

КОЗУБ Н.О.<sup>1,2</sup>✉, СОЗІНОВ І.О.<sup>1</sup>, БІДНИК Г.Я.<sup>1,2</sup>, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.<sup>1,2</sup>, СОЗІНОВА О.І.<sup>1,2</sup>,  
КАРЕЛОВ А.В.<sup>1,2</sup>, СПІВАК С.І.<sup>2</sup>, БЛЮМ Я.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, ORCID: 0000-0002-3572-1786, 0000-0002-3621-5746,  
0000-0002-0981-3433, 0000-0001-6548-2504

<sup>2</sup> ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, ORCID: 0000-0002-1928-2744, 0000-0001-7078-7548

✉ [natalkozub@gmail.com](mailto:natalkozub@gmail.com), (044) 257-22-58

## ГЕНОТИПИ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ З НУЛЬ-АЛЕЛЯМИ ЗА ГЛІАДИНОВИМИ ЛОКУСАМИ

**Мета.** Метою роботи були ідентифікація та добір генотипів пшениці м'якої озимої з нуль-алелями за гліадиновими локусами *Gli-B1* і *Gli-D1*. **Методи.** Проводили пошук спонтанних мутантів із відсутністю синтезу блоків гліадинових компонентів серед гібридного матеріалу та сортів пшениці м'якої озимої. Для ідентифікації мутацій проводили електрофорез запасних білків зерна в кислому середовищі та SDS-електрофорез. **Результати.** Частота спонтанних мутацій, що призводять до появи нуль-алелі локусу *Gli-B1* і *Gli-D1*, в F<sub>2</sub> комбінації схрещування Одеська червоноколоса×Б-16 становила 0,1 % і 0,05 % відповідно. Пересівом матеріалу з цими мутаціями та маркерним добором із використанням електрофорезу гліадинів створено лінії F<sub>6</sub>: лінію з нуль-алеллю за локусом *Gli-B1* (OB-Bnull) та лінію з нуль-алеллю за локусом *Gli-D1* (OB-Dnull). Маркерним добором також створено лінію з нуль-алеллю *Gli-B1* від схрещування В3 х D4 та відібрано біотип із нуль-алеллю за локусом *Gli-D1* з сорту Славен. **Висновки.** Створені лінії з нуль-алелями за гліадиновими локусами *Gli-B1* (без омега-5-гліадинів) і *Gli-D1* (без омега-1,2-гліадинів) є вихідним матеріалом для селекції гіпоалергенної пшениці.

**Ключові слова:** пшениця м'яка, омега-5-гліадин, омега-1,2-гліадин, алергія, нуль-алель.

Приблизно 80 % загального білка зерна пшениці складають білки гліадини і глютеніни, які також називають глютенівими, або проламіновими білками, де гліадини – мономерні білки, а глютеніни – великі агрегати субодиниць (високомолекулярних і низькомолекулярних), з'єднаних дисульфідними зв'язками [1; 2]. Гліадини і глютеніни складають приблизно однакову частку від загальної кількості глютенівих

білків зерна [2]. Гель-електрофорез спирторозчинних білків зернівки в кислому середовищі залишається основним методом аналізу гліадинів [3]. За допомогою цього методу гліадини розділяються на групи компонентів, позначених як альфа- бета-, гамма- і омега-гліадини у порядку зменшення електрофоретичної рухливості на гелі (альфа- і бета-гліадини об'єднуються в одну групу альфа-гліадинів) [2; 3]. За структурою і спільністю походження проламінові білки (гліадини і глютеніни) поділяють на високомолекулярні проламіни (високомолекулярні субодиниці глютенінів), багаті на сірку проламіни (гамма-гліадини, альфа/(бета)-гліадини, низькомолекулярні субодиниці глютенінів В та С-типу, також відносно недавно відкрита нова група гліадинів – дельта-гліадини) та бідні на сірку проламіни (омега-гліадини та низькомолекулярні субодиниці глютенінів D-типу) [2].

