

## Вивчення поліморфізму довжини інтронів генів $\alpha$ -тубуліну як метод аналізу генетичної диференціації рослин

Ярослав В. ПІРКО, Анастасія С. ПОСТОВОЙТОВА, Анастасія М. РАБОКОНЬ, Любов О. КАЛАФАТ, Сергій М. ПРИВАЛІХІН, Юлія О. БІЛОНОЖКО, Надія М. ПІРКО, Ярослав Б. БЛЮМ

ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України"

вул. Осиповського, 2а, Київ 04123, Україна

[yaryp1@gmail.com](mailto:yaryp1@gmail.com)

[nastya.postovoytova@gmail.com](mailto:nastya.postovoytova@gmail.com)

Pirko Ya.V., Postovoytova A.S., Rabokon A.M., Kalafat L.O., Privalikhin S.M., Bilonozhko Yu.O., Pirko N.M., Blume Ya.B. **Study of intron length polymorphism of the  $\alpha$ -tubulin genes as a method of analysis of the genetic differentiation in plants.** Ukr. Bot. J., 2018, 75(6): 576–584.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine  
2a Osypovskoho Str., Kyiv 04123, Ukraine

**Abstract.** A new type of DNA markers based on the analysis of the  $\alpha$ -tubulin 1<sup>st</sup> intron polymorphism has been developed and implemented. The bioinformatics search for  $\alpha$ -tubulin genes of *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, and *S. lycopersicum* has been carried out. It has been shown that most genes of  $\alpha$ -tubulin contained 4–5 exons and 3 to 4 introns. Several exceptions have been identified, including the *A. thaliana*  $\alpha$ -tubulin gene TUBA6 that contained only 2 exons and 1 intron, and the TUBA4 gene that consisted of 3 exons and 2 introns. It has been established that the lengths of the introns varies considerably, even within the same species. A certain systematicity was found in the number of nucleotide pairs of exons. Based on data on the analysis of the  $\alpha$ -tubulin gene exon-intron structure, the pair of universal degenerate primers have been created and the evaluation of the 1<sup>st</sup> intron length polymorphism of  $\alpha$ -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* and various varieties of *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* have been studied. It was shown the formation of species-specific DNA profiles that contained a different number of first intron amplicons of the  $\alpha$ -tubulin genes. The range of the size variation of the amplicons of intron fragments, for example in *S. tuberosum*, was within 150 bp–2000 bp. The nature of the appearance of large DNA fragments (more than 1500 bp) in the electrophoretic spectra of the analyzed species requires additional research, since such fragments are not generally envisaged by the results of the bioinformatics analysis. The polymorphism of the length of individual fragments of  $\alpha$ -tubulin introns among *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum* varieties has been determined, which allowed to differentiate them among themselves. In general, data was obtained confirming the feasibility of further using the polymorphism of the lengths of the 1<sup>st</sup> intron of  $\alpha$ -tubulin genes to genotyping and assessing the genetic diversity of different species (varieties) of higher plants. The developed DNA marker system is versatile and combines the reliability, speed of obtaining raw data and the simplicity of their analysis.

**Keywords:** DNA-marker, genotyping, polymerase chain reaction, *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*

### Вступ

ДНК-маркери широко застосовуються для вирішення багатьох проблем сучасної генетики, геноміки, філогенетики, збереження біорізноманіття, а також для молекулярної селекції, насінництва тощо (Gupta et al., 2003; Andersen et al., 2003). Зважаючи на всебічне використання різноманітних ДНК-маркерних систем у молекулярно-генетичних дослідженнях, надзвичайно актуальними залишаються питання пошуку та впровадження нових, ефективних та більш чутливих маркерів.

© Я.В. ПІРКО, А.С. ПОСТОВОЙТОВА, А.М. РАБОКОНЬ, Л.О. КАЛАФАТ, С.М. ПРИВАЛІХІН, Ю.О. БІЛОНОЖКО, Н.М. ПІРКО, Я.Б. БЛЮМ, 2018

На сьогодні більшість ДНК-маркерів базуються на оцінці поліморфізму анонімних послідовностей геному. До таких маркерних систем належать RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Fu, 2006), AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Everaert et al., 2001), ISSR (inter simple sequence repeats) (Pali et al., 2015), SSR (simple sequence repeats) (Singh et al., 2015) тощо. Такі ДНК-маркери розроблені для багатьох видів рослин і є достатньо інформативними, однак вони мають певні недоліки, що обмежує сферу їхнього застосування. Саме тому спостерігається перехід від анонімних ДНК-маркерів до ген-специфічних (gene-targeted markers (GTMs)), що ґрунтуються на оцінці поліморфізму конкретних генних послідовностей (Gupta et al., 2003).

