *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2*.

Загалом в українській колекції сортів пшениці м'якої найбільш поширеним алельним варіантом гліадинів був Gli-D1b, з частотою 0,48. Хоча, серед українських сортів, що увійшли в каталог Є. В. Метаковського (Metakovsky et al., 2018) найбільш поширеним алельним варіантом, що кодується *Gli-D1* локусом був Gli-D1g. Частота Gli-D1b алельного варіанту гліадинів у різних селекційних центрах значно відрізнялася (табл. 5.2). Наприклад, у сортів МПП та БЦСДС Gli-D1b зустрічався із частотою 0,90-0,91, у НСДС даний алельний варіант також був домінантним (частота 0,63). Але у сортів СГІ-НЦНС, ІЗЗ та ПДАА Gli-D1b алельний варіант не був домінантним та зустрічався із частотою 0,14, 0,20 та 0,25, відповідно.

Алельний варіант гліадинів Gli-D1j був другим за частотою в українській колекції сортів пшениці м'якої (частота 0,21), та зустрічався у всіх селекційних центрах, крім Білоцерківської селекційно-дослідної станції. Даний алельний варіант був домінантним у вибірці із Інституту зрошувального землеробства, його частота становила 0,60 (табл. 5.2). Третім за частотою в українській вибірці був алельний варіант гліадинів Gli-D1g (частота 0,20), а також домінантним у сортів пшениці м'якої із СГІ-НЦНС (частота 0,46). Gli-D1g зустрічався у сортів усіх селекційних центрів, крім МПП.

Таблиця 5.2

Частоти алельних варіантів гліадинів, що кодується *Gli-D1* локусом та алелів *Gli-D1.1/ Gli-D1.2*, у різних селекційних центрах України

Алельний варіант	СГІ-НЦНС N=28	МІП N=21	БЦСДС N=11	ІЗЗ N=10	ПДАА N=10	НСДС N=8	Українська колекція N=94
Алельний варіант							
Gli-D1b	0,14	0,90	0,91	0,20	0,25	0,63	0,48
Gli-D1d	0,04	-	-	-	-	-	0,02
Gli-D1f	0,09	-	-	0,05	0,05	-	0,04
Gli-D1g	0,46	-	0,09	0,05	0,15	0,25	0,20
Gli-D1j	0,25	0,10	-	0,60	0,20	0,12	0,21
Gli-D1new	0,02	-	-	0,10	0,25	-	0,04
Gli-D14в	-	-	-	-	0,1	-	0,01
Н індекс	0,70	0,18	0,16	0,59	0,8	0,53	0,68
Алель <i>Gli-D1</i> локусу							
<i>Gli-D1.1</i>	0,43	0,19	0,18	0,20	0,35	0,31	0,30
<i>Gli-D1.2</i>	0,57	0,81	0,82	0,80	0,65	0,69	0,70

Інші алельні варіанти гліадинів такі як Gli-D1d та Gli-D1f були досить рідкісними, та були знайдені у СГІ-НЦНС та СГІ-НЦНС, Інституті зрошувального землеробства, Полтавській державній аграрній академії, відповідно. Нові алельні варіанти гліадинів були виявлені у сортів із трьох селекційних центрів, найбільше у Полтавській державній аграрній академії.

Індекс генетичного поліморфізму *Gli-D1* локусу для колекції сучасних українських сортів пшениці м'якої становив 0,68, що менше від *Gli-A1*, але більше, ніж *Gli-B1*.

Найбільший рівень генетичного поліморфізму спостерігався за *Gli-D1* локусом спостерігався в ПДАА (H=0,8) та СГІ-НЦНС (H=0,70) у їх вибірках сортів пшениці знайдено по шість різних алельних варіантів.

Найменший поліморфізм спостерігався у вибірках сортів пшениці із МІП та БЦСДС, з індексами генетичної поліморфності 0,18 та 0,16, у яких виявлено по два алельних варіанти: Gli-D1b і Gli-D1j та Gli-D1b і Gli-D1g, відповідно.

Частота *Gli-D1.1* алеля у вибірці сучасних українських сортів пшениці м'якої становила 0,30, а *Gli-D1.2* алеля – 0,70. У більшості селекційних центрів така тенденція зберігалася – переважав *Gli-D1.2* із частотою від 0,57 до 0,82. Найвища частота *Gli-D1.1* алеля була зафіксована у вибірці із МПП, що становила 0,43.

5.2. Генетичний поліморфізм *Gli-D1* локусу, виявлений методами ПЛР та електрофорезом запасних білків у кислому ПААГ у світовій колекції сортів пшениці м'якої

За результатами ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1* локусу, світова колекція сортів пшениці м'якої значно відрізнялася від вибірки сучасних українських сортів за частотами алелів *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2*.

Gli-D1.1 алель був знайдений у 31 сорту, що становило 62% світової колекції (табл. 5.3), *Gli-D1.2* алель було виявлено у 15-ти сортів, на відміну від української вибірки, де переважав *Gli-D1.2* алель, присутній у 70% сортів.

У світовій колекції сортів було знайдено також сорт та лінію – Darius та 1B⁺, 1D⁺ з *null* алелем, у яких відсутній *Gli-D1* локус. Та два сорти із позитивним результатом для *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2* алелів: Kavkaz та Inia-69*.

Світова колекція охоплювала сорти пшениці м'якої із дев'ятьма різними алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-D1* локусом. Найбільша кількість сортів характеризувалася *Gli-D1b* (з частотою 0,36) та *Gli-D1a* (з частотою 0,20) алельними варіантами гліадинів, 22 та 12 сортів, відповідно (табл. 5.3). Ще дев'ять сортів мали *Gli-D1f* алельний варіант гліадинів (з частотою 0,14), по три – *Gli-D1i* (з частотою 0,04) *Gli-D1g* (частота 0,04), *Gli-D1j* (частота 0,05) та по одному сорту *Gli-D1q*, *Gli-D1l*, *Gli-D1d* (з частотою 0,02). Чотири сорти виявилися гетерогенними за алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-D1* локусом.

Таблиця 5.3

Результати ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1* локусу, розробленими Zhang et al. (2003) та електрофорезу запасних білків у світовій вибірці сортів пшениці м'якої

№	Назва сорту	Алель <i>Gli-D1.1</i>	Алель <i>Gli-D1.2</i>	Алельний варіант <i>Gli-D1</i>
Світова колекція сортів надана Є. В. Метаковським				
1	1B*,1D* (лінія)	-	-	null
2	Darius	-	-	null
3	Cluij-650	-	+	a
4	Argelato	-	+	b
5	Bezostaya-1	-	+	b
6	Capelle-Desprez	-	+	b
7	Galahad	-	+	b
8	Libero	-	+	b
9	Pane-247	-	+	b
10	Recital	-	+	b
11	Salmone	-	+	b
12	Sideral	-	+	b
13	Splendeur	-	+	b
14	Titien	-	+	b
15	Aragon-03	-	+	i
16	Federation	-	+	i
17	Glenlea	-	+	j
18	Cajeme-71	+	-	a
19	Chinese-Spring	+	-	a
20	Goelent	+	-	a
21	Marquis	+	-	a
22	Mentana	+	-	a
23	Newcaster	+	-	a
24	Prinqual	+	-	a
25	Rinconada	+	-	a
26	Yecora-Rojo	+	-	a
27	N10T1B (лінія)	+	-	a?
28	N1BT1D (лінія)	+	-	a?
29	Intensivnaya	+	-	a+b
30	Arminda	+	-	b
31	Cartaya	+	-	b

32	Diego	+	-	b
33	Escualo	+	-	b
34	Gazul	+	-	b
35	Laura	+	-	b
36	Pavon-F-76 (Betres)	+	-	b
37	Siete-Cerros-66	+	-	b
38	Potam-70	+	-	b+a
39	Ardec	+	-	d
40	Caia	+	-	f
41	Donskaya polukarlikovaia	+	-	f
42	Gabo	+	-	f
43	Roblin	+	-	f
44	Suneca	+	-	f
45	Mironovskaya 808	+	-	g
46	Katepwa	+	-	i
47	Insignia	+	-	i+j
48	Krasnodonka	+	-	q
49	Kavkaz	+	+	f+b
50	Inia-69*	+	+	j
Сорти та лінії пшениці м'якої з дослідження Поліщук та ін. (2010)				
51	Альбатрос од.	-	+	j
52	Любава одеська	-	+	b+j
53	Струмок	-	+	b
54	GLI-B1-3	-	+	b
55	GLI-A1-1	-	+	b
56	GLI-B1-12	-	+	b
57	GLI-B1-4	-	+	b
58	GLI-D1-4	-	+	j
59	GLI-D1-5	+	-	g
Сорти із генбанків Leibniz institute of plant genetics and crop plant research (Німеччина) та Agriculture and Agri-Food Canada (Канада)				
60	Red Fife	+	-	j
61	Hard Red Calcutta	+	-	g
62	Ladoga	+	-	f
63	Girka	+	-	f
64	Skorospelka	+	-	f
65	Aquila	+	-	l
66	Bison	+	-	b
67	Cheyenne	+	-	g
68	Claudius	+	-	b

69	Kadett	+	+	b
70	Pegaso	+	+	f
71	You tzu mai	+	+	?
72	Zhemai 1	+	-	?
73	Zhemai 2	+	-	?

У порівнянні із вибіркою сучасних українських сортів пшениці м'якої, світова вибірка відрізнялася також і за набором алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-D1* локусом. Так, *Gli-D1a* алельний варіант, який зустрічався у значної кількості сортів світової вибірки, в українських сортах не знайдений, крім цього, не знайдено ще й *Gli-D1i* та *Gli-D1q* алельні варіанти гліадинів. За даними Metakovsky et al. (2018), *Gli-D1a* найбільш розповсюджений у Казахстані, Росії, Північній Європі, Іспанії та Хорватії, а *Gli-D1i* та *Gli-D1q* є досить рідкісними.

Характерні для сучасної української вибірки алельні варіанти гліадинів *Gli-D1g*, *Gli-D1j* у світовій колекції були присутні лише в одному-двох сортах: *Mironovskaya-808* (*Gli-D1g*), що є українським сортом, в американського сорту *Inia-69* (*Gli-D1j*) та австралійського *Insignia* (*Gli-D1j*+ *Gli-D1i*).

У вибірці сортів із роботи Поліщук та ін. (2009), у трьох сортів та п'ятих лініях виявлено *Gli-D1.2* алель (табл. 5.3), та в однієї майже ізогенної лінії – *GLI-D1-5* виявлено *Gli-D1.1* алель. Чотири лінії та сорт Струмок характеризувалися *Gli-D1b* алельним варіантом, сорт Альбатрос і лінія *GLI-D1-4* характеризувалися *Gli-D1j*, а лінія *GLI-D1-5* – *Gli-D1g* алельним варіантом гліадинів. Сорт Любава був гетерогенним із *Gli-D1b* та *Gli-D1j*.