Локуси високомолекулярних субодиниць глютенінів (*Glu-A1*, *Glu-B1* та *Glu-D1*) знаходяться на довгих плечах хромосом першої гомеологічної групи та містять по два тісно зчеплені гени, що кодують х- та у-субодиницю [1]. На коротких плечах хромосом першої гомеологічної групи розміщені локуси гліадинів *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*, тісно зчеплені з локусами низькомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*, які кодують більшість низькомолекулярних субодиниць гліадинів (В, С-субодиниці) [1; 2]. Локуси *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* містять кластери генів гамма- і омега-гліадинів та один ген дельта-гліадин [2]. На дистальних ділянках коротких пліч хромосом 6A, 6B, 6D знаходяться локуси *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2*, що містять кластери генів альфа-гліадинів [1]. Певні компоненти омега- і гамма-гліадинів або альфа-гліадинів успадковуються як єдиний

© КОЗУБ Н.О., СОЗІНОВ І.О., БІДНИК Г.Я., ДЕМ'ЯНОВА Н.О., СОЗІНОВА О.І.,  
КАРЕЛОВ А.В., СПІВАК С.І., БЛЮМ Я.Б.

блок [3], що відповідає кластерній природі локусів *Gli-1* та *Gli-2*.

Запасні білки пшениці можуть викликати у чутливих людей такі хвороби, як целиакія (автоімунна ентеропатія) та різні види алергії [4]. Омега-5-гліадини, контрольовані локусом *Gli-B1*, виявилися основними алергенами, що спричиняють анафілактичний шок у чутливих людей у випадку, коли вживання продуктів із пшениці супроводжується фізичними навантаженнями (WDEIA, wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis), тому цю хворобу також називають алергія на омега-5-гліадин [4]. Крім того, WDEIA теж можуть викликати білки, кодовані гліадиновими генами локусу *Gli-D1* [5]. Омега-5-гліадини також є основним алергеном у дітей з atopічним дерматитом, які мають алергію на пшеницю з реакцією гіперчутливості з швидким розвитком симптомів [6]. Водночас омега-1,2-гліадини, кодовані локусом *Gli-D1*, виявилися пов'язаними з алергічною реакцією, яка виражається у гіперчутливості шкіри до гідролізованих пшеничних білків [7].

Створення сортів пшениці без синтезу певних омега-гліадинів (з нуль-алелями відповідних локусів) є підходом для зниження алергенного потенціалу зерна пшениці [8; 9]. Метою нашої роботи є ідентифікація та добір генотипів пшениці м'якої озимої з нуль-алелями за гліадиновими локусами *Gli-B1* і *Gli-D1*.

### Матеріали і методи

Вихідним матеріалом, де було виявлено генотипи з відсутністю певних гліадинових компонентів на електрофоретичних спектрах, були популяції рослин F<sub>2</sub> пшениці м'якої озимої від реципрокного схрещування Б-16×Одеська червоноколоса та від реципрокного схрещування майже ізогенних ліній D4×B3. Майже ізогенні лінії B3 і D4 створено д. б. н. М.М. Копусем на основі сорту Безоста 1 [10]. Лінія B3 відрізняється від сорту Безоста 1 присутністю пшенично-житньої 1BL.1RS транслокації як у сорту Кавказ, маркером якої є характерний блок секалінів, зазначений у каталозі гліадинових алелей як алель *Gli-B1l* [5]. Лінія D4 відрізняється від сорту Безоста 1 присутністю алелі *Gli-D1j* замість *Gli-D1b*. Для популяції від схрещування Б-16×Одеська червоноколоса раніше було проаналізовано генотипи за гліадиновими локусами 5 окремих зерен F<sub>3</sub> з 2025 рослин F<sub>2</sub>. Нашадки з відсутністю певних компонентів у гліадинових

спектрах пересівали на дослідній ділянці ширококорядним посівом та проводили маркерний добір. Також досліджували генотипи окремих рослин сорту пшениці м'якої озимої Славен. Сорт створено в Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннесзнавства і сортовивчення (м. Одеса). Вибірку зерен цього сорту було попередньо посіяно ширококорядним посівом та зібрано зерно з окремих рослин.

