

БЛАГОДАРОВА О. М.¹✉, РУЖИЦЬКА О. М.², СІЧНЯК О. Л.², ТКАЧЕНКО Ф. П.²¹ Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насінництва та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дор., 3, ORCID: 009-0000-4505-6313² Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Дворянська, 2, ORCID: 0000-0003-0384-2652, ORCID: 0000-0002-7014-3053, ORCID: 0000-0001-5769-5120

✉ blagodarova2017@gmail.com, olga.ruzhytska@onu.edu.ua, a.sechnyak@onu.edu.ua, tvf@ukr.netАПРОБАЦІЯ ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АЛЕЛЬНОГО СКЛАДУ ГЛІАДИНІВ *TRITICUM SPELTA* L.

Мета. Метою цієї роботи була апробація та порівняння методів електрофорезу запасних білків в кислому ПААГ та ПЛР з пшеничними праймерами на зразках спельти та оцінка можливості їх використання для ідентифікації алельних варіантів гліадинів. **Методи.** Дослідження проводили на зразках восьми різновидів *Tr. spelta*, використовуючи методи електрофорезу запасних білків у кислому ПААГ та ПЛР з алель-специфічними праймерами, розробленими до *Gli-B1* локусу пшениці м'якої. Продукти ПЛР розділяли 7 % ПААГ; гелі фарбували за допомогою аргентуму (II) нітрату. **Результати.** Показана можливість застосування молекулярних маркерів для ідентифікації алельних варіантів гліадинів спельти. За допомогою ПЛР, з використанням алель-специфічних праймерів до *Gli-B1* локусу, виявлено п'ять алелів, дві з яких описано і для виду *Tr. aestivum*. За результатами електрофорезу та опираючись на результати ПЛР, було ідентифіковано 6 різних алельних варіантів гліадинів, які можна розділити на дві групи. **Висновки.** Апробація методики ПЛР для виду *Tr. spelta* з використанням алель-специфічних праймерів, розроблених для пшениці м'якої, показала наявність поліморфізму та можливість застосування їх для ідентифікації алельних варіантів гліадинів для пшениці спельти. У порівнянні із методом електрофорезу запасних білків у кислому ПААГ, метод ПЛР є значно простішим в інтерпретації результатів, але застосовані в нашому дослідженні праймери не дозволяють виявити весь поліморфізм, який виявляється на електрофореграмах запасних білків.

Ключові слова: пшениця, *Triticum spelta* L., зернівка, алельні варіанти гліадинів, поліморфізм, генотип, *Gli-B1* локус, молекулярні маркери.

Спельта (*Triticum spelta*) – гексаплоїдна пшениця, яка вважається одним із найдавніших культурних видів пшениць [1]. Через низьку зернову продуктивність та ламкий колос поряд з важким обмолотом зерна, сьогодні, спельта вирощується досить обмежено, проте, попит на неї збільшується [2]. Зерно спельти може використовуватися для круп'яних, хлібобулочних та кондитерських виробів, воно має високий вміст білка та високу харчову цінність [3]. Ця культура вважається придатною до використання в органічному землеробстві; вона також невибаглива до родючості ґрунту [4].

Дослідження насінневої продуктивності та біохімічного складу зерна показали, що спельта не поступається пшениці м'якій за показником маси 1000 зерен та має вищий вміст білка у зерні 12–56 % [5]. Між крупнозерністю та вмістом білка існує негативна кореляція, проте було показано, що за сприятливих умов, зерно спельти може ставати більшим, одночасно зі збільшенням вмісту білка, на відміну від пшениці м'якої [5–7].

У порівнянні із пшеницею м'якою, клейковина спельти є менш еластичною та м'якшою, що спричинене співвідношенням Gli/Glu, із вищим вмістом гліадину [8]. Дослідження якісного складу клейковини показали, що комбінації певних електрофоретичних компонентів запасних білків у спельти впливають на такі ознаки як високий вміст білка та клейковини, крупнозерність [7], тому визначення алельного стану локусів, які кодують запасні білки є актуальним.