Одним з багатообіцяючих напрямів у розробці генспецифічних ДНК-маркерів є підхід, заснований на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів або ILP (intron length polymorphism) (Wang et al., 2005). Генам, об'єднаним у родини генів, що кодують різні ізотипи одного і того самого білка, притаманна певна консервативність екзонних ділянок та гіперваріабельність інтронів. Правильно підібрані ILP-праймери для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяють аналізувати поліморфізм довжини інтронних ділянок генів між сусідніми екзонами. Знання екзон-інтронної структури та нуклеотидної послідовності цільових генів є необхідним для розробки ефективних ILP-маркерів. Такі маркери мають значні переваги, зокрема: кодомінантність, універсальність, високу відтворюваність результатів, простоту аналізу та інтерпретацію результатів, відносно низьку собівартість аналізу тощо (Vardini et al., 2004).

На сьогодні вже розроблені та впроваджені ILP-маркерні системи, які базуються на оцінці поліморфізму довжин інтронів генів (Thomas et al., 2007; Li et al., 2009), зокрема генів, що кодують ферменти електронно-транспортного ланцюга (Ferreira et al., 2009), а також ключових генів білків цитоскелету клітини – актину (Postovoitova et al., 2017; Postovoitova et al., 2018) та  $\beta$ -тубуліну (ТБП, Tubulin-based polymorphism) (Vardini et al., 2004; Rabokon et al., 2018).

Гени  $\alpha$ -тубуліну належать до мультигенної родини генів тубулінів. Найбільш дослідженими є 6 генів  $\alpha$ -тубуліну *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, які кодують 4 ізотипи білку (Korczak et al., 1992; Favery et al., 2001).  $\alpha$ -Тубулін разом із  $\beta$ -тубуліном виконує важливі функції в еукаріотичній клітині, зокрема входить до складу мікротрубочок – основної складової цитоскелету (Findeisen et al., 2014) – та є дуже консервативним білком. Така консервативність амінокислотної послідовності  $\alpha$ -тубуліну відповідно відображена і в послідовностях кодуючих ділянок генів (екзонах). Цей факт дозволяє припустити, що гени  $\alpha$ -тубуліну можуть бути використані для створення універсальної ILP-маркерної системи, придатної для проведення молекулярно-генетичного аналізу різних генотипів вищих рослин.

Тому метою дослідження було розроблення ДНК-маркерної системи, яка ґрунтується на оцінці поліморфізму довжин інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну, для встановлення можливості її застосування в аналізі

генетичних відмінностей рослин на внутрішньо- та міжвидовому рівнях.

## Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження обрано різні види та сорти рослин, які представляють практичний інтерес для генетичних та селекційних досліджень, а також являються широко розповсюдженими господарсько цінними культурами. Зважаючи на це, проаналізовано дикий тип *Arabidopsis thaliana* (10 рослин), 5 сортів *Linum usitatissimum* L. ('Чарівний', 'Сіверський', 'Каменярь', 'Журавка', 'Іванівський'), 5 сортів *Oryza sativa* L. ('Преміум', 'Консул', 'Віконт', 'YIP-4970', 'YIP-4558'), 5 сортів *Solanum lycopersicum* L. ('Money Maker', 'Перлина', 'Волгоградський', 'Балконне чудо золоте', 'Американський синій') та 4 сорти *Solanum tuberosum* L. ('Зарево', 'Левада', 'Світанок', 'Вернісаж'). Кожного сорту аналізували не менше 5 рослин.

Анотовані послідовності генів  $\alpha$ -тубуліну *A. thaliana* були взяті з бази даних GenBank (NCBI). Пошук генів, що кодують  $\alpha$ -тубулін у геномах *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, здійснювали за допомогою інструменту BLASTN версії 2.2.26+ у базі даних Phytozome v11 ([www.phytozome.net](http://www.phytozome.net)). Множинне вирівнювання знайдених послідовностей виконували за допомогою програми Clustal X (Larkin et al., 2007). Праймери підбирали до консервативних ділянок I та II екзонів генів  $\alpha$ -тубуліну, отриманих під час множинного вирівнювання, та аналізували за допомогою онлайн-інструменту OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

Оцінення поліморфізму довжини I інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну проводили з використанням власноруч розроблених універсальних вироджених ПЛР-праймерів:

TUA\_lin\_F: 5' – TGG GAR CTN TAY TGY CTY GA – 3';

TUA\_lin\_R: 5' – TCR CTR AAR AAN GTR TTR AAN GMA TC – 3'.