Гліадини аналізували електрофорезом у кислому середовищі в 10 % поліакриламідному гелі за розробленою нами методикою [11]. Електрофорез у присутності додецилсульфату натрію (SDS-електрофорез) загального білка зерна проводили за методикою Laemmli в 10 % розділяючому гелі [12].

### Результати та обговорення

Серед попередньо проаналізованих 2025 рослин F<sub>2</sub> озимої м'якої пшениці від схрещення Одеська червоноколоса×Б-16 нами було виявлено рідкісні рослини з відсутністю окремих блоків компонентів у гліадиновому спектрі, тобто з присутністю нуль-алелей за певним гліадиновим локусом: дві рослини, гетерозиготні за нуль-алеллю локусу *Gli-B1* (рис. 1), і одну рослину, гетерозиготну за нуль-алеллю локусу *Gli-D1* (рис. 2). При цьому в електрофоретичних спектрах зернівок із цих рослин виявлено продукти експресії локусів високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-B1* та *Glu-D1*, що свідчило про відсутність втрати цілої хромосоми 1B або 1D.

Отже, частота спонтанних мутацій, що призводять до появи нуль-алелі локусу *Gli-B1* і *Gli-D1*, в F<sub>2</sub> комбінації схрещування Одеська червоноколоса×Б-16 становила 0,1 % і 0,05 % відповідно.

У локусі *Gli-B1* лінія Б-16 має алель *Gli-B1l*, що кодує характерний секаліновий блок – маркер пшенично-житньої транслокації 1BL.1RS, пов'язаної зі зниженням хлібопекарної якості борошна [3]. Одеська червоноколоса має алель *Gli-B1c* у цьому локусі. Ця алель контролює синтез чотирьох гліадинових компонентів: одного гамма-гліадину і трьох омега-гліадинів, що, власне, і є омега-5-гліадинами. Електрофореграму гомозиготи за нуль-алеллю локусу *Gli-B1*, що походить від схрещення Б-16×Одеська червоноколоса, показано на Рис. 3А, доріжка 3. Омега-гліадинові компоненти, які залишились у генотипу з нуль-алеллю за *Gli-B1*, кодуються локусом *Gli-D1* (два верхні оме-

га-гліадини на електрофореграмі) та мінорним локусом *Gli-A3* (нижній омега-гліадин), які не відносять до омега-5-гліадинів.

У локусі *Gli-D1* містяться гени, що кодують мажорний гамма-гліадин, та омега-гліадини, які на електрофореграмі спирторозчинних білків розміщуються у верхній частині спектра. За локусом *Gli-D1* лінія Б-16 несе алель *Gli-D1j*, яка, крім гамма-гліадину, кодує п'ять компонентів у зоні омега-гліадинів, два з яких мають близьку електрофоретичну рухливість. Одеська червоноколоса в цьому локусі має алель *Gli-D1f*, яка, відповідно, кодує гамма-гліадин та два омега-гліадинові компоненти на електрофоретичному спектрі. Названі омега-гліадинові білки відносяться до омега-1,2-гліадинів, що викликають алергію, проявом якої

є дерматит [7]. Електрофореграму гліадинів гомозиготи за нуль-алеллю локусу *Gli-D1*, що походить від схрещення Б-16×Одеська червоноколоса, показано на Рис. 3В, доріжка 1.

Пересівом цього матеріалу та маркерним добором із використанням електрофорезу гліадинів створено лінії F<sub>6</sub>: лінію з нуль-алеллю за локусом *Gli-B1* (OB-Bnull) та лінію з нуль-алеллю за локусом *Gli-D1* (OB-Dnull).

Також нами попередньо виявлено рідкісну спонтанну мутацію в гетерозиготному стані, що призвела до відсутності проламінів, кодованих *Gli-B1*, в одному випадку серед рослин F<sub>2</sub> від схрещення майже ізогенних ліній пшениці м'якої озимої D4×B3. Маркерним добором створено лінію з цією нуль-алеллю (рис. 4).