Із шести майже ізогенних ліній, створених на основі сорту Безоста 1, у двох маркерною ознакою були алельні варіанти гліадинів, що кодуються *Gli-D1* локусом: *Gli-D1g* та *Gli-D1j*, а рекурентний батьківський сорт характеризується *Gli-D1b* алельним варіантом гліадинів (сорт *Bezostaya 1*, табл. 5.3). Опираючись на результати, отримані для майже ізогенних ліній, можна зробити висновок, що існує відповідність між алельними варіантами гліадинів та алелями *Gli-D1* локусу. Рекурентний сорт Безоста 1 та лінія *GLI-D1-4*, що характеризуються *Gli-*

D1b та Gli-D1j алельними варіантами мають *Gli-D1.2* алель, а при зміні на Gli-D1g алельний варіант у лінії GLI-D1-5 виявляється *Gli-D1.1* алель.

У світовій колекції сортів відповідність, що була встановлена на майже ізогенних лініях зберігається (табл. 5.4) у двох сортів – Glenlea (Gli-D1j) та Mironovskaya-808 (Gli-D1g).

Таблиця 5.4

Відповідність алелів *Gli- D1* локусу та алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli- D1* локусом

Алель <i>Gli-D1</i>	Алельний варіант <i>Gli-D1</i>	Кількість сортів української колекції	Кількість сортів зарубіжної колекції
<i>Gli-D1.1</i>	Gli-D1a	-	11
	Gli-D1b	3	8
	Gli-D1d	-	1
	Gli-D1f	2	5
	Gli-D1g	7	1
	Gli-D1i	-	1
	Gli-D1j	7	-
	Gli-D1q	-	1
<i>Gli-D1.2</i>	Gli-D1a	-	1
	Gli-D1b	33	11
	Gli-D1d	2	-
	Gli-D1g	8	-
	Gli-D1i	-	2
	Gli-D1j	10	1

Проте у вибірці сучасних українських сортів пшениці м'якої, яка містить 17 гомогенних сортів сортів із Gli-D1j та 15 сортів із Gli-D1g алельними варіантами, відповідність між алельними варіантами гліадинів та алелями *Gli-D1* локусу не встановлена. Gli-D1j та Gli-D1g алельні варіанти складно розрізнялися на електрофореграмах запасних білків отриманих за методикою Ф. А. Поперелі (1996), що могло би бути причиною такого результату, але відповідність не встановлена також і для інших алельних варіантів гліадинів у двох вибірках.

Із усіх сортів із *Gli-D1b* алельним варіантом гліадинів, у більшості – 44 сортів виявлено *Gli-D1.2* алель, а в 11-ти присутній *Gli-D1.1* алель. Аналогічна ситуація спостерігалася і для *Gli-D1g* (8 сортів із *Gli-D1.1* та 8 сортів із *Gli-D1.2* алелем), *Gli-D1j* (7 сортів із *Gli-D1.1* та 11 сортів із *Gli-D1.2* алелем) (табл. 5.4). Також один сорт із світової колекції, що характеризувався *Gli-D1d* алельними варіантом мав *Gli-D1.1* алель, а у двох українських сортів із цим же алельним варіантом виявлено *Gli-D1.2* алель.

Для алельних варіантів гліадинів, які зустрічалися лише у світовій колекції, також відповідність не встановлена – *Gli-D1a* (11 сортів із *Gli-D1.1* та 1 сорт із *Gli-D1.2* алелем) та *Gli-D1i* (1 сорт із *Gli-D1.1* та 2 сорти із *Gli-D1.2* алелем). Вийнятком є лише сорти із *Gli-D1f* алельним варіантом гліадинів, які характеризувалися тільки *Gli-D1.1* алелем.

5.3. Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей *Gli-D1* локусу пшениці м'якої та низки інших видів злаків

Аналогічно до аналізу нуклеотидних послідовностей *Gli-A1* локусу аналізувався і *Gli-D1* локус. За даними Zhang et al. (2003), *Gli-D1.1* алель присутній у нуклеотидних послідовностях AJ133613.1 та AF234649.1 з довжиною продуктів ампліфікації 264 п.н., а *Gli-D1.1* – у D78183.1, з довжиною продуктів ампліфікації 270 п.н.

Різниця у довжині фрагментів ампліфікації *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2* алелів спричинена зміщенням зворотнього праймера. На рисунку 5.2, показане порівняння нуклеотидних послідовностей *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2* алелів, яке демонструє, що прямий праймер у цих пар спільний, а зворотній – відрізняється за SNP, що визначає алель, а також для *Gli-D1.1* алеля він зміщений на 6 п.н. (рис. 5.2).

D78183	1	<u>AAGCGATTGCCAGGTGATGCGGCAACAATGTTGCCAACAAC</u> TAGCACAAATTCCTCAGCA	60
AF234649	471	<u>AAGCGATTGCCAGGTGATGCGGCAACAATGTTGCCAACAAC</u> TAGCACAAATTCCTCAGCA	530
D78183	61	ACTCCAGTGTGCAGCCATCCATAGCATCGTGCATTCCATCATCATGCAGCAAGAACAACA	120
AF234649	531	ACTCCAGTGTGCAGCCATCCATAGCATCGTGCATTCCATCATCATGCAGCAAGAACAACA	590
D78183	121	AGAACAACGACAGGGTGTGCAAATCCTGGTGCCACTGTCTCAACAGCAACAGGTAGGTCA	180
AF234649	591	AGAACAACGACAGGGTGTGCAAATCCTGGTGCCACTGTCTCAACAGCAACAGGTAGGTCA	650
D78183	181	AGGTACTIONCTCGTCCAAGGTCAGGGCATCATCCAACCTCAACAACCAGCTCAATTGGAGGT	240
AF234649	651	AGGTACTIONCTCGTCCAAGGTCAGGGCATCATCCAACCTCAACAACCAGCTCAATTGGAGGT	710
D78183	241	GATTAGGTCAT <u>CGGTGTTGCAAAC</u> TCTTGC	270
AF234649	711	GATTAGGTCAT <u>CGGTGTTGCAAAC</u> TCTTGC	740

Рис. 5.2. Порівняння нуклеотидних послідовностей D78183 та AF234649 у сервісі BLAST.

Червоним підкреслені послідовності, що відповідають праймерам до *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2* алелям

Сумарна вибірка із нуклеотидних послідовностей V-Gli-D1.1/2 становила 101 нуклеотидну послідовність, сформована за допомогою BLAST пошуку із запитом у вигляді послідовності, що ампліфікується із праймерами до *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2* алелів. П'ять нуклеотидних послідовностей із даної вибірки містили одонуклеотидні заміни у послідовності праймера, що унеможливорює ампліфікацію. Загалом у вибірці V-Gli-D1.1/2 було знайдено 67 нуклеотидних послідовностей, що належать пшениці м'якій, у 65 із яких виявлено *Gli-D1.1*, та лише у двох – *Gli-D1.2* алель (табл. 5.5). Крім цього, *in silico* ПЛР показала можливість застосування даних праймерів і для деяких інших, близьких до пшениці м'якої видів.

Крім пшениці м'якої нуклеотидна послідовність, що відповідає фрагментам ампліфікації *Gli-D1.1* алеля була знайдена у послідовностях гену γ -гліадину видів *Triticum taushii* (інша назва *Aegilops Taushii*) (важається донором субгену D) та *Amblyopyrum muticum* (більш поширена назва *Aegilops mutica* (Boissier) Eig, а *Gli-D1.2* алель у виду *Aegilops speltoides*, та гібридів *Triticum*

*aestivum***Lophopyrum elongatum* (інші назви *Thinopyrum elongatum* (Host) D.R.Dewey, або *Elytrigia elongata* Nevski).

Таблиця 5.5

Розподіл алелів *Gli-D1* локусу, у нуклеотидних послідовностях із Генбанку, визначених методом *in silico* ПЛР

Вид	<i>Gli-D1.1</i> алель		<i>Gli-D1.2</i> алель	
	Кількість послідовностей	%*	Кількість послідовностей	%*
<i>Triticum aestivum L</i>	65	75	2	22
<i>Triticum taushii</i>	20	23	-	
<i>Aegilops speltoides</i>	-	-	4	45
<i>Triticum aestivum</i> * <i>Lophopyrum elongatum</i>	-	-	3	33
<i>Amblyopyrum muticum</i>	2	2	0	-
Загальна кількість	87		9	

*Відсоток визначався від загальної кількості послідовностей з позитивним результатом *in silico* ПЛР.

Частоти алелів *Gli-D1* локусу, для пшениці м'якої, знайдених у вибірці V-Gli-D1.1/2 становили 0,97 для *Gli-D1.1* алеля та 0,03 для *Gli-D1.2* алеля, що значно відрізнялися від частот, отриманих у лабораторному експерименті на світовій (частота *Gli-D1.1* алеля 0,65; *Gli-D1.2* алеля – 0,33) та українській вибірках сортів (частота *Gli-D1.1* алеля 0,30; *Gli-D1.2* алеля – 0,70).

Мультиплексне вирівнювання та порівняння усіх нуклеотидних послідовностей, з позитивним результатом *in silico* ПЛР показало, наявність 20 різних SNP у 28 послідовностях із *Gli-D1.1* алелем та п'ять різних SNP у шести нуклеотидних послідовностях із *Gli-D1.2* алелем (табл. 5.6). Серед послідовностей пшениці м'якої, SNP містять 24,6% послідовностей із *Gli-D1.1* алелем, для інших видів цей відсоток був вищим, і становив від 50% до 100%.

Таблиця 5.6

Розподіл SNP мутацій, знайдених у межах послідовностей, що фланкуються праймерами до алелів *Gli-D1* локусу, у нуклеотидних послідовностях із Генбанку, визначених методом *in silico* ПЛР

Вид	<i>Gli-D1.1</i> алель		<i>Gli-D1.2</i> алель	
	Кількість послідовностей	%	Кількість послідовностей	%
<i>Triticum aestivum L</i>	16	24,6	-	0
<i>Triticum taushii</i>	10	50	-	
<i>Aegilops speltoides</i>	-		3	75
<i>Triticum aestivum*Lophopyrum elongatum</i>	-		3	100
<i>Amblyopyrum muticum</i>	2	100	-	-
Загальна кількість	28	32	6	67

Нуклеотидна послідовність, що фланкується праймерами до *Gli-D1.1/ Gli-D1.2* алелів була знайдена як в послідовностях γ -гліадинових генів, так і псевдогенів. Загалом знайдено п'ять псевдогенів пшениці м'якої, із позитивним результатом *in silico* ПЛР із парою праймерів до *Gli-D1.1* алеля та один для *Gli-D1.2* алеля, що належав виду *Ae speltoides*.

У великій нуклеотидній послідовності *Gli-D1* локусу MG560142.1 (довжиною 5639164 п.н.), отриманій для сорту Chinese Spring в ході секвенування, нуклеотидна послідовність, що фланкується праймерами до *Gli-D1* локусу, знаходиться в межах кодуєчої ділянки гена gamma gliadin D4 (2809873-2810136 п.н.). У даній послідовності знайдено *Gli-D1.1* алель, що співпадає із результатами лабораторного експерименту для сорту Chinese Spring.