Для визначення алельного складу запасних білків, також може використовуватися метод ПЛР. Так, широко застосовуються праймери для генів глютенинів пшениці м'якої, запропоновані [9, 10]. Крім цього, була показана можливість використання праймерів, розроблених

Zhang et al., [11] і Devos et al. [12], для ідентифікації алелів гліадинів пшениці м'якої [13] та наявність мікросателіту *Taglgap* у ряді видів роду *Triticum*, до якого належить спельта [14].

У зв'язку з цим, метою цієї роботи була апробація і порівняння методів електрофорезу запасних білків в кислому ПААГ та ПЛР з пшеничними праймерами на зразках спельти.

Матеріали і методи

У якості матеріалу для досліджень використовували вісім зразків різновидів *Tr. spelta*, отриманих із Генбанку Інституту генетики рослин та культурних рослин Лейбніца (Leibniz institute of plant genetics and crop plant research (IPK), Gatersleben, Germany): *Tr. spelta* L. subsp. *spelta* var. *album* (Alef.) Körn (TRI 1594), *Tr. spelta* L. subsp. *spelta* var. *arduini* (Mazzuc.) Körn (TRI 587); *Tr. spelta* L. subsp. *spelta* var. *alefeldii* Körn (TRI 2400); *Tr. spelta* L. subsp. *spelta* var. *caeruleum* (Alef.) Körn (TRI 3802); *Tr. spelta* L. subsp. *spelta* var. *neglectum* Körn (TRI 4609); *Tr. spelta* L. subsp. *spelta* var. *vulpinum* (Alef.) Körn (TRI 9871); *Tr. spelta* L. subsp. *kuckuckianum* Gökgöl convar. *Kuckuckianum* A. Filat & Dorof. var. *asirecens* Dorof. (TRI 15112); *Tr. spelta* L. subsp. *spelta* var. *duhamellianum* (Mazzuc.) Körn Hallenser 1014/27 (TRI 3443). Як контрольні зразки використовували сорти пшениці м'якої: Chinese Spring, Marquis, Federation, Мадярка.

Досліджували по п'ять зернівок кожного різновиду спельти, які розділяли на дві половини. Одну половину використовували для про-

ведення електрофорезу запасних білків в кислому ПААГ за методикою Ф. А. Поперелі [15]; алельний склад оцінювали згідно каталогу Є. Метаковського [16]. З іншої половини виділяли ДНК, з використанням лізуючого СТАВ буферу [17], після чого проводили ПЛР з використанням двох пар алель-специфічних праймерів для *Gli-B1* локусу пшениці м'якої [11] (*Gli-B1.1* F TGATCTGGCCACAAAGGGA, *Gli-B1.1* R CATTTGGCCACCAATTCCGGT, *Gli-B1.2* F TGATCTGGCCACAAAGGGS, *Gli-B1.2* R CATTTGGCCACCAATTCCGGT). Продукти ампліфікації розділяли у 7 % ПААГ і фарбували методом, запропонованим Promega [18]. Приблизну довжину фрагментів ампліфікації визначали у програмі GelAnalyzer.

Результати та обговорення

За результатами проведеної ПЛР виявилося, що алель-специфічні праймери до *Gli-B1* локусу пшениці м'якої, відпалюються і на ДНК-матриці *Tr. spelta*, яка також є гексаплоїдною пшеницею із ABD субгеномами [1]. Позитивний результат за одним із двох пар праймерів (*Gli-B1.1* або *Gli-B1.2*) був отриманий для усіх досліджуваних зразків спельти. Між зразками різновидів спельти виявлено поліморфізм.

На рисунку 1 показана електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих для кожного різновиду спельти. Зокрема *Gli-B1.1* алель виявлено у *Tr. spelta* var. *album*, *Tr. spelta* var. *arduini* та *Tr. spelta* var. *vulpinum*, розмір фрагментів ампліфікації для них становив 369 п. н.