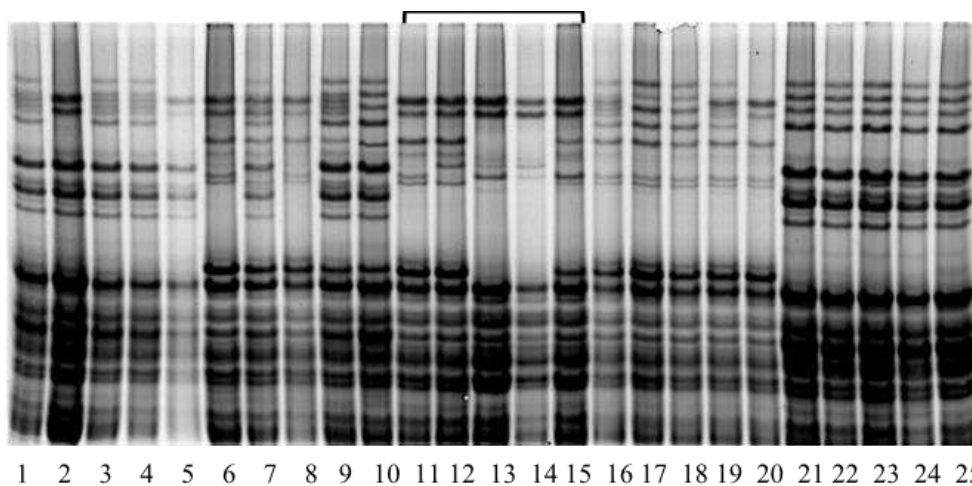


Рис. 1. Електрофореграма гліадинів зернівок F<sub>3</sub> озимої м'якої пшениці від схрещення Одеська червоноколоса×Б-16 (1-25), по 5 окремих зерен із рослини. Дужкою показано гліадинові спектри зерен із рослини, гетерозиготної за присутністю нуль- алелі локусу *Gli-B1* (11-15).

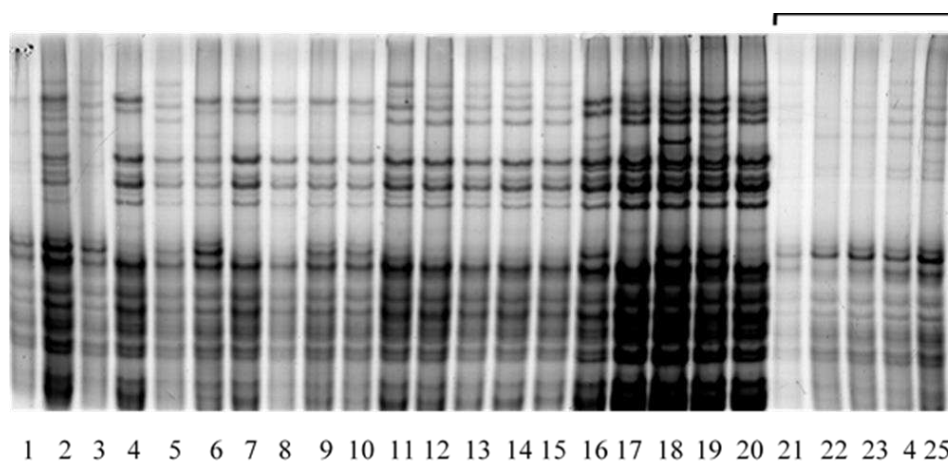


Рис. 2. Електрофореграма гліадинів зернівок F<sub>3</sub> озимої м'якої пшениці від схрещення Б-16×Одеська червоноколоса (1-25), по 5 окремих зерен із рослини. Дужкою показано гліадинові спектри зерен із рослини, гетерозиготної за присутністю нуль-алелі локусу *Gli-D1* (21-25).