Незважаючи на те, що ряд сортів пшениці м'якої в ході лабораторного експерименту демонстрував позитивний результат одразу для двох пар праймерів, в *in silico* ПЛР з праймерами до до *Gli-D1* локусу у великій послідовності MG560142.1 знайдено лише одну копію нуклеотидної послідовності, що може ампліфікуватися в ПЛР. Проте, присутність даної

ділянки у послідовностях як генів, так і псевдогенів із досліджуваної вибірки може бути непрямим доказом, імовірної наявності декількох копій.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За допомогою ПЛР з алель-специфічними праймерами та праймерами до мікросателіту *Taglgap* та мікросателіту в кодуючій послідовності гена *gamma-gliadin A1*, а також за використання секвенування та біоінформаційних методів й електрофорезу запасних білків в кислому ПААГ досліджено поліморфізм γ -гладінових генів, що кодуються трьома локусами *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1*.

Доведено, що світова колекція сортів пшениці м'якої була більш поліморфною, ніж вибірка сучасних українських сортів за усіма досліджуваними локусами. Так, методом електрофорезу запасних білків в українській колекції сортів пшениці м'якої було виявлено сім різних алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом, коли у світовій колекції представлено 19 алельних варіантів гліадинів. Більш поліморфною світова колекція була і за результатами ПЛР-аналізу, на основі якого усі сорти було розділено на три групи та 13 підгруп.

Результати ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-B1* локусу, розробленими Zhang et al. (2003) дозволили розділити усі досліджувані сорти на три групи: сорти, що характеризуються *Gli-B1.1* алелем, сорти (група I), що характеризуються *Gli-B1.2* алелем (група II) та сорти із 1RS/1BL транслокацією (група III). До групи I було віднесено 21 сорт пшениці м'якої із світової та 52 сорти із сучасної української колекцій, до групи II – 30 і 13 сортів, відповідно. Групу III склали два сорти із світової колекції та 23 сорти із сучасної української колекції, у яких відсутні фрагменти ампліфікації із даними праймерами через наявність 1RS/1BL транслокації.

Фрагменти ампліфікації *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2* алелів відрізнялися за довжиною, оскільки всередині послідовності, що ампліфікується знаходиться мікросателіт (Devos et al., 1995), на основі чого вперше було описано чотири алелі мікросателіту, що виявляються в ПЛР з праймерами до *Gli-B1.1* алеля та вісім алелів, що виявляються в ПЛР з праймерами до *Gli-B1.2* алеля. Застосування пари праймерів до мікросателіту *Taglgap*, дозволило виявити 12

алелів у світовій та українській колекціях сортів пшениці м'якої, що стало основою для виділення 13 підгруп.

Підгрупа 1 об'єднує чотири сорти світової колекції, що характеризуються *Gli-B1.1* алелем з фрагментами ампліфікації 373 п.н. та алелем мікросателіту *Taglgap* 213 п.н. та *Gli-B1b* алельним варіантом гліадинів.

Підгрупа 2 об'єднує сорти із *Gli-B1.1* алелем з розміром фрагментів ампліфікації 376 п.н. та алелем *Taglgap* розміром 216 п.н. До якої входять 52 сорти української та 4 сорти світової колекції із *Gli-B1b* алельним варіантом та три сорти світової колекції із *Gli-B1n*, *Gli-B1q* та *Gli-B1s* алельними варіантами.

До підгрупи 3 було віднесено десять сортів пшениці м'якої світової колекції та одна майже-ізогенна лінія, що характеризувалися фрагментами ампліфікації *Gli-B1.1* алеля довжиною 406 п.н. та алелем *Taglgap* 246 п.н. Сорти цієї підгрупи характеризувалися наступними алельними варіантами гліадинів: *Gli-B1i*, *Gli-B1j*, *Gli-B1k*, *Gli-B1m*, *Gli-B1o*, *Gli-B1p*, *Gli-B1r*. Електрофореграми перелічених алельних варіантів гліадинів, мають однаковий γ -гліадин, і розрізняються набором ω -гліадинів, що, імовірно, і є причиною виявлення однакових алелів у ПЛР.

Підгрупа 4 налічує 14 сортів світової та вісім сортів української колекції пшениці м'якої, що характеризуються *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 397 п.н. та алелем *Taglgap* 237 п.н. Сорти цієї підгрупи мають наступні алельні варіанти гліадинів: *Gli-B1c*, *Gli-B1e*, *Gli-B1f*, та *Gli-B1g*.

Підгрупа 5, представлена сортом *Krasnodonka* світової колекції, що має *Gli-B1h* алельний варіант, *Gli-B1.2* алель із фрагментами ампліфікації 403 п.н. та алелем *Taglgap* 243 п.н.

Підгрупи 6 та 7, які за результатами ПЛР розрізнялися довжиною фрагментів ампліфікації (401 п.н. та 402 п.н., відповідно), за результатами секвенування можна об'єднати в одну, яка характеризується *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 409 п.н. та алелем *Taglgap* 249 п.н., до цієї

підгрупи належать 5 сортів світової та один сорт української колекції із Gli-B1h алельним варіантом гліадинів.

Підгрупа 8 об'єднує десять сортів світової колекції та п'ять української, що характеризуються *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 430 п.н. та алелем *Taglgap* 270 п.н., усі – мають Gli-B1d алельний варіант гліадинів.

Підгрупа 9 представлена лише одним сортом – Chinese-Spring, які характеризуються *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 445 п.н., алелем *Taglgap* 285 п.н. та Gli-B1a алельним варіантом гліадинів.

Підгрупа 10 об'єднує 26 сортів, 23 з яких – українські, що характеризуються нуль алелями та Gli-B1l алельним варіантом гліадинів.

Підгрупа 11 представлена одним українським сортом – Любава, із *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 424 п.н., алелем *Taglgap* 264 п.н. та Gli-B1d алельним варіантом гліадинів.

Підгрупа 12 представлена також одним сортом – Girka, із *Gli-B1.2* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 400 п.н., алелем *Taglgap* 240 п.н. з неустановленим алельним варіантом гліадинів.

Підгрупа 13 також налічує один сорт – Ladoga, із *Gli-B1.1* алелем з фрагментами ампліфікації довжиною 409 п.н., алелем *Taglgap* 249 п.н.

Установлена нами відповідність між «Алель за алель-специфічною ПЛР (SNP алель) – алель *Taglgap* – алельний варіант гліадинів» демонструє потенціал застосування методу ПЛР з алель-специфічними праймерами та праймерами до мікросателіту *Taglgap* для ідентифікації алельних варіантів гліадинів, таких як Gli-B1a, Gli-B1b (з високою імовірністю), Gli-B1d, Gli-B1h.

Поліморфізм *Gli-1* локусів, з використанням праймерів Zhang et al. (2003), досліджувався також у роботі Поліщук та ін. (2010), на невеликій вибірці сортів. Відповідність *Gli-B1.1/Gli-B1.2* алель – алельний варіант гліадинів, описана у Поліщук та ін. (2010), співпадає із нашими результатами, крім сортів із Gli-B1d алельним варіантом гліадинів, у зв'язку з чим, для підтвердження наших результатів у дослідженні використовувалися деякі сорти і лінії із роботи

Поліщук та ін. (2010). Результати, отримані для цих сортів, підтвердили отриману нами відповідність: «Gli-B1.2 алель – Gli-B1d алельний варіант гліадинів».

Для *Gli-A1* локусу, методом електрофорезу в кислому ПААГ, в українській вибірці сортів пшениці м'кої виявлено вісім алельних варіантів гліадинів, а світова у світовій колекції представлено 12 різних алельних варіантів.

Для аналізу генетичного поліморфізму *Gli-A1* локусу було застосовано дві пари алель-специфічних праймерів, розроблених Zhang et al. (2003) до алелів, що визначаються SNP: *Gli-A1.1* (гуанін) та *Gli-A1.2* (аденін). На відміну від аналогічних праймерів до *Gli-B1* локусу, фрагменти ампліфікації *Gli-A1.1* та *Gli-A1.2* алелів були однакової довжини, що вказана розробниками – 168 п.н.

Загалом, у 70 сортів української колекції та 46 сортів світової колекції, у ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу було виявлено *Gli-A1.1* алель. *Gli-A1.2* алелем характеризувалися лише чотирнадцять сортів пшениці м'якої української колекції та 16 сортів світової колекції

Із отриманих результатів по *Gli-A1* локусу, видно, що між алелями *Gli-A1.1/Gli-A1.2* та алельними варіантами гліадинів існує відповідність: сорти з *Gli-A1.2* алелем характеризуються Gli-A1o, Gli-A1r або Gli-A1x алельними варіантами гліадинів, а сорти з *Gli-A1.1* алелем мають Gli-A1a, Gli-A1ab, Gli-A1af, Gli-A1b, Gli-A1c, Gli-A1f, Gli-A1g та Gli-A1l алельні варіанти гліадинів.

В результаті біоінформаційного аналізу, виявлено мікросателіт, що є частиною кодуєчої послідовності гена *Gamma gliadin-A1*, до якого були розроблені пара праймерів MsA1. Застосування цієї пари праймерів для аналізу української та світової колекції дозволило виявити вісім різних алелів, які відповідають алельним варіантам гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом. Сорти пшениці м'якої, які характеризувалися алельними варіантами гліадинів Gli-A1o, Gli-A1m із праймерами MsA1 характеризувалися алелями 228 п.н., 222 п.н. відповідно. У сортів з Gli-A1x алельним варіантом було виявлено два фрагменти ампліфікації: 186 п.н. та 159 п.н., а з Gli-A1r – нуль-алель. Сорти із

алельними варіантами гліадинів *Gli-A1a*, *Gli-A1l* відрізнялися від інших сортів наявністю фрагментів ампліфікації 171 п.н., сорти із *Gli-A1b*, *Gli-A1ab*, *Gli-A1c* характеризувалися алелем 165 п.н., сорти із *Gli-A1g*, *Gli-A1f* алелем 153 п.н., а сорти із *Gli-A1af* – 156 п.н.

Розроблені праймери *MsA1* виявилися досить інформативними і дозволяють визначити ряд алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом використовуючи метод ПЛР. Проте, їх недоліком є наявність у всіх зразків фрагментів ампліфікації 135 п.н., що ампліфікуються із *Gli-B1* локусу, хоч це можна використати в якості внутрішнього контролю, у випадках нуль-алелів по *Gli-A1* локусу. Ампліфікація даної ділянки забирає ресурс реакції, чим ускладнює ампліфікацію поліморфних фрагментів із *Gli-A1* локусу.

У зв'язку з цим було розроблено та протестовано методом *in silico* ПЛР додаткові пари праймерів, які є більш специфічними. Із десяти пар праймерів, найбільш вдалою вважаємо пару F: GCCACGAAGTGATTGCAAGG; R: AACACGTTGCACATGGTTGG, оскільки за результатами *in silico* ПЛР вона була специфічною та поліморфною для нуклеотидних послідовностей виду *T. aestivum* L., та має декілька некомплементарних нуклеотидів до аналогічних послідовностей *Gli-A1* та *Gli-B1* локусів. Теоретичні продукти ампліфікації становили 279-297 п.н.