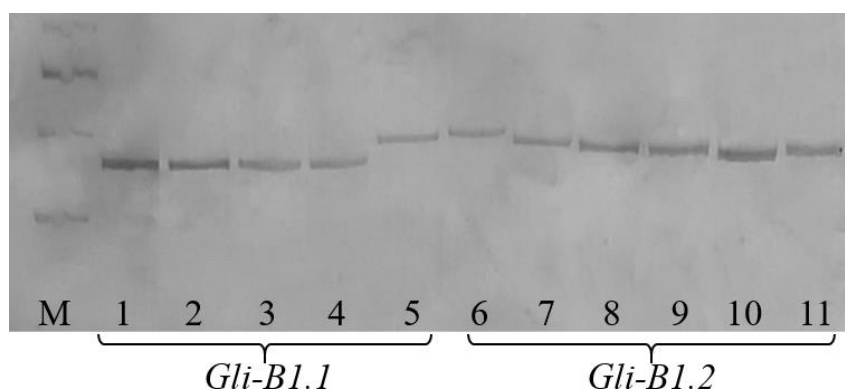


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації, отримана у ПЛР з алель-специфічними до *Gli-B1* локусу праймерами. 1 – *Tr. aestivum* сорт Marquis; 2 – *Tr. spelta* var. *album*; 3 – *Tr. spelta* var. *arduini*; 4 – *Tr. spelta* var. *vulpinum*; 5 – *Tr. aestivum* сорт Federation; 6 – *Tr. aestivum* сорт Мадярка; 7 – *Tr. spelta* var. *alefeldii*; 8 – *Tr. spelta* var. *caeruleum*; 9 – *Tr. spelta* var. *neglectum*; 10 – *Tr. spelta* subsp. *kuckuckianum*; 11 – *Tr. spelta* var. *duhamellianum*; M – GeneRuler 100bp.

В інших п'яти різновидів спельти знайдено *Gli-B1.2* алель з чотирма різними поліморфними фрагментами ампліфікації розміром 397–400 п. н. *Gli-B1.2* алель з розміром фрагментів ампліфікації 397 п. н. виявлено у зразка *Tr. spelta* sbsp. *Kuckuckianum*, а у ще двох різновидів знайдено алель 398 п. н. *Tr. spelta* var. *neglectum* та *Tr. spelta* var. *duhamelianum*. У різновидів *Tr. spelta* var. *caeruleum* та *Tr. spelta* var. *alefeldii* довжина фрагментів ампліфікації становила 399 п. н. та 400 п. н. відповідно (табл.).

Із описаних алелів *Gli-B1* локусу для пшениці м'якої [13] у нашому дослідженні було знайдено два: *Gli-B1.1*, з довжиною фрагментів ампліфікації 369 п. н. та *Gli-B1.2* довжиною 397 п. н., які відповідають алельним варіантам гліадинів пшениці м'якої. Таким чином, можна припустити, що у різновидів спельти *Tr. spelta* var. *album*, *Tr. spelta* var. *arduini* та *Tr. spelta* var. *vulpinum* присутній *Gli-B1b* алельний варіант гліадинів, або подібний до нього, а в *Tr. spelta* sbsp. *Kuckuckianum* – один із чотирьох – *Gli-B1f*, *Gli-B1e*, *Gli-B1g* або *Gli-B1c*.

Під час визначення генотипів спельти, на електрофореграмах запасних білків у кислому ПААГ, у більшості зразків автори [7] виявили алелі, описані для пшениці м'якої, які кодуються *Gli-1* та *Glu-1* локусами, що показує універсальність методики і для інших пшениць.