Тотальну геномну ДНК з проростків досліджуваних видів рослин виділяли за допомогою ЦТАБ-методу (Sambrook et al., 2001). Концентрацію та чистоту отриманої ДНК визначали за допомогою спектрофотометра ("Eppendorf", США). Зразки зберігали при температурі мінус 20 °С.

ПЛР-аналіз поліморфізму І інтрону генів  $\alpha$ -тубуліна здійснювали за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler 2720 ("Applied Biosystems", США). Кожна реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила п'ятикратний ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 2,5 ммоль  $MgCl_2$ , 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мМ кожного дНТФ, 0,5 од. Тақ полімерази ("Fermentas", Литва). Протокол ампліфікації був наступний: початкова денатурація (95 °С) – 3 хв, 38 циклів ампліфікації (денатурація 95 °С – 45 с, відпал праймерів 57 °С – 45 с, подовження 72 °С – 1 хв), кінцеве подовження 72 °С – 7 хв, 4 °С – утримання.

Подальше розділення ПЛР-продуктів виконували за допомогою електрофорезу в 6%-ому неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1х ТВЕ-буфері протягом 2,5 год за напруги 390 В (Sambrook et al., 2001). Як ДНК-маркер для визначення довжини фрагментів використовували O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use ("Fermentas", Литва) з кроком 100 пар нуклеотидів. Подальшу візуалізацію фрагментів проводили за допомогою забарвлення нітратом срібла (Rahman et al., 2000). Отримані цифрові зображення аналізували в програмі GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>).

## Результати та обговорення

Відомо, що використання ПЛР-маркерів потребує наявності попередньої інформації про нуклеотидні послідовності, що кодують цільові гени. Як джерело поліморфізму в даному дослідженні були обрані інтрони генів  $\alpha$ -тубуліну вищих рослин. Зважаючи на те, що  $\alpha$ -тубуліни є консервативними білками, можна передбачити певну консервативність їх кодуючих ділянок (екзонів). Гени  $\alpha$ -тубулінів також входять до складу великої мультигенної родини генів тубулінів, і в геномах рослин, як правило, закодовано декілька їхніх ізотипів одночасно (Findeisen et al., 2014). З метою розроблення ДНК-маркерів, що ґрунтуються на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну, було здійснено аналіз екзон-інтронної структури генів  $\alpha$ -тубуліну в геномах видів вищих рослин. Для цього використовували 5 видів рослин, а саме: *A. thaliana*, *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, геноми яких повністю сиквензовані. Гени  $\alpha$ -тубуліну *A. thaliana* є найбільш широко дослідженими серед вищих рослин (Korczak et al., 1992). На сьогодні в базі даних Gene Bank

є 6 анованих послідовностей  $\alpha$ -тубуліну, закодованих у геномі *A. thaliana*, а саме: P11139\_TUBA1, B9DG7\_TUBA2, Q56WH1\_TUBA3, Q0WV25\_TUBA4, B9DHQ0\_TUBA5, P29511\_TUBA6, які були в подальшому використані в дослідженні.

На сьогодні достовірні дані щодо генів  $\alpha$ -тубуліну закодованих в геномах *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, на жаль, є неповними. Тому як матрицю для пошуку генів  $\alpha$ -тубуліну в геномах цих видів рослин використали нуклеотидну послідовність гена  $\alpha$ -тубуліну TUBA1 *A. thaliana*.

За результатами пошуку в базі даних Phytozome v 11 у геномі *O. sativa* виявлено 4 послідовності, які ймовірно кодують  $\alpha$ -тубулін: LOC\_Os07g0574800 та LOC\_Os07g0574800, визначені як гени TUBA1 та TUBA2 відповідно, а також послідовності Os03g11970 та Os03g51600. В геномі *L. usitatissimum* знайдено 6 нуклеотидних послідовностей генів  $\alpha$ -тубуліну: Lus10005705, Lus10020281, Lus10013765, Lus10035422, Lus10031032, Lus10039169. Також знайдено 4 нуклеотидні послідовності генів  $\alpha$ -тубуліну у *S. tuberosum*: PGSC0003DMG400011537, PGSC0003DMG400030627, PGSC0003DMG4-00001320, PGSC0003DMG400008752. У геномі *S. lycopersicum* виявлено 4 послідовності генів  $\alpha$ -тубуліну: Solyc08g006890, Solyc04g77020, Solyc02g87880, Solyc02g91870.