Найменш поліморфним локусом виявився *Gli-D1*. Всього п'ять різних алельних варіантів представлено в українській колекції та сім – у світовій колекції. Для аналізу генетичного поліморфізму *Gli-D1* локусу також використовували дві пари алель-специфічних праймерів, розроблених Zhang et al. (2003) до алелів, що визначаються SNP: *Gli-D1.1* (тимін) та *Gli-D1.2* (цитозин). Пари праймерів, що використовувалися для ідентифікації *Gli-D1.1/Gli-D1.2* алелів мали однаковий прямий праймер та різні зворотні. Поліморфізму за довжиною фрагментів ампліфікації *Gli-D1.1* та *Gli-D1.2* алелів не виявлено. Продукти ампліфікації *Gli-D1.1* алеля становили 264 п.н., а *Gli-D1.2* алеля – 270 п.н., що і було вказано розробниками праймерів Zhang et al. (2003).

За результатами ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1* локусу у вибірці сучасних українських сортів пшениці м'якої у 70% сортів виявлено *Gli-D1.2* алель (54 сорти), *Gli-D1.1* алель було знайдено у 30% сортів (22 сорти), на відміну від світової колекції, у якій *Gli-D1.1* алель був знайдений у 31 сорту, що становило 62% *Gli-D1.2* алель було виявлено у 15-ти сортів (38%).

У порівнянні із результатами по *Gli-A1* та *Gli-B1* локусах, значна кількість сортів за *Gli-D1* локусом була гетерогенною, або ж позитивною за двома алелями (*Gli-D1.1* та *Gli-D1.2*) одночасно у всіх досліджених зернівках, імовірно через наявність декількох копій ділянки послідовності, що ампліфікується. Використання більш специфічної HotStart ДНК-полімерази, у більшості випадків, дозволило лише значно знизити ефективність реакції з праймерами до одного з алелів, що ускладнювало аналіз результатів.

Відповідність між алелями, які визначаються в ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-D1* локусу не встановлена. Із усіх сортів із Gli-D1b алельним варіантом гліадинів, у більшості – 44 сортів виявлено *Gli-D1.2* алель, а в 11-ти присутній *Gli-D1.1* алель. Аналогічна ситуація спостерігалася і для Gli-D1g (8 сортів із *Gli-D1.1* та 8 сортів із *Gli-D1.2* алелем), Gli-D1j (7 сортів із *Gli-D1.1* та 11 сортів із *Gli-D1.2* алелем) (табл. 5.4). Також один сорт із світової колекції, що характеризувався Gli-D1d алельними варіантом мав *Gli-D1.1* алель, а у двох українських сортів із цим же алельним варіантом виявлено *Gli-D1.2* алель. Для алельних варіантів гліадинів, які зустрічалися лише у світовій колекції, також відповідність не встановлена.

Поширення алельних варіантів гліадинів та їх частота в українських сортів обговорюються у роботах Н. О. Козуб і співавторів (Kozub et al., 2020; Козуб, 2021). Алельні варіанти гліадинів, а також частоти алелів описані у цих публікаціях для більшості сортів української вибірки, що досліджувалася, співпадають із отриманими у даній роботі результатами. Найбільш поширеними у колекції сучасних українських сортів та лінії пшениці м'якої для *Gli-B1* локусу є Gli-B1b та Gli-B1l, що відповідає даним Kozub et al. (2020).

За даними Н. О. Козуб, найбільш поширеними алельними варіантами, що кодуються *Gli-A1* локусом, в Україні є *Gli-A1f*, *Gli-A1b* та *Gli-A1o* (Kozub et al., 2009), проте у нашому дослідженні, найбільшу частоту мали *Gli-A1b*, *Gli-A1g* та *Gli-A1c*. Щодо, *Gli-D1* локусу, то у нашій вибірці найчастіше зустрічався *Gli-D1b* алельний варіант гліадинів, а у досліджених Kozub et al. (2020) вибірках сортів – *Gli-D1g* (який в українській колекції, дослідженій нами є третім за частотою) що, імовірно, спричинене різними вибірками.

Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей γ -гліадинових генів та *in silico* ПЛР показали наявність двох копій послідовності, що ампліфікується із застосуванням алель-специфічних праймерів до *Gli-A1* локусу у великих нуклеотидних послідовностях MG560140.1 (5 335 195 п.н.), що належить сорту Chinese Spring та EF426565.1 (157 918 п.н.).

У 65 нуклеотидних послідовностях гліадинових генів, що становить 56% із вибірки, створеної для аналізу *Gli-A1* локусу, виявлено *Gli-A1.1* алель, *Gli-A1.2* алель, знайдено у 50 послідовностях, що становлять 44%. Крім виду *Triticum aestivum* L., послідовність, що фланкується алель-специфічними праймерами до *Gli-A1* локусу, присутня у γ -гліадинових генах ще у шести видів, серед яких *T. turgidum*, *Taeniatherum caput-medusae*, *Australopyrum retrofractum*, *T. monococcum subsp. monococcum*, *T. monococcum subsp. aegilopoides* та *T. urartu*.

У результаті біоінформаційного аналізу *Gli-B1* локусу, із 97 нуклеотидних послідовностей лише у трьох було знайдено ділянку, комплементарну праймерам до алелів *Gli-B1.1* та *Gli-B1.2*, та 16 до праймерів *Taglgap*. Проте у всіх шістнадцяти послідовностей можна було визначити SNP алель, оскільки у цих послідовностей присутня нуклеотидна послідовність, що відповідає прямому праймеру пар *Gli-B1.1* / *Gli-B1.2*.

Зайдено три нуклеотидні послідовності, що належать виду *T. aestivum* L. із алелями *Taglgap* 237 п.н. (сорт Forno), 270 п.н. (сорт Катерва) та 285 п.н. (Chinese Spring), що підтверджено ще й у лабораторних дослідженнях даної роботи. Ще три послідовності належали виду *T. durum* із алелями *Taglgap* 249 п.н. та *Taglgap*

222 п.н. Алель *Taglgap* 249 п.н. виявлений нами також і під час лабораторного експерименту у сорту пшениці м'якої Ardec. А також нуклеотидні послідовності видів *T. diccoccum* (231 п.н. та 243 п.н., відповідно) та *T. diccoccoides* (*Taglgap* 255 п.н. та 279 п.н., відповідно), *Triticum timophevii* (*Taglgap* 237 п.н. та 234 п.н.) та *Triticum spelta* (*Taglgap* 243 п.н.). Наявність спільних алельних варіантів гліадинів таких, як Gli-B1h, Gli-B1g, Gli-B1x для гексаплоїдних та тетраплоїдних видів, зокрема *T. spelta*, *T. diccoccum*, була описана й у роботі Н. О. Козуб (2021).

В результаті біоінформаційного аналізу *Gli-D1* локусу, знайдено 67 нуклеотидних послідовностей, що належать пшениці м'якій, у 65 із яких виявлено *Gli-D1.1*, та лише у двох – *Gli-D1.2* алель. Частоти алелів *Gli-D1* локусу, для пшениці м'якої, знайдені у вибірці V-Gli-D1.1/2 становили 0,97 для *Gli-D1.1* алеля та 0,03 для *Gli-D1.2* алеля, що значно відрізнялися від частот, отриманих у лабораторному експерименті на світовій (частота *Gli-D1.1* алеля 0,65; *Gli-D1.2* алеля – 0,33) та українській вибірках сортів (частота *Gli-D1.1* алеля 0,30; *Gli-D1.2* алеля – 0,70).

Крім цього, *in silico* ПЛР показала можливість застосування даних праймерів і для деяких інших, близьких до пшениці м'якої видів таких, як *T. taushii* та *Ae. speltoides*.

Аналізуючи поліморфізм, виявлений із застосуванням у ПЛР алель-специфічних праймерів та праймерів до мікросателітів (*Taglgap* та *MsA1*) більш поліморфними молекулярними маркерами є мікросателіти. Наші дослідження показали, що мікросателіти можуть застосовуватися для ідентифікації гліадинів, які багаті на пролін і глутамін, кодони яких повторюються багато разів у гліадинових генах та псевдогенах. Тому важливими для створення молекулярних маркерів для ідентифікації гліадинових генів є вивчення саме поліглутамінових та повторювальних доменів гліадинів, які в більшій мірі і визначають їх різноманітність.

ВИСНОВКИ

За результатами молекулярно-генетичного аналізу встановлено алельний стан *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів для 91 сорту сучасної української колекції та 64 сортів світової колекції сортів пшениці м'якої. В ході біоінформаційного аналізу та *in silico* ПЛР проаналізовано нуклеотидні послідовності гліадинових генів із бази даних GeneBank, показано можливість застосування алель-специфічних прайменів, що використовувалися у даній роботі для аналізу поліморфізму деяких інших видів злаків, розроблено нову пару праймерів до мікросателіту у *Gli-A1* локусі.

1. За результатами ПЛР з алель-специфічними праймерами, розробленими Zhang et al. (2003), у вибірці із сучасних українських сортів переважав алель *Gli-A1* локусу – *Gli-A1.1* з частотою 0,82, алель *Gli-D1* локусу – *Gli-D1.2* з частотою 0,70 та *Gli-B1.1* алель, з фрагментами ампліфікації 376 п.н. з частотою 0,58. У світовій вибірці переважали алелі *Gli-A1.1* (частота 0,72), *Gli-D1.1* (частота 0,62) та *Gli-B1.2* алель, з фрагментами ампліфікації 430 п.н. Крім цього, для української вибірки виявлено сім алелів мікросателіту *Taglgap*, у світовій вибірці описано 1 алелів, дванадцять найчастіше зустрічалися 216 п.н. та 270 п.н., відповідно.
2. За результатами електрофорезу в кислому ПААГ, у вибірці сучасних українських сортів виявлено дев'ять, сім та п'ять алельних варіантів гліадинів, що кодуються *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусами, а для світової колекції сортів – дев'ятнадцять, одинадцять та сім алельних варіантів гліадинів, відповідно. Найчастіше в світовій колекції зустрічалися *Gli-A1a*, *Gli-B1d* та *Gli-D1b* алельні варіанти гліадинів, а в українській колекції – *Gli-A1b*, *Gli-B1b* та *Gli-D1b*.
3. Установлена відповідність між алельними варіантами гліадинів та алелями, що визначаються алель-специфічними праймерами до *Gli-*

A1 та *Gli-B1* локусів, і алелями мікросателіту *Taglgap*, що дозволяє використовувати дані праймери для ідентифікації алельних варіантів гліадинів методом ПЛР. Аналогічна відповідність для *Gli-D1* не виявлена.