Із отриманих електрофореграм запасних білків (рис. 2) різновидів спельти ідентифікувати алельні варіанти гліадинів, які кодуються *Gli-B1* локусом, було набагато складніше. По-перше, не всі вони присутні в пшеничному каталозі Є. Метаковського. По-друге, інколи блоки компонентів відрізняються мікрними компонентами. По-

третє, на зону аналізу накладаються невідомі алелі інших локусів. Але нам вдалося знайти шість типів блоків, тобто алелів гліадинів, які можна розподілити на два угруповання, схожих між собою за ключовими компонентами. Перше з них об'єднує алелі типу *Gli-B1b* (b, g, e, n...), що присутні у різновидів *Tr. spelta* var. *album*, *Tr. spelta* var. *arduini* (*Gli-B1b*) та *Tr. spelta* var. *vulpinum*, (*Gli-B1n*). Друга група алелів типу *Gli-B1h* (f, h, d, a...) зустрічається у *Tr. spelta* var. *neglectum* (*Gli-B1f*), *Tr. spelta* var. *alefeldii* (*Gli-B1h*), *Tr. spelta* sbsp. *Kuckuckianum* та *Tr. spelta* var. *Duhamelianum*. Останні два мають алелі, які не присутні в каталозі, але всі вони мають спільний компонент у середній частині гелю, що є більш рухливим, ніж у алелів першої групи.

Порівнюючи результати досліджень двома методами, ми бачимо, що вони добре відповідають одне одному. Так, всі спельти, які ми віднесли до першої групи за електрофорезом, мають *Gli-B1.1* алель згідно ПЛР, тоді як друга група несе *Gli-B1.2*. Зразки *Tr. spelta* var. *vulpinum*, які за результатом ПЛР були ідентичними із *Tr. spelta* var. *album* і var. *arduini*, відрізнялися від них за електрофоретичними компонентами та характеризуються *Gli-B1n* алельним варіантом гліадинів, який у пшениці м'якої пов'язують із *Gli-B1.1* алелем з довжиною фрагментів ампліфікації 372 п. н. [13].

Отже, алель-специфічні праймери Zhang et al. [11] можуть використовуватися для ідентифікації алельних варіантів гліадинів спельти, як самостійно (для певних алельних варіантів), так і з електрофорезом у кислому ПААГ, що може значно полегшити ідентифікацію електрофоретичних спектрів.

Таблиця. Відповідність між типами електрофоретичних спектрів гліадинів, що кодуються *Gli-B1* локусом та алелями, визначеними за результатами ПЛР

Різновиди <i>Triticum spelta</i> L.	Імовірний алельний варіант гліадинів	Алель <i>Gli-B1</i> локусу	Розмір фрагментів ампліфікації, п. н.
<i>Album</i>	b	<i>Gli-B1.1</i>	369
<i>Arduini</i>	b	<i>Gli-B1.1</i>	369
<i>Vulpinum</i>	n	<i>Gli-B1.1</i>	369
<i>Kuckuckianum</i>	1?	<i>Gli-B1.2</i>	397
<i>Duhamelianum</i> Hallenser	2?	<i>Gli-B1.2</i>	398
<i>Neglectum</i>	f	<i>Gli-B1.2</i>	398
<i>Caeruleum</i>	h	<i>Gli-B1.2</i>	399
<i>Alefeldii</i>	h	<i>Gli-B1.2</i>	400