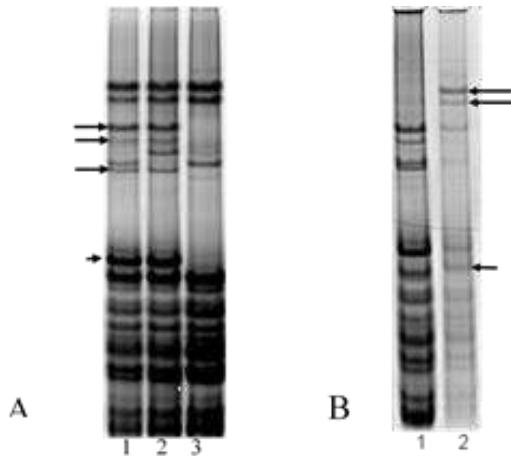


Рис. 3. Електрофореграма гліадинів. А. Генотип із нуль-алеллю за *Gli-B1* (3) та генотипи з алеллю *Gli-B1c* (1, 2), стрілками показано гліадини, кодовані *Gli-B1c*, довгими стрілками – омега-5-гліадини. В. Генотип із нуль-алеллю за *Gli-D1* (1) та генотип із алеллю *Gli-D1f* (2), стрілками показано гліадини, кодовані *Gli-D1f*, довгими стрілками – 1,2-омега гліадини.

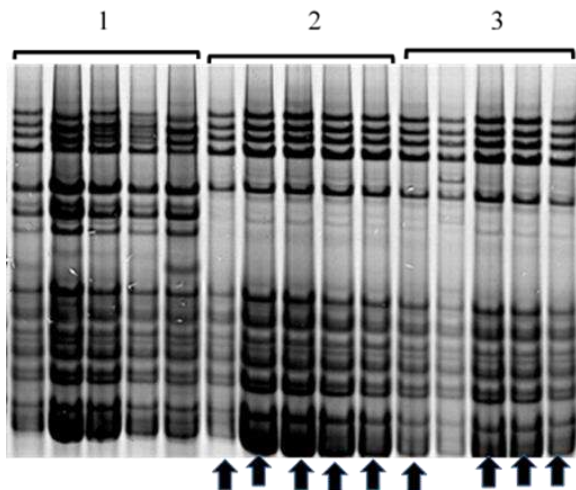


Рис. 4. Електрофореграма гліадинів зернівок з окремих рослин (1–3)  $F_2$  озимої м'якої пшениці, по 5 окремих зерен із рослини, від схрещення В3 x D4. Стрілками позначено генотипи з нуль-алеллю за локусом *Gli-B1*.

Очевидно, нуль-алелі за локусами *Gli-B1* і *Gli-D1* виникли в результаті делецій, що включають гліадинові локуси. Вихідна рослина  $F_2$ , на базі якої створено лінію OB-Vnull з нуль-алеллю за *Gli-B1*, була гетерозиготною: мала нуль-алель цього локусу та алель *Gli-B1c* від сорту Одеська червоноколоса. Блок гліадинів, кодований *Gli-B1c*, крім двох інших компонентів, містить два специфічні омега-гліадини, що фактично кодуються локусом *Gli-B5*, тісно зчепленим із *Gli-B1*

(1,4 cM) [13]. *Gli-B5*, у свою чергу, тісно зчеплений з алеллю червоного кольору колоскових лусок, *Rg-B1b* [13]. Лінія OB-Vnull, крім втрати блоку гліадинів, кодованих алеллю *Gli-B1c*, має світлий колір колоскових лусок, на відміну від червоного кольору у сорту Одеська червоноколоса. Це свідчить про те, що делеція охоплює локуси *Gli-B1*, *Gli-B5*, і *Rg-B1*. Обидві лінії OB-Vnull та OB-Dnull мають алель *Glu-B1a1*, пов'язану з високою силою тіста [14], яка може компенсувати втрату низькомолекулярних субодиниць глютенінів під час делеції відповідних локусів *Gli-1/Glu-3*.

У процесі аналізу сорту Славен серед зернівок були ідентифіковані генотипи з алеллю *Gli-D1g* і з нуль-алеллю за *Gli-D1* (рис. 5). Маркерним добором серед вирощених рослин виділено біотип із нуль-алеллю за *Gli-D1*. В електрофоретичних спектрах загального білка зернівок із цих рослин виявлено високомолекулярні субодиниці глютенінів, кодовані *Glu-D1*, що свідчить про відсутність втрати цілої хромосоми 1D.