4. У вибірці сортів із СГІ-НЦНС, найчастіше зустрічалися алельні варіанти *Gli-A1b*, *Gli-B1b*, *Gli-B1g*; із МІП *Gli-A1x*, *Gli-B1l*, *Gli-B1b*; із БЦДС *Gli-A1b*, *Gli-B1b*, *Gli-B1j*; із ІЗЗ та ПДАА *Gli-A1b*, *Gli-B1b*, *Gli-B1b*; із НСДС *Gli-A1b*, *Gli-B1l*, *Gli-B1g*. У всіх селекційних центрах переважали *Gli-A1.1* та *Gli-D1.2* алелі. За *Gli-B1* локусом у МІП та НСДС переважав null алель, а у всіх інших – *Gli-B1.1*, з фрагментами ампліфікації 376 п.н. та *Taglgap* 216 п.н.
5. Біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей γ -гліадинових генів та *in silico* ПЛР показали наявність двох копій послідовності, що ампліфікується із застосуванням алель-специфічних праймерів до *Gli-A1* локусу. У 56% нуклеотидних послідовностей, виявлено *Gli-A1.1* алель, у 44% – *Gli-A1.2*, *Gli-D1.1* алель у 97% та у 3% *Gli-D1.2* алель. Знайдено десять алелів локусу *Taglgap*. Нуклеотидні послідовності, що відповідають фрагментам ампліфікації із праймерами, використаними у даному дослідженні знайдені також у ряді інших видів злаків, що свідчить про можливість застосування їх для цих видів.
6. *In silico* ПЛР протестовано більше 20 пар праймерів, розроблених до гліадинових генів, знайдено поліморфну ділянку гена *Gamma-gliadin-A1*, до якої розроблені праймери MsA1. Застосування розроблених праймерів дозволило виявити вісім алелів у світовій та українській вибірках пшениці м'якої та показано відповідність цих алелів алельним варіантам гліадинів, що кодуються *Gli-A1* локусом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Adhikari L., Raupp J., Wu Sh., Wilson D., Evers B., Koo D-H., Singh N., Friebe B., Poland J. Genetic characterization and curation of diploid A-genome wheat species. *Plant Physiology*. 2022. Vol. 188. № 4. P. 2101-2114.
2. Allard R. W. Genetic basis of the evolution of adaptedness in plants. *Euphytica*. 1996. Vol. 92. P. 1–11.
3. Altenbach S. B., Kothari K. M. Omega gliadin genes expressed in *Triticum aestivum* cv. Butte 86: Effects of post-anthesis fertilizer on transcript accumulation during grain development. *Cereal Science*. 2007. Vol. 47, №2. P. 169–177.
4. Altenbach S. B., Tanaka C. K., Seabourn B. W. Silencing of omega-5 gliadins in transgenic wheat eliminates a major source of environmental variability and improves dough mixing properties of flour. *BMC Plant Biol*. 2014. Vol. 14. P. 393.
5. Anderson O. D., Greene F. C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet*. 1989. Vol. 77. P. 689–700.
6. Anderson O. D., Dong L., Huo N., Gu Y. Q. A new class of wheat gliadin genes and proteins. *PLoS One*. 2012. Vol. 7. P. e52139.
7. Anderson O. D., Greene F. C. The α -gliadin gene family: DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes. *Theor. Appl. Genet*. 1997. Vol. 95. P. 59–65.
8. Anderson O. D., Gu Y. Q., Kong X., Lazo G. R., Wu J. The wheat ω -gliadin genes: structure and EST analysis. *Funct Integr Genomics*. 2009. Vol. 9, №3. P. 397–410.
9. Anderson O. D., Huo N., Gu Y. Q. The gene space in wheat: the complete γ -gliadin gene family from the wheat cultivar Chinese Spring. *Funct Integr Genomics*. 2013. Vol. 13. P. 261–273.

10. Arentz-Hansen E. H., McAdam S. N., Molberg O., Kristiansen C., Sollid L. M. Production of a panel of recombinant gliadins for the characterisation of T cell reactivity in coeliac disease. *Gut*. 2000. Vol. 46. P. 46–51.
11. Arentz-Hansen H., McAdam S. N., Molberg O., Fleckenstein B., Lundin K. E. A., Jorgensen T. J. D., Jung G., Roepstorff P., Sollid L. M. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*. 2002. Vol. 123. P. 803–809.
12. Becker D., Wieser H., Koehler P., Folck A., Muhling K. H. Zorb C. Protein composition and techno-functional properties of transgenic wheat with reduced α -gliadin content obtained by RNA interference. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 2012. Vol. 85. P. 23–33.
13. Bekes F., Wrigley C. Gluten Alleles and Predicted Dough Quality for Wheat Varieties Worldwide: A Great Resource-Free on the AACC International Website. *Cereal Foods World*. 2013. Vol. 58. P. 325–328.
14. Blanch E. W., Kasarda D. D., Hecht L., Nielsen K., Barron L. D. New insight into the solution structures of wheat gluten proteins from Raman optical activity. *Biochemistry*. 2003. Vol. 42. P. 5665–5673.
15. Brenchley R., Spannagl M., Pfeifer M. et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*. 2012. Vol. 491. P. 705–710.
16. Bushuk W., Zillman R. R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Canadian Journal of Plant Science*. 1978. Vol. 58. P. 505–515.
17. Camerlengo F., Sestili F., Silvestri M., Colaprico G., Margiotta B., Ruggeri R., Lupi R., Masci S., Lafiandra D. Production and molecular characterization of bread wheat lines with reduced amount of α -type gliadins. *BMC Plant Biol.* 2017. Vol. 17. P. 248.
18. Cassidy B. G., Dvorak J., Anderson O. D. The wheat low-molecular-weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. *Theor. Appl. Genet.* 1998. Vol. 96. P. 743–750.

19. Catassi C., Gatti S., Fasano A. The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014. Vol. 59. P. S7-9.
20. Chen Q., Yang C., Zhang Z., Wang Z., Chen Y., Rossi V., Chen W., Xin M., Su Z., Du J., Guo W., Hu Z., Liu J., Peng H., Ni Z., Sun Q., Yao Y. Unprocessed wheat γ -gliadin reduces gluten accumulation associated with the endoplasmic reticulum stress and elevated cell death. *New Phytol.* 2022. Vol. 236. P. 146–164.
21. Cho S. W., Kang C. S., Ko H. S., Baik B. K., Cho K. M., Park C. S. Influence of protein characteristics and the proportion of gluten on end-use quality in Korean wheat cultivars. *Journal of Integrative Agriculture.* 2018. Vol. 17. pp. 1706–1719.
22. Choulet F., Wicker T., Rustenholz C. Paux E., Salse J., Leroy P., Schlub S., Le Paslier M.-C., Madelenat G., Gonthier C., Couloux A., Budak H., Breen J., Pumphrey M., Liu S., Kong X., Jia J., Gut M., Brunel D., Anderson J., Gill B. S., Appels R., Keller B., Feuillet C. Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *Plant Cell.* 2010. Vol. 22. P. 1686–1701.
23. Cinova J., Palova-Jelinkova L., Smythies L. Gliadin peptides activate blood monocytes from patient with celiac disease. *J. Clin. Immunol.* 2007. Vol. 27. P. 201–209.
24. Clayton W. D., Vorontsova M. S., Harman K. T., Williamson H. GrassBase - The Online World Grass Flora. 2006. <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>.
25. Devos K. M., Bryan G. J., Collins A. J., Stephenson P., Gale M. D. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995. Vol. 90. P. 247–252.
26. Dong L., Nuo N., Wang Y., Wang D., Hu T., Dvorak J., Anderson O. D., Luo M.-C., Gu Y. Q. Rapid evolutionary dynamics in a 2.8-Mb chromosomal region containing multiple prolamins and resistance gene families in *Aegilops tauschii*. *The plant journal.* 2016. Vol. 87, № 5. P. 495-506.

27. Dong Z., Yang Y., Li Y., Zhang K., Lou H., An X., Dong L., Gu Y. Q., Anderson O. D., Liu X., Qin H., Wang D. (2013) Haplotype Variation of *Glu-D1* Locus and the Origin of *Glu-D1d* Allele Conferring Superior End-Use Qualities in Common Wheat. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, № 9. P. e74859.
28. Doyle, J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 1990. Vol. 12. P. 13–15.
29. DuPont F. M., Vensel W., Encarnacao T., Chan R., Kasarda D. D. Similarities of omega gliadins from *Triticum urartu* to those encoded on chromosome 1A of hexaploid wheat and evidence for their post-translational processing. *Theor Appl Genet*. 2004. Vol.108, №7. P. 1299–1308.
30. Dupont F., Vensel W., Tanaka Ch., Hurkman W., Altenbach S. Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectroscopy. *Proteome science*. 2011. Vol. 9. P. 10.
31. FAOSTAT Statistical Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), 2020. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
32. Felix I., Martinant J. P., Bernard M., Bernard S., Branlard G. Genetic characterization of storage proteins in a set of F1-derived haploid lines in bread wheat. *Theor Appl Genet*. 1996. Vol. 92. P. 340–346.
33. Ferrante P., Masci S., D'Ovidio R., Lafiandra D., Volpi C., Mattei B. A proteomic approach to verify in vivo expression of a novel γ -gliadin containing an extra cysteine residue. *Proteomic*. 2006. Vol. 6, №6. P. 1908–1914.
34. Fullington J. G., Cole E. W., Kasarda D. D. Quantitative SDS-PAGE of total protein from different wheat varieties. *J. Sci. Prod. Agric*. 1980. Vol. 316. P. 31–38.
35. Galili G., Amir R. Fortifying plants with the essential amino acids lysine and methionine to improve nutritional quality. *Plant Biotechnol. J*. 2013. Vol. 11. P. 211–222.

36. Galili G., Levy A. A., Feldman M. Gene-dosage compensation of endosperm proteins in hexaploid wheat *Triticum aestivum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986. Vol. 83. P. 6524–6528.
37. Gao S., Gu Y. Q., Wu J., Coleman-Derr D., Huo N., Crossman C., Jia J., Zuo Q., Ren Z., Anderson O. D., Kong X. Rapid evolution and complex structural organization in genomic regions harboring multiple prolamin genes in the polyploid wheat genome. *Plant Mol Biol*. 2007. Vol. 65. P. 189–203.
38. Gautier M. F., Cosson P., Guirao A., Alary R., Joudrier P. Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid triticum species. *Plant Science*. 2000. Vol. 153. P. 81–91.
39. Gholamian F., Etminan A., Changizi M., Khaghani Sh., Gomarian M. Assessment of genetic diversity in *Triticum urartu* Thumanjan ex Gandilyan accessions using start codon targeted polymorphism (SCoT) and CAAT-box derived polymorphism (CBDP) markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2019. Vol. 33. P. 1653-1662.
40. Gianibelli M. C., Larroque O. R., MacRitchie F., Wrigley C. W. Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chem*. 2001. Vol. 78. P. 635–646.
41. Gil-Humanes J., Pistón F., Altamirano-Fortoul R., Real A., Comino I., Sousa C., Rosell C. M., Barro F. Reduced-gliadin wheat bread: an alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. *PLoS One*. 2014. Vol. 9. P. e90898.
42. Gil-Humanes J., Piston F., Barro F., Rosell C. M. The shutdown of celiac disease-related gliadin epitopes in bread wheat by RNAi provides flours with increased stability and better tolerance to over-mixing. *PLoS One*. 2014. Vol. 9. P. e91931.
43. Gil-Humanes J., Piston F., Gimenez M. J., Martín A., Barro F. The introgression of RNAi silencing of γ -gliadins into commercial lines of bread