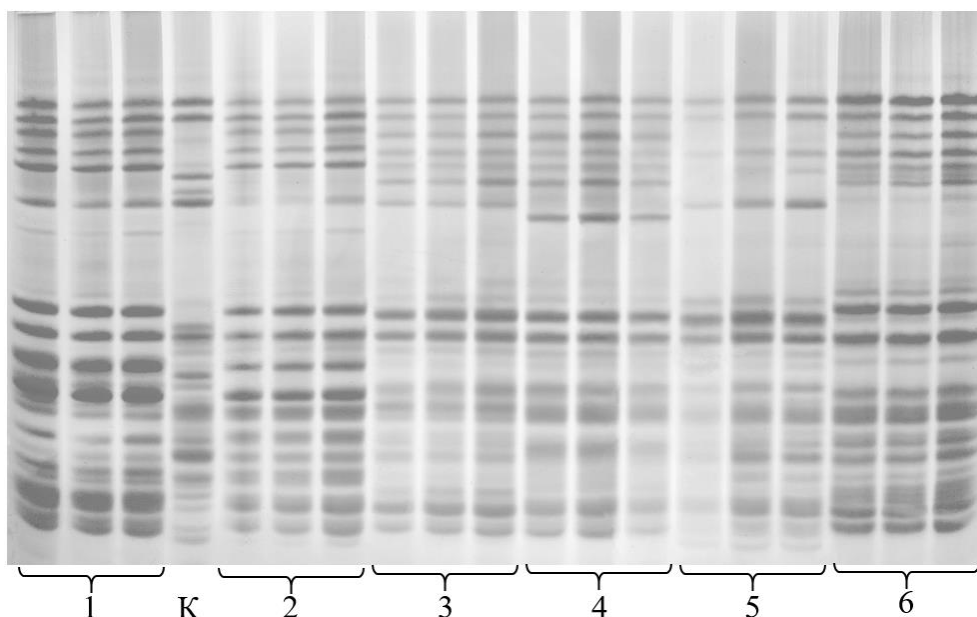


Рис. 2. Електрофореграма гліадинів різних підвидів *Triticum spelta* в кислому ПААГ. 1 – *Tr. spelta* var. *album*; 2 – *Tr. spelta* var. *arduini*; 3 – *Tr. spelta* var. *alefeldii*; 4 – *Tr. spelta* var. *caeruleum*; 5 – *Tr. spelta* var. *neglectum*; 6 – *Tr. spelta* var. *vulpinum*; К – контроль *Triticum aestivum* (сорт Chinese spring).

Висновки

Таким чином, апробація методики ПЛР для виду *Tr. spelta* з використанням алель-специфічних праймерів, розроблених для пшениці м'якої, показала наявність поліморфізму та можливість застосування їх для ідентифікації алельних варіантів гліадинів для пшениці спельти. У

порівнянні із методом електрофорезу запасних білків у кислому ПААГ, метод ПЛР є значно простішим в інтерпретації результатів, але застосовані в нашому дослідженні праймери не дозволяють виявити весь поліморфізм, що отримується на електрофореграмах запасних білків.

References

1. Poltoretskyi S., Hospodarenko H., Liubych V., Poltoretska N., Demydas H. Toward the theory of origin and distribution history of *Triticum spelta* L. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8, № 2. P. 263–268.
2. Sichkar S. M., Morgun V. V., Dubrovna O. V. Inheritance of morphological characteristics in hybrids F1–F2 *Triticum spelta* x *T. aestivum*. *Fiziol. rast. i gen.* 2016. Vol. 48 (4). P. 344–355.
3. Bonafaccia G., Galli V., Francisci R., Mair V., Skrabanja V., Kreft I. Characteristics of spelt wheat products and nutritional value of spelt wheat-based bread. *Food Chem.* 2000. Vol. 68 (4). P. 437–441.
4. Dahlstedt L. Spelt Wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* (L.)): An alternative crop for ecological farming systems. In: “*Spelt and Quina*” Working Group Meeting (Wageningen, 24–25 October 1997). Wageningen, 1997. P. 3–6.
5. Ruzhitskaya O. M., Borysova O. V. Nasinnieva produktyvnist' ta vmist bilka v zerni pshenytsi spel'ty (*Triticum spelta* L.) za vyroshchuvannya na riznomu foni mineral'noho zhyvlennia. *Selektsiyno-henetychna nauka i osvita* (Pariievi chytannia). 2017. 292 p. [in Ukrainian]
6. Shelepov V. V. Gavriiliuk I. N., Vergunov V. A. Pshenitsa: biologiiia selektsiia morfologiiia semenovodstvo. *NNSKb NAAN*. Kyiv : Logos, 2013. 498 p. [in Russian]
7. Ninieva A.K., Kozub N.O., Sozinov I.O., Leonov O.Yu., Rybalka O.I., Tverdokhleб E.V., Boguslavsky R. L. Characterization of triticum spelta l. Accessions for grain quality and electrophoretic spectra of storage proteins. *Visn. ukr. tov. genet. sel.* 2013. Vol. 11 (1). P. 96–105. [in Ukrainian]
8. Schober T.J., Bean S.R., Kuhn M. Gluten proteins from spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) cultivars: A rheological and size-exclusion highperformance liquid chromatography study. *J. Cereal Sci.* 2006. Vol. 44. P. 161–173.
9. Dong Z., Yang Y., Li Y., Zhang K., Lou H., An X., (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. doi: 10.1371/journal.pone.0074859.
10. Wang L., Li G., Peña R. J., Xia X., He Z., 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. doi: 10.1016/j.jcs.2010.01.005.
11. Zhang W., Gianibelli M., Rampling M. L., Gale K. R. Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ -gliadin alleles in *Triticum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 2003. Vol. 107. P. 130–138.