Проведений аналіз екзон-інтронної структури генів TUBA1 та TUBA5 у *A. thaliana* свідчить про те, що вони містять в своєму складі по п'ять екзонів та чотири інтрони, гени TUBA2 та TUBA3 – по чотири екзони та три інтрони. Однак найбільше відрізняються від інших гени  $\alpha$ -тубуліну TUBA4 та TUBA6, оскільки вони мають в своєму складі лише три екзони та два інтрони, й два екзони та один інтрон відповідно. Довжини екзонів коливаються в межах 93–1259 п. н., а інтронів – 77–512 п. н.

Результати аналізу екзон-інтронної структури генів  $\alpha$ -тубуліну *O. sativa* показали, що гени Os07g38730 та Os03g11970 містять по п'ять екзонів і чотири інтрони, а Os11g14220 та Os03g51600 мають чотири екзони та три інтрони. Довжини екзонів становлять 93–657 п. н., а інтронів – 81–1081 п. н.

Гени  $\alpha$ -тубуліну, закодовані в геномі *L. usitatissimum*, містили переважно п'ять екзонів та чотири інтрони. Виключенням є лише ген  $\alpha$ -тубуліну Lus10035422, що має в своєму складі чотири екзони та три інтрони. Довжини екзонів

Таблиця. Аналіз екзон-інтронної структури генів  $\alpha$ -тубуліну  
Table. Exon-intron structure analysis of  $\alpha$ -tubulin genes

Ген	I екзон, п. н.	I інтрон, п. н.	II екзон, п. н.	II інтрон, п. н.	III екзон, п. н.	III інтрон, п. н.	IV екзон, п. н.	IV інтрон, п. н.	V екзон, п. н.
<i>Arabidopsis thaliana</i>									
TUBA1	113	160	215	512	200	72	509	86	316
TUBA2	93	462	235	93	371	85	654	-	-
TUBA3	212	82	215	77	200	111	497	-	-
TUBA4	93	409	606	83	654	-	-	-	-
TUBA5	113	83	215	77	200	111	509	91	316
TUBA6	93	198	1259	-	-	-	-	-	-
<i>Oryza sativa</i>									
Os07g38730	113	910	215	81	200	557	509	119	316
Os11g14220	93	892	235	86	371	112	657	-	-
Os03g11970	113	436	215	443	200	1081	509	92	313
Os03g51600	93	946	235	86	371	108	657	-	-
<i>Linum usitatissimum</i>									
Lus10005705	114	452	215	77	200	82	509	109	319
Lus10020281	113	401	215	81	200	82	509	107	319
Lus10013765	113	335	215	86	200	204	509	129	316
Lus10035422	93	456	235	82	371	104	654	-	-
Lus10031032	93	458	235	93	371	106	654	-	-
Lus10039169	113	300	228	86	200	207	509	164	316
<i>Solanum tuberosum</i>									
PGSC0003DMG400011537	93	4459	235	77	371	89	657	-	-
PGSC0003DMG400030627	93	151	235	91	371	160	657	-	-
PGSC0003DMG400001320	93	87	235	96	371	89	654	-	-
PGSC0003DMG400008752	93	1266	235	79	371	78	654	-	-
<i>Solanum lycopersicum</i>									
Solyc08g006890	93	1136	235	79	371	77	657	-	-
Solyc04g77020	93	950	235	88	371	90	655	-	-
Solyc02g87880	93	102	235	91	371	94	654	-	-
Solyc02g91870	94	279	235	95	371	157	657	-	-

коливаються в межах від 93 до 654 п. н., інтронів – від 77 до 456 п. н. Варто зазначити, що дані щодо пошуку та аналізу генів  $\alpha$ -тубуліну *L. usitatissimum* були нещодавно опубліковані (Pudiura et al., 2018). Отримані нами результати з ними повністю узгоджуються.