- wheat changes the mixing and technological properties of the dough. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, № 9. P. e45937.
44. Gil-Humanes J., Pistón F., Tollefsen S., Sollid L. M., Barro F. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Vol. 107. P. 17023–17028.
45. Gobaa S., Bancel E., Kleijer G., Stamp P., Branlard G. Effect of the 1BL.1RS translocation on the wheat endosperm, as revealed by proteomic analysis. *Proteomics*. 2007. Vol. 7. P. 4349–4357.
46. Goesaert H., Brijs K., Veraverbeke W. S., Courtin C.M., Gebruers K., Delcour, J.A. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends Food Sci. Tech.* 2005. Vol. 16. P. 12–30.
47. Gras P. W., Anderssen R. S., Keentok M., Bekes F., Appels R. Gluten protein functionality in wheat flour processing: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 2001. Vol. 52. 1311–1323.
48. Gu Y. Q., Crossman C., Kong X., Luo M., You F. M., Coleman-Derr D., Dubcovsky J., Anderson O. D. Genomic organization of the complex alpha-gliadin gene loci in wheat. *Theor Appl Genet.* 2004. Vol. 109. P. 648–657.
49. Hafeez A. N., Arora S., Ghosh S., Gilbert D., Bowden R. L., Wulff B. B. H. Creation and judicious application of a wheat resistance gene atlas. 2021. *Molecular Plant*. Vol. 14, №7. P. 1053–1070.
50. Haudry A., Cenci A., Ravel C., Bataillon T., Brunel D., Poncet C., Hochu I., Poirier S., Santoni S., Glemin S., David J. Grinding up wheat: a massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol. Biol. Evol.* 2007. Vol. 24. P. 1506–1517.
51. Hsia C. C., Anderson O. D. Isolation and characterization of wheat gliadin gene. *Theor. Appl. Genet.* 2001. Vol. 103. P. 37–44.

52. Huang L., Brooks S. A., Li W., Fellers J. P., Trick H. N., Gill B. S. Map-based cloning of leaf rust resistance gene Lr21 from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics*. 2003. Vol. 164. P. 655–664.
53. Hug N., Longman D., Cáceres J. F. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res*. 2016. Vol. 44. P. 1483–1495.
54. Huo N., Dong L., Zhang S., Wang Y., Zhu T., Mohr T., Altenbach S., Liu Z., Dvorak J., Anderson O. D., Luo M. C., Wang D., Gu Y. Q. New insights into structural organization and gene duplication in a 1.75-Mb genomic region harboring the α -gliadin gene family in *Aegilops tauschii*, the source wheat D genome. *Plant J*. 2017. Vol. 92. P. 571–583.
55. Huo N., Zhang Sh., Zhu T., Dong L., Wang Y., Mohr T., Hu T., Liu Zh., Dvorak J., Luo M.-Ch., Wang D., Lee J.-Y., Altenbach S., Gu Y. Q. Gene duplication and evolution dynamics in the homeologous regions harboring multiple prolamin and resistance gene families in hexaploid wheat. *Frontiers in Plant Science*. 2018. Vol. 9 P. 673.
56. Huo N., Zhu T., Altenbach S., Dong L., Wang Y., Mohr T., Liu Zh., Dvorak J., Luo M-Ch., Gu Y. Q. Dynamic Evolution of α -Gliadin Prolamin Gene Family in Homeologous Genomes of Hexaploid Wheat. *Sci Rep*. 2018. Vol. 8. P. 5181.
57. International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*. 2014. Vol. 18, №. 345. P. 1251788. doi: 10.1126/science.1251788.
58. Jouanin A., Schaart J. G., Boyd L. A., Cockram J., Leigh F. J., Bates R., Wallington E. J., Visser R. G. F., Smulders M. J. M. Outlook for coeliac disease patients: towards bread wheat with hypoimmunogenic gluten by gene editing of α - and γ -gliadin gene families. *BMC Plant Biol*. 2019. Vol. 19. P. 333.
59. Juhasz A., Bekes F., Wrigley C. W. Wheat proteins: Applied Food Protein Chemistry. / Ustunol Z. editor. USA: John Wiley & Sons, Ltd., 2015. P. 219–303.

60. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. IPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.* 2010. Vol. 121. P. 1419–1430.
61. Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y., Samuilova O., Konstantin I. Ivanov K. I. FastPCR: An in silico tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics.* 2017. Vol. 109. № 3–4. P. 312–319.
62. Kasarda D. D., Adalstein A. E., Laird N. F. γ -Gliadins with α -type structure coded on chromosome 6B of the wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Chinese spring: Proc. 3rd Int. workshop on gluten proteins. / Lásztity R., Békés F., editors. Singapore: World Scientific Publishing, 1987. P. 20–29.
63. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics.* 2019. Vol. 20. № 4. P. 1160–1166.
64. Katoh K., Standley D. M., A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics.* 2016. Vol. 32. № 13. P. 1933–1942.
65. Kawaura K., Mochida K., Ogihara Y. Expression profile of two storage-protein gene families in hexaploid wheat revealed by large-scale analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol.* 2005. Vol. 139. P. 1870–1880.
66. Kimura S., Higashino Y., Kitao Y., Masuda T., Urade R. Expression and characterization of protein disulfide isomerase family proteins in bread wheat. *BMC Plant Biol.* 2015. Vol. 15. P. 73.
67. Knorr V., Wieser H., Koehler P. Production of gluten-free beer by peptidase treatment. *Eur. Food Res. and Technol.* 2016. Vol. 242. P. 1129–1140.
68. Koning F., Gilissen L., Wijmenga C. Gluten: a two edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease. *Springer Semin. Immun.* 2005. Vol. 27. P. 217–232.
69. Kozub N. A., Sozinov I. A., Sobko T. A., Kolyuchii V. T., Kuptsov S. V., Sozinov A. A. Variation at storage protein loci in winter common wheat

- cultivars of the Central Foreststeppe of Ukraine. *Cytol. and Genet.* 2009. № 1. P. 69–77.
70. Kozub N. O., Sozinov I. O., Chaika V. M., Sozinova O. I., Janse L. A., Blume Ya. B. Changes in allele frequencies at storage protein loci of winter common wheat under climate change. *Cytol. Genet.*, 2020. Vol. 54. P. 305–317.
71. Kuraku S., Zmasek C. M., Nishimura O., Katoh K. Leaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. P. W22–8.
72. Kwok S., Kellogg D. E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J. J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 999–1005.
73. Li A. L., Geng S. F., Zhang L. Q., Liu, D. C., Mao, L. Making the bread: insights from newly synthesized allohexaploid wheat. *Mol. Plant.* 2015. Vol. 8. P. 847–859.
74. Li D., Jin H., Zhang K., Wang Zh., Wang F., Zhao Y., Huo N., Liu X., Gu Y., Wang D., Dong L. Analysis of the *Gli-D2* locus identifies a genetic target for simultaneously improving the breadmaking and health-related traits of common wheat. *Plant Journal.* 2018. Vol. 95. P. 414–426.
75. Lindfors K., Kaukinen K. Contribution of celiac disease autoantibodies to the disease process. *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2012. Vol. 8. P. 151–154.
76. Liu S., Chao S., Anderson J. A. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat. *Theor Appl Genet.* 2008. Vol. 118. P. 177–183.
77. Liu X., Feng Z., Liang D., Zhang M., Liu X., Hao M., Liu D., Ning S., Yuan Z., Jiang B., Chen X., Chen X., Zhang L. Development, identification, and characterization of blue-grained wheat-*Triticum boeoticum* substitution lines. *J Appl Genet.* 2020. Vol. 61, № 2. P. 169–177.
78. Ludvigsson J., Leffler D., Bai J. et al. The Oslo definition for celiac disease and related terms. *Gut.* 2013. Vol. 62. P. 43–52.

79. Ma W., Anderson O., Kuchel H., Bonnardeaux Y. Genomics of Quality Traits: Genetics and Genomics of the Triticeae. / Feuillet C., Muehlbauer G. J. editors. Springer Science + Business Media, 2009. P. 611–652.
80. Mäki M., Mustalahti K., Kokkonen J., Kulmala P., Haapalahti M., Karttunen T., Ilonen J., Laurila K., Dahlbom I., Hansson T., Höpfl P. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *New Engl J Med.* 2003. Vol. 348. P. 2517–2524.
81. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 p.
82. Matsuo H., Kohno K., Morita E. Molecular cloning, recombinant expression and IgE binding ω -5 gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS J.* 2005. Vol. 272. P. 4431–4438.
83. Metakovsky E. V. Wheat storage proteins: Genes, Inheritance, Variability, Mutations, Phylogeny, Seed production, Flour Quality. Germany: LAP Lambert Acad. Publishing, 2015. 320 pp.
84. Metakovsky E., Melnik V., Rodriguez-Quijano M., Upelniek V., Carrillo M. A catalog of gliadin alleles: Polymorphism of 20th-century common wheat germplasm. *The Crop Journal.* 2018. Vol. 6. P. 628–641.
85. Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *Genet. Breed.* 1991. Vol. 45. P. 325–344.
86. Metakovsky E.V. The value of gliadin biotypes in commercial cultivars of wheat: Gluten Proteins. / Bushuk W. Thachuk R. editors. AACC. St. Paul. P., 1990. P. 569–581.
87. Mitea C., Salentijn E. M. J., Van Veelen P., Goryunova S. V., Van der Meer I. M., Van den Broeck H. C., Mujico J. R., Montserrat V., Gilissen L. J., Drijfhout J. W., Dekking L., Koning F., Smulders M. J. A universal approach to eliminate antigenic properties of alpha-gliadin peptides in celiac disease. *PLoS One.* 2010. Vol. 5. P. e15637.

88. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1973. Vol. 70. P. 3321–3323.
89. Nieto-Taladriz M. T., Carillo J. M. Complexity of the *Gli-A3* locus in bread wheat. *Plant breeding*. 1996. Vol. 115, № 3. P. 192–194.
90. Noma S., Kawaura K., Hayakawa K., Abe C., Tsuge N., Ogihara Y. Comprehensive molecular characterization of the α/β -gliadin multigene family in hexaploid wheat. *Mol Genet Genomics*. 2016. Vol. 291. P. 65–77.
91. Okita T. W., Cheesbrough V., Reeves C. D. Evolution and heterogeneity of the α -/ β -type and γ -type gliadin DNA sequences. *J Biol Chem*. 1985. Vol. 260. P. 8203–8213.
92. Orsi A., Sparvoli F., Ceriotti. A Role of individual disulfide bonds in the structural maturation of a low molecular weight glutenin subunit. *J. Biol. Chem*. 2001. Vol. 59. P. 32322-32329.
93. Paris R. Petruzzino G. Savino M., De Simone V., Ficco D. B. M., Trono D. Genome-wide identification, characterization and expression pattern analysis of the γ -gliadin gene family in the durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivar Svevo. *Genes (Basel)*. 2021. Vol. 12, № 11. P. 1743.
94. Payne P.I., Holt L. M., Lawrence G. J. Low C. N. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm. *Plant Food Hum Nutr*. 1982. Vol. 31 P. 229–241.
95. Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., Berthelsen K. Phylogenetic relationships of triticum and aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006. Vol. 39. P. 70–82.
96. Pistón F., Gil-Humanes J., Rodríguez-Quijano M., Barro F. Down-regulating γ -gliadins in bread wheat leads to non-specific increases in other gluten proteins and has no major effect on dough gluten strength. *PLoS One*. 2011. Vol. 6. P. e24754.
97. Promega Technical Manual. USA: Gene Print. STR Systems, 1999. p. 52.