12. 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.
13. 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.
14. Popovych Yu. A., Blagodarova O. M., Chebotar S. V. Polymorphism of *Taglgap* microsatellite locus and its connection with allelic varieties of gliadins of bread wheat. *Visnyk ONU. Biologia.* 2021. Vol. 49 (2). P. 73–85. [in Ukrainian]
15. Poperelia F. O. Try osnovni henetychni systemy yakosti zerna ozymoї m'iakoi pshenytsi. Realizatsiia potentsiynykh mozhlyvostey sortiv ta hibrydiv Seleksiyyno-henetychnoho instytutu v umovakh Ukrainy. *Zbirnyk naukovykh prats SHI.* Odesa, 1996. P. 117–132. [in Ukrainian]
16. 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.
17. Syvolap Yu. M. Yspol'zovanye PTsR-analyza v henetyko-seleksyonykh yssledovaniyakh. Kyev : Ahrarna nauka, 1998. P. 8–33. [in Russian]
18. Promega Technical Manual. USA : Gene Print. STR Systems, 1999. P. 52.

BLAGODAROVA O. M.¹, RUZHITSKAYA O. M.², SECHNYAK O. L.², TKACHENKO F. P.²

¹ *Plant Breeding and Genetic Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,*

Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopolska Doroha, 3

² *Odesa I. I. Mechnikov National University, Genetics and Molecular Biology Department,*
Ukraine, 65082, Odesa, Dvoriants'ka str., 2.

APPROBATION OF COMMON WHEAT MOLECULAR MARKERS FOR THE DETERMINATION OF THE ALLELIC COMPOSITION OF GLIADINS OF *TRITICUM SPELTA* L.

Aim. The purpose of this work was to test and compare the methods of storage proteins electrophoresis in acid PAGE and PCR with wheat primers for spelt samples and to evaluate their using for the identification of allelic variants of gliadins.

Methods. Research was conducted on samples of eight varieties of *Tr. spelta* using electrophoresis of storage proteins in acid PAAG and PCR with allele-specific primers designed to the *Gli-B1* locus of common wheat. PCR products were separated by 7 % PAAG, gels were stained with argentum (II) nitrate. **Results.** The possibility of using molecular markers to identify allelic variants of spelt gliadins was shown. Using PCR using allele-specific primers for the *Gli-B1* locus, five alleles were detected, two of which were also described for *Tr. aestivum* species. According to the results of electrophoresis and based on PCR results, six allelic variants of gliadins, divided into two groups, were identified.

Conclusions. Approbation of the PCR for the species *Tr. spelta* using allele-specific primers developed for common wheat, showed the polymorphism and the possibility of using primers to identify allelic variants of gliadins for spelt wheat. Compared to the method of electrophoresis of reserve proteins in acidic PAAG, the PCR method is much easier to interpret the results, but it does not allow to detect all the polymorphism obtained on electrophoregrams of reserve proteins.

Keywords: wheat, *Triticum spelta* L., grain, allelic variants of gliadins, polymorphism, genotype, *Gli-B1* locus, molecular markers.