Результати аналізу екзон-інтронної структури генів  $\alpha$ -тубуліну *S. tuberosum* засвідчують, що всі гени цього білка містять по чотири екзони та три інтрони. Кількість пар нуклеотидів (п. н.) екзонних ділянок генів  $\alpha$ -тубуліну *S. tuberosum* складає 93–657 п. н., довжини інтронів – 77–4459 п. н. У геномі *S. lycopersicum* всі гени  $\alpha$ -тубуліну мають по чотири екзони та три інтрони. Довжини екзонів генів  $\alpha$ -тубуліну складають 93–657 п. н., довжини інтронів – 77–1136 п. н.

Детальні дані щодо екзон-інтронного аналізу всіх генів  $\alpha$ -тубуліну, закодованих у геномах *A. thaliana*, *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, наведені в таблиці.

Загалом, представлені результати аналізу екзон-інтронної структури генів  $\alpha$ -тубуліну, закодованих в геномах *A. thaliana*, *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, показали, що більшість генів мають у своєму складі по 4–5 екзонів та 3–4 інтрони. Однак є декілька винятків, зокрема ген  $\alpha$ -тубуліну *A. thaliana* TUBA6 містить лише 2 екзони та 1 інтрон, а ген TUBA4 – 3 екзони та 2 інтрони. Найімовірніше, така відмінність у структурі даних генів пов'язана із екзогенізацією інтронних ділянок, унаслідок чого змінюється читування гену та інтрон, разом із поряд розташованими екзонами, розпізнається як одна

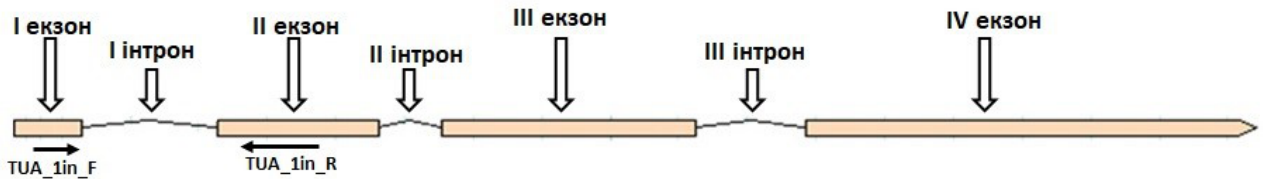


Рис. 1. Схема гена  $\alpha$ -тубуліну (TUA\_1in\_F та TUA\_1in\_R – місця відпалу прямого та зворотнього праймерів)  
 Fig. 1. Scheme of the  $\alpha$ -tubulin gene (TUA\_1in\_F and TUA\_1in\_R designated annealing forward and reverse primers)

суцільна екзонна ділянка. Явище екзогенізації описано і для інших генів білків цитоскелету рослин, зокрема для генів актину та  $\beta$ -тубуліну (Kim et al., 2000; Rudiura et al., 2018). Окрім того, спостерігається певна системність у кількості пар нуклеотидів екзонів, а довжини інтронів у межах одного виду значно відрізняються. Це свідчить про певну консервативність кодуєчих ділянок генів  $\alpha$ -тубуліну та гіперваріабельність інтронних ділянок. Зважаючи на отримані дані щодо екзон-інтронної структури генів  $\alpha$ -тубуліну у різних видів вищих рослин, можна сказати про перспективність використання інтронів цих генів для розроблення нової ІЛР-маркерної системи.

З метою створення ДНК-маркерів, які б дозволили оцінити поліморфізм довжини інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну на підставі попередньо здійсненого вирівнювання, була розроблена пара вироджених праймерів для проведення ПЛР. Зважаючи на той факт, що ген TUBA6 *A. thaliana* містить лише I інтрон, вироджені праймери підібрані таким чином, щоб оцінити поліморфізм довжини I інтрону всіх генів  $\alpha$ -тубуліну. Прямий та зворотний праймери (TUA\_1in\_F, TUA\_1in\_R) відпалюються на консервативних ділянках I та II екзонів і дозволяють проводити ампліфікацію ділянки гена  $\alpha$ -тубуліну, що розташована між праймерами та містить I інтрон (рис. 1). Зважаючи на гіперваріабельність інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну, можна передбачити поліморфізм утворених під час ПЛР фрагментів.

На рис. 2 представлені результати аналізу *A. thaliana*, різних сортів *L. usitatissimum* та *O. sativa* з використанням розробленої ДНК-маркерної системи. На зразку 1 показано специфічний ДНК-профіль *A. thaliana* дикого типу, в якому фрагменти інтронів  $\alpha$ -тубуліну розташовані в діапазоні довжин 300–2 000 п. н. Найбільш чіткі амплікони інтронів мають розміри близько 340 та 607 п. н. Також спостерігається утворення низки менш

чітких фрагментів у діапазоні 500–600 п. н. і двох ампліконів розмірами близько 1371 та 1666 п. н. Природа появи останніх двох великих фрагментів у ДНК-профілі *A. thaliana* потребує додаткового дослідження, оскільки такі амплікони інтронів не були передбачені попереднім біоінформаційним аналізом.