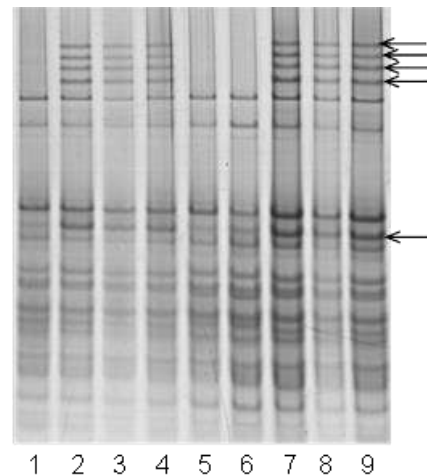


Рис. 5. Електрофореграма гліадинів сорту пшениці м'якої озимої Славен: 1, 5, 6 – біотип із нуль-алеллю за *Gli-D1*; 2–4, 7–9 – біотип з *Gli-D1g*.

Відібрані нами генотипи з нуль-алелями за гліадиновими локусами є спонтанними мутантами. Втрата цілого гліадинового блоку є найбільш поширеним типом мутацій за гліадиновими локусами [15], які було виявлено також в інших дослідженнях [8; 9]. Висока частота спонтанних мутацій у проламінових локусах може визначатися їх кластерною організацією та структурою самих запасних білків, які містять повторюваний домен із тандемними повторами коротких поліпептидних мотивів [2]. Створені

нами лінії з нуль-алелями за гліадиновими локусами можуть бути використані для селекції сортів зі зниженою алергенністю.

### Висновки

Маркерним доббором створено лінії з нуль-алелями локусу *Gli-B1* і *Gli-D1*, що походять від рослин F<sub>2</sub> комбінації схрещування

Одеська червоноколоса×Б-16, лінію з нуль-алеллю *Gli-B1* від схрещування В3хD4 та відібрано біотип з нуль-алеллю за *Gli-D1* з сорту Славен. Лінії з нуль-алелями за гліадиновими локусами є цінним матеріалом для селекції гіпоалергенної пшениці.

*Робота фінансувалася МОН України за договором № ДЗ/110–2021 від 27 вересня 2021 р.*