98. Qi P. F., Le, C. X., Wang Z., Liu Y. B., Chen Q., Wei Z. Z., Xu B. J., Wei Z. Y., Dai S. F., Wei Y. M., Zheng Y. L. The γ -gliadin-like γ -prolamin genes in the tribe *Triticeae*. *J Genet.* 2014. Vol. 93. P. 3541.
99. Qi P. F., Wei Y. M., Yue Y. W., Yan Z. H., Zheng Y. L. Biochemical and molecular characterization of gliadins. *Molecular biology.* 2006. Vol. 40. P. 713–723.
100. Qi P-F., Wei Y-M., Ouellet T., Chen Q., Tan X., Zheng Y-L. The γ -gliadin multigene family in common wheat (*Triticum aestivum*) and its closely related species. *BMC Genomics.* 2009. Vol. 10. P. 168.
101. Rewers M. Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease. *Gastroenterology.* 2005. Vol. 128. P. 47-51.
102. Röder M. S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998. Vol. 149, № 4. P. 2007–2023.
103. Rodriguez-Quitano M., Carillo J. M. Linkage map of prolamin loci *Gli-D4* and *Gli-D5* in hexaploid wheat. *Plant breeding.* 2006. Vol. 115, № 3. P. 189–191.
104. Salentijn E. M. J., Esselink D. G., Goryunova S. V., Van der Meer I. M., Gilissen L. J. W. J., Smulders M. J M. Quantitative and qualitative differences in celiac disease epitopes among durum wheat varieties identified through deep RNA-amplicon sequencing. *BMC Genomics.* 2013. Vol. 14. P. 905.
105. Salentijn E. M. J., Goryunova S. V., Bas N., van der Meer I. M., van den Broeck H. C., Bastien T., Gilissen L. J. W. J., Smulder M. J. M. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous *Gli-2* loci. *BMC Genomics.* 2009. Vol. 10. P. 48.
106. Schalk K., Lang C, Wieser H, Koehler P, Scherf K. A. Quantitation of the immunodominant 33-mer peptide from α -gliadin in wheat flours by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 45092.

107. Schoch C. L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.
108. Shan L., Marti T., Sollid L. M., Gray G. M., Khosla, C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J.* 2004. Vol. 383. P. 311–318.
109. Shan L., Molberg Ø., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G. M., Sollid L. M., Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 2002. Vol. 297, № 27. P. 2275–2279.
110. Shan L., Qiao S. W., Arentz-Hansen H., Molberg O., Gray G. M., Sollid L. M., Khosla C. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J. Proteome Res.* 2005. Vol. 4. P. 1732–1741.
111. Shewry P. R. D'Ovidio R., Lafiandra D., Jenkins J. A., Mills E. N. C., Békés F. Wheat grain proteins. *Wheat: chemistry and technology: 4th edn. AACCI international / ed. by Khan K. Minnesota, 2009. P. 223–298.*
112. Shewry P. R., Halford N. G., Lafiandra D. Genetics of wheat gluten proteins. *Adv. Genet.* 2003. Vol. 49. P.111–184.
113. Shewry P. R., Tatham A. S. Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. *Journal of Cereal Science.* 2016. Vol. 67. P.12–21.
114. Shewry P. S., Halford N. G., Lafiandra D. Genetics of wheat gluten proteins. *Advances in Genetics.* 2003. Vol. 49. P. 111–189.
115. Shewry P., Mifflin B., Kasarda D. The structural and evolutionary relationships of the prolamin storage proteins of barley, rye and wheat. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 1984. Vol. 304. P. 297–308.
116. Shewry P.R. Plant storage proteins. *Biol. Rev.* 1995. Vol. 70 P. 375–426.
117. Sjöström H., Lundin K. E. A., Molberg O., Korner R., McAdam S. N., Anthonsen D., Quarsten H., Norén O., Roepstorff P., Thorsby E., Sollid L. M. Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: General importance

- of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand. J. Immunol.* 1998. Vol. 48. P. 111–115.
118. Solari R. M., Favret E. A. Linkage of genes regulating the protein constitution of wheat endosperm. *Wheat Newsllett.* 1967. Vol. 14. P. 19.
119. Sollid L. M., Qiao S. W., Anderson, R. P., Gianfrani C, Koning F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics.* 2012. Vol. 64. P. 455-460.
120. Sozinov A. A., Poperelya F. A. Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding. *Ann. Technol. Agric.* 1980. Vol. 29. P. 229–245.
121. Spaenij-Dekking L., Kooy-Winkelaar Y., Van Veelen P., Drijfhout J. W., Jonker H., Van Soest L., Smulders M. J., Bosch D., Gilissen L. J., Koning F. Natural variation in toxicity of wheat: Potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. *Gastroenterology.* 2005. Vol. 129. P. 797–806.
122. Spielmeier W., Lagudah S. Homoeologous set of NBS-LRR genes located at leaf and stripe rust resistance loci on short arms of chromosome 1 of wheat. *Funct. Integr. Genomics.* 2003. Vol. 3. P. 86–90.
123. Stepniak D., Spaenij-Dekking L., Mitea C., Moester M., de Ru A., Baak-Pablo R., van Veelen P., Edens L., Koning F. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am. J. Physiol.* 2006. Vol. 291. P G621-G629.
124. Tatham A. S., Drake A. F., Shewry P. R. A conformational study of a glutamine-rich and proline-rich cereal seed protein, C-hordein. *Biochem J.* 1985. Vol. 226. P. 557–562.
125. Tatham A. S., Shewry P. R. The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *Cereal Science.* 2012. Vol. 55, №2. P. 79–99.
126. Tautz D., Trick M., Dover G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature.* 1986. Vol. 322. P. 652–656.

127. Thomas K., Sapone A., Fasano A., Vogel S. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in celiac disease. *J. Immunol.* 2006. Vol. 176. P. 2512–2521.
128. Tye-Din J. A., Stewart J. A., Dromey J. A., Beissbarth T., van Heel D. A., Tatham A., Henderson K., Mannering S. I., Gianfrani C., Jewell D. P., Hill A. V., McCluskey J., Rossjohn J., Andersson R. P. Comprehensive, quantitative mapping of T-cell epitopes in gluten in coeliac disease. *Sci. Trans. Med.* 2010. Vol. 2. P. 41–51.
129. Upelniek V. P., Novoselskaya A. Y., Sutka J. Galiba G., Metakovsky E. V. Genetic variation at storage protein-coding loci of common wheat (cv ‘Chinese Spring’) induced by nitrosoethylurea and by the cultivation of immature embryos in vitro. *Theoret. Appl. Genetics.* 1995. Vol. 90. P. 372–379.
130. Urade R., Sato N., Sugiyama M. Gliadins from wheat grain: an overview, from primary structure to nanostructures of aggregates. *Biophys Rev.* 2018. Vol. 10. P. 435–443.
131. Vader L. W., de Ru A., van der Wal Y., Kooy Y. M., Benckhuijsen W., Mearin M. L., Drijfhout J. W., van Veelen P., Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med.* 2002. Vol. 195. P. 643–649.
132. Vader W., Kooy Y., van Veelen P., de Ru A., Harris D., Benckhuijsen W., Pena S., Mearin L., Drijfhout J. W., Koning F. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology.* 2002. Vol. 122. P. 1729–1737.
133. Van den Broeck H. C., De Jong H. C., Salentijn E. M. J., Dekking L., Bosch D., Hamer R. J., Gilissen L. J., van der Meer I. M., Smulders M. J. Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding may have contributed to increased prevalence of celiac disease. *Theor Appl Genet.* 2010. Vol. 121. P. 1527–1539.

134. Van Herpen T. W. J. M., Goryunova S. V., Van der Schoot J., Mitreva M., Salentijn E. M. J., Vorst O., Schenk M. F., van Veelen P. A., Koning F., van Soest L. J., Vosman B., Bosch D., Hamer R. J., Gilissen L. J., Smulders M. J. Alpha-gliadin genes from the A, B and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC Genomics*. 2006. Vol. 7. P. 1.
135. Vensel W. H., Tanaka C. K., Altenbach S. B. Protein composition of wheat gluten polymer fractions determined by quantitative two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Proteome Sci*. 2014. Vol. 12. P. 8.
136. Vriezinga S. L., Schweizer J. J., Koning F., Mearin M. L. Coeliac disease and glutenrelated disorders in childhood. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015. Vol. 12. P. 527–536.
137. Wang D., Zhang K., Dong L., Dong Zh., Li Y., Hussain A., Zhai H. Molecular genetic and genomic analysis of wheat milling and end-use traits in China: Progress and perspectives. *The Crop Journal*. 2018. Vol. 6, №1. P. 68–81.
138. Wang D-W., Li D., Wang J., Zhao Y., Wang Zh., Yue G., Liu X., Huanju Q., Zhang K., Dong L., Wang D. Genome-wide analysis of complex wheat gliadins, the dominant carriers of celiac disease epitopes. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. P. 44609.
139. Wang L. H., Zhao X. L., He Z. H., Ma W., Appels R., Peña R. J., Xia X. C. Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit Glu-B3 genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum L.*). *Theor Appl Genet*. 2009. Vol. 118. P. 525–539.
140. Wang L., Li G., Peña R. J., Xia X., He Zh. Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for *Glu-A3* alleles in common wheat (*Triticum aestivum L.*). *Journal of Cereal Science*. 2010. Vol. 51, № 3. P. 305–312.

141. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007. Vol. 24 P. 115–119.
142. Woychik J.H., Boundly J.A., Dimler R.J. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. // *Arch. Biochem. And Biophys.* 1964. – V. 94. – № 2. – pp. 477-482.
143. Wrigley C. W., Shepherd K. W. Electrofocusing of grain proteins from wheat genotypes. *Ann N Y Acad Sci.* 1973. Vol. 209. P.154-162.
144. Yadav I. S., Singh N., Wu Sh., Raupp J., Wilson D. L., Rawat N., Gill B. S., Poland J., Tiwari V. K. Exploring genetic diversity of wild and related tetraploid wheat species *Triticum turgidum* and *Triticum timopheevii*. *Journal of Advanced Research.* 2023. Vol. 48. P. 47-60.
145. Zhang W., Gianibelli M. C., Rampling Ma L., Gale K. R. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ -gliadin alleles in *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics.* 2003. Vol. 107. P. 130-138.
146. Zhang Y., Luo G., Liu D., Wang D., Yang W., Sun J., Zhang A., Zhan K. Genome-, Transcriptome- and Proteome- Wide Analyses of the Gliadin Gene Families in *Triticum urartu*. *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10, №7. P. e0131559.
147. Zhou Zh., Geng Sh., Guan H., Liu C., Qin M., Li W., Shi X., Dai Z., Yao W., Lei Zh., Wu Zh., Hou J. Dissection of the Genetic Architecture for Quantities of Gliadins Fractions in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science.* 2022. Vol. 13. P. 826909. DOI=10.3389/fpls.2022.826909.
148. Zhou Zh., Liu C., Qin M., Li W., Hou J., Shi X., Dai Z., Yao W., Tian B., Lei Zh., Li Y., Wu Zh. Promoter DNA hypermethylation of *TaGli- γ -2.1* positively regulates gluten strength in bread wheat. *Journal of Advanced Research.* 2022. Vol. 36. P. 163-173.
149. Доброчаева Д. Н., Котов М. И., Прокудин Ю. Н., и др. Определитель высших растений Украины. К.: Наук. думка, 1987. С. 440.

150. Кириєнко А. В., Михайлик С. Ю., Антонюк М. З. Поліморфізм за генами *Glu* та *Gli* в інтрогресивних ліній м'якої пшениці, стабільних за ознаками морфології колоса. *Наукові записки. Біологія та екологія*. 2015. Т. 171. С. 17-24.
151. Козуб Н. О. Різноманітність та ефекти кластерів проламінових генів *Triticum aestivum L.* та споріднених видів : автореф. дис. докт. біол. наук : 03.00.22 : Київ, 2021. 47 с.
152. Копусь М. М. О естественной геногеографии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы. *Селекция и семеноводство*. 1994. Вып. 5. С. 9–14.
153. Поліщук А. М., Чеботар С. В., Благодарова О. М., Козуб Н. А., Созинов І. А., Сиволап Ю. М. Аналіз сортів та майже-ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою ПЛР з алель-специфічними праймерами до *Gli-1* та *Glu-3* локусів. *Цитол. і генет.* 2010. Т. 44, № 6. С. 22–31.
154. Попереля Ф.О. Три основні генетичні системи якості зерна. Зб. наук. пр. Селекц.-генет. Ін-ту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення. / ред. Соколов В. М. СГІ. Одеса, 1996. С. 117–133.
155. Рибалка О. І. Чи справді пшениця є деструктивним харчовим продуктом? *Фізіологія рослин і генетика*. 2017. Т. 49, № 3. С. 187–210.
156. Рибалка О. І., Моргун В. В., Благодарова Е. М., Починок В. М. Генетичний поліморфізм за складом алелів локусів *Gli/Glu* сортів озимої пшениці селекції Інституту фізіології рослин і генетики НААН України. *Фізіол. і біохім. культ. рослин*. 2012. Т. 44. С. 187–194.
157. Созинов А. А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
158. Созинов А. А., Попереля Ф. А. Полиморфизм проламинов и селекция. *Вестник с/х. науки*. 1979. Вып 10. С. 21–34.

159. Созинов А. А., Попереля Ф. А., Парфентьев М. Г. О наследовании некоторых фракций спирторастворимого белка при гибридизации пшениц. *Науч. техн. бюлл. ВСГИ*. 1970. Вып. 13. С. 4–38.
160. Чеботар С. В. Молекулярно-генетичний аналіз генофонду озимої м'якої пшениці України: автореф. дис. докт. біол. наук: 03.00.22 : Київ, 2009. 41 с.

ДОДАТОК А

Список опублікованих праць за темою дисертації

Статті

1. **Попович Ю. А.**, Благодарова О. М., Чеботар С. В. Поліморфізм мікросателітного локусу *Taglgap* та його зв'язок з алельними варіантами гліадинів пшениці м'якої. *Вісник ОНУ. Серія Біологія*. 2021. Т. 2, №49. С. 73-85. doi 10.18524/2077–1746.2021.2(49).246889 (Особистий внесок здобувача: планування і проведення експерименту, аналіз даних, написання статті).
2. **Popovych Yu. A.**, Blagodarova O. M., Chebotar S. V. Genetic variation of *Gli-B1* locus in Ukrainian bread wheat varieties and lines. *Biopolym. Cell*. 2021. Vol. 37, №5. P. 379-388. <https://doi.org/10.7124/bc.000a63>. (Особистий внесок здобувача: Особистий внесок здобувача: планування і проведення молекулярно-генетичного аналізу, аналіз даних, написання статті).
3. Metakovsky E., Pasqual L., Vaccino P., Rodrigues-Quijano M., **Popovych Yu.**, Chebotar S., Rogers W. Heteroalleles in common wheat: Multiple differences between allelic variants of the *Gli-B1* locus. *Int. J. of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. P. 1832. <https://doi.org/10.3390/ijms22041832>. (Особистий внесок здобувача: проведення частини експерименту –молекулярно-генетичний аналіз із застосуванням алель-специфічних праймерів, аналіз результатів та висновки по даній частині роботи).
4. **Popovych Yu.**, Chebotar S., Melnik V., Rodriguez-Quijano M., Pascual L., Rogers W. J., Metakovsky E. Congruity of the polymorphisms in the expressed and noncoding parts of the *Gli-B1* locus in common wheat. *Agronomy*. 2020. Vol.10, №10. P. 1510. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101510>. (Особистий внесок здобувача: проведення експерименту, аналіз даних, участь у написанні тексту статті).

а. Тези

5. **Popovych Yu. A.**, Blagodarova O. M. Chebotar S. V. Correspondence between alleles of *Gli-1* loci and the allelic variants of gliadins of *Triticum aestivum* L. Book of Abstracts of the Eucarpia Cereals Section Conf. Seged (Hungary), 15-20 May 2023, pp. 118.
6. **Popovych Yu. A.**, Blagodarova O.M., Chebotar S.V. Bioinformatic analysis of nucleotide sequences of *Gli-1* loci of *Triticum aestivum* L. *Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія.* 2022. Т. 27, Вип. 2. С. 111-112.
7. **Попович Ю. А.**, Благодарова О.М., Чеботар С.В. Поліморфізм *Gli-1* локусів у сортів пшениці м'якої, походженням із провідних селекційних центрів України. Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин: тези доповідей Міжнародної наукової конференції. СГІ–НЦНС. м. Одеса (Україна). 26 жовтня 2022. С. 100-101.
8. **Popovych Yu. A.**, Blagodarova O.M., Chebotar S.V. Association between allelic variants of *Gli-B1* locus and polymorphism of microsatellite locus *Taglgap* in bread wheat varieties. *Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія.* 2021. Т. 2, Вип. 49. С. 127-128.
9. **Попович Ю. А.**, Благодарова О.М., Чеботар С.В. Оцінка генетичної різноманітності *Gli-1* локусів у сучасних українських сортах пшениці м'якої. Селекційно-генетична наука і освіта: тези доповідей Міжнародної наукової конференції. м. Умань. 17-18 березня 2021. С. 202-205.
10. **Попович Ю. А.**, Благодарова О.М., Чеботар С.В. Аналіз поліморфізму *Gli-A1* локусу у сортів пшениці м'якої сучасної української селекції. Сучасні проблеми генетики, біотехнології і біохімії сільськогосподарських рослин: тези доповідей Міжнародної наукової конференції. СГІ–НЦНС. м. Одеса (Україна). 21 жовтня 2020. С. 65-67.
11. **Попович Ю. А.**, Благодарова О.М., Чеботар С.В. Поліморфізм гліадинкодуєчого локусу *Gli-D1* у сучасних українських сортів пшениці м'якої. Генетика та селекція сільськогосподарських рослин – від молекули

до сорту: матеріали IV Інтернет-конференції молодих вчених. НААН СГП-ННЦ, м-во розвитку економ., торг. та с.-г. України, Укр. ін-т експертизи сортів рослин. м. Київ. 18 вересня 2020. С 26-27.

12. **Popovych Yu. A.**, Blagodarova O. M., Chebotar S.V. Polymorphism of *Gli-B1* genes among the modern Ukrainian bread winter wheat varieties. *Вісник Одеського національного університету. Серія: Біологія*. 2020. Т. 25, Вип. 2. С. 199.

ДОДАТОК Б

ЗАТВЕРДЖЕНО
 Проректор з науково-педагогічної роботи
 Одеського національного університету
 імені І.І. Мечникова
 доцент О.В. Запорожченко
 травень 2023 р.

АКТ

впровадження результатів науково-дослідної роботи «Поліморфізм генів гліадинів в сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої» у навчальний процес кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики ОНУ імені І.І. Мечникова

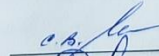
Комісія у складі: голови, С.В. Чеботар, д.б.н., проф. та членів комісії – к.б.н., доц. С.В. Білоконь, к.б.н., доц. Н.С. Задерей в період з 8 по 12 травня 2023 р. провела роботу з визначення фактичного впровадження у навчальний процес кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики біологічного факультету ОНУ імені І.І. Мечникова результатів, отриманих при виконанні НДР «Поліморфізм генів гліадинів в сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої», яка виконується на кафедрі молекулярної біології, біохімії та генетики біологічного факультету Одеського національного університету імені І.І. Мечникова та проводиться у межах наукової теми кафедри №308 «Еколого-генетичні аспекти адаптації та генетичний поліморфізм живих систем», ДР №0121U109169 (01.02.2021-31.12.2025).

Комісія розглянула матеріали, які підтверджують виконання та впровадження результатів науково-дослідної роботи у навчальний процес. Комісією встановлено, що виконавцями НДР було розроблено нові праймери, з їх використанням та з іншими алей-специфічними та міросателітними праймерами, розробленими Zhang et al. [2003], Devos et al. [1995], проведена ПЛР-ампліфікація, та описано ряд алелів гліадин-кодуєчих локусів *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* у сортів різних регіонів України. З використанням біоінформатичного аналізу послідовностей, що фланкуються праймерами, використаними у роботі, було підтверджено ряд алелів, та показана можливість застосування даних маркерів для близьких до пшениці м'якої видів роду *Triticum*. Встановлено, виявлені алелі гліадин-кодуєчих локусів *Gli-A1*, *Gli-B1* локусів можуть бути використані для ідентифікації алейних варіантів гліадинів методом ПЛР.

Отримані результати мають теоретичне і практичне значення: вони поглиблюють знання про білкові та молекулярні маркери, показують взаємозв'язок між ними та демонструють їх прикладне використання. Науковий рівень результатів НДР відповідає сучасному рівню молекулярно-генетичних досліджень в Україні та світі.


Робота фактично впроваджена у навчальну програму курсу «Молекулярні маркери», та рекомендована як корисна модель при виконанні кваліфікаційних робіт студентами, що включають дослідження запасних білків різних видів роду *Triticum*.

Голова комісії:



проф. С.В. Чеботар

Члени комісії:



доц. С.В. Білоконь



доц. Н.С. Задерей

12 травня 2023 р.

Даний акт не передбачає фінансових розрахунків.