Результати аналізу поліморфізму довжин інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну в сортів *L. usitatissimum* представлено на рис. 2 (зразки 2–6). Утворені фрагменти інтронів розподіляються в діапазоні 400–2000 п. н. Для всіх проаналізованих сортів *L. usitatissimum* показана поява спільних ампліконів інтронів  $\alpha$ -тубуліну, що свідчить про утворення видоспецифічних ДНК-профілів. Більшість фрагментів інтронів *L. usitatissimum* є мономорфними, однак сорт 'Чарівний' (рис. 2, зразок 2) містить амплікони розміром 754 та 1764 п. н., що відрізняє ДНК-профіль цього сорту від інших. Також сорт 'Сіверський' (рис. 2, зразок 3) містить унікальний амплікон довжиною близько 336 п. н. Найімовірніше, якщо розширити вибірку сортів *L. usitatissimum*, можна виявити більшу кількість поліморфних фрагментів інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну.

Результати аналізу поліморфізму довжини I інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну в різних сортів *O. sativa* показані на рис. 2, зразки 7–11. У результаті проведення ПЛР-аналізу амплікони інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну *O. sativa* розподілились у широкому діапазоні від 300 до 2000 п. н. Характерним для проаналізованих зразків *O. sativa* є те, що всі утворені ДНК-профілі є унікальними за рахунок розподілу та кількості візуалізованих фрагментів інтронів. Мономорфними є лише фрагменти з довжинами близько 590, 1177, 1539 та 1704 п. н. Більшість утворених фрагментів інтронів виявилися поліморфними. Зокрема, у сорту 'Преміум' (рис. 2, зразок 7) наявні поліморфні амплікони інтронів розмірами близько 423, 425,

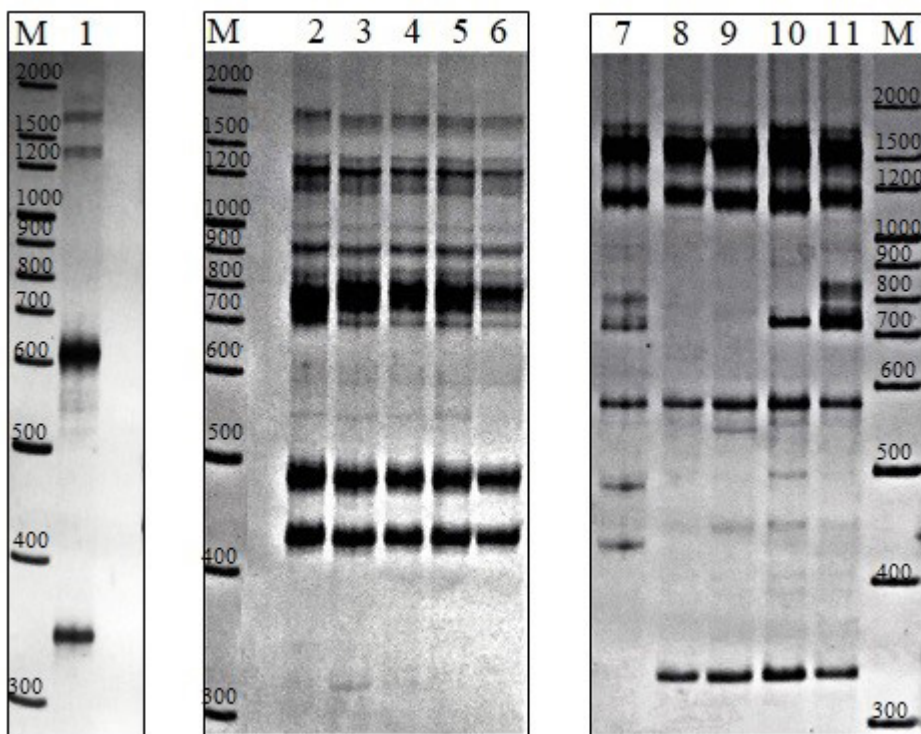


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР ДНК рослин з праймерами до I інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну в *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum* та *Oryza sativa*