### References

1. Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 1987. Vol. 38. P. 141–153.
2. Shewry P. What is gluten – why is it special? *Frontiers in Nutrition.* 2019. Vol. 6. e.101. doi: 10.3389/fnut.2019.00101.
3. Metakovsky E., Melnik V., Rodriguez-Quijano M., Upelniek V., Carrillo J.M. A catalog of gliadin alleles: Polymorphism of 20th-century common wheat germplasm. *The Crop Journal.* 2018. Vol. 6 (6). P. 628–641. doi: 10.1016/j.cj.2018.02.003.
4. Cabanillas B. Gluten-related disorders: Celiac disease, wheat allergy, and nonceliac gluten sensitivity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2020. Vol. 60 (15). P. 2606–2621. doi: 10.1080/10408398.2019.1651689
5. Altenbach S.B., Chang H., Simon-Buss A., Jang Y., Denery-Papini S., Pineau F., Gu Y.Q., Huo N., Lim S.-H., Kang C.-S., Lee, J. Towards reducing the immunogenic potential of wheat flour: Omega gliadins encoded by the D genome of hexaploid may also harbor epitopes for the serious food allergy WDEIA. *BMC Plant Biol.* 2018. P. 18. e.291. doi: 10.1186/s12870-018-1506-z.
6. Palosuo K., Varjonen E., Kekki O. M., Klemola T., Kalkkinen N., Alenius H., Reunala T. Wheat omega-5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. Vol. 108 (4). P. 634–638. doi: 10.1067/mai.2001.118602.
7. Denery-Papini S., Bodinier M., Larré C., Brossard C., Pineau F., Triballeau S., Pietri M., Battais F., Mothes T., Paty E., Moneret-Vautrin D.A. Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific epitopes linked to deamidation. *Allergy.* 2012. Vol. 67. P. 1023–1032. doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02860.x.
8. Waga J., Skoczowski A. Development and characteristics of  $\omega$ -gliadin-free wheat genotypes. *Euphytica*, 2014. Vol. 195. P. 105–116. doi: 10.1007/s10681-013-0984-1.
9. Yamada Y., Yokooji T., Ninomiya N., Taogoshi T., Morita E., Matsuo H. Evaluation of the allergenicity of  $\omega$ 5-gliadin-deficient Hokushin wheat (1BS-18) in a wheat allergy rat model. *Biochem. Biophys. Rep.* 2019. Vol. 20. e.100702. doi: 10.1016/j.bbrep.2019.100702.
10. Kopus M.M. About natural gene geography of gliadin alleles in winter common wheat. *Seleksiya i Semenovodstvo.* 1994. No. 5. P. 9–14. [in Russian]
11. 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 Forest-Steppe of Ukraine. *Cytol. Genet.* 2009. Vol. 43 (1). P. 55–62. doi: 10.3103/S0095452717020050.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227 (5259). P. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
13. Pogna N.E., Metakovsky E.V., Redaelli R., Raineri F., Dachkevitch T. Recombination mapping of *Gli-5*, a new gliadin-coding locus on chromosome 1A and 1B in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1993. Vol. 87. P. 113–121.
14. Poperelya F.O., Blagodarova O.M. Genetics of grain quality of first Ukrainian genotypes of superstrong wheat. *Cytol. Genet.* 1998. Vol. 32 (6). P. 11–19. [in Ukrainian]
15. Chernakov V.M., Metakovsky E.V. Spontaneous mutations at the gliadin-coding loci which have been found during the analysis of spikes and families of plants of spring bread wheat cultivars. *Russ. J. Genetics.* Vol. 29 (1). P. 114–124. [in Russian]

**KOZUB N.O.<sup>1,2</sup>, SOZINOV I.O.<sup>1</sup>, BIDNYK H.Ya.<sup>1,2</sup>, DEMIANOVA N.A.<sup>1,2</sup>, SOZINOVA O.I.<sup>1,2</sup>, KARELOV A.V.<sup>1,2</sup>, SPIVAK S.I.<sup>2</sup>, BLUME Ya.B.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Plant Protection, NAAS,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 33

<sup>2</sup> Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine,

Ukraine, 04123, Kyiv, Osyrovskogo str., 2a

### COMMON WHEAT GENOTYPES WITH NULL-ALLELES AT GLIADIN LOCI

**Aim.** The study was aimed at identification and selection of winter common wheat genotypes with null-alleles at the gliadin loci *Gli-B1* and *Gli-D1*. **Methods.** The search for spontaneous mutants with the absence of synthesis of gliadin blocks was made in winter common wheat hybrid material and cultivars. To identify mutations, APAG electrophoresis and SDS-electrophoresis of seed storage proteins were performed. **Results.** The frequency of spontaneous mutations resulting in the null-allele at the loci *Gli-B1* and *Gli-D1* in F<sub>2</sub> was 0,1 % and 0,05 %, respectively, in the cross Odesska chervonokolosa × B-16. Via sowing the material with those mutations and marker selection, F<sub>6</sub> lines were developed:

the line OB-Bnull with the null-allele at the *Gli-B1* locus and the line OB-Dnull with the null-allele at the *Gli-D1* locus. Another line with the null-allele at *Gli-B1* was produced from the cross B3 × D4 by marker selection, as well as a biotype with the null-allele at the *Gli-D1* locus was selected from the cultivar Slaven. **Conclusions.** The developed lines with null-alleles at the gliadin locus *Gli-B1* (without omega-5 gliadins) and *Gli-D1* (without omega-1,2 gliadins) are initial material for hypoallergenic wheat breeding.

**Keywords:** bread wheat, omega-5 gliadin, omega-1,2 gliadin, allergy, null-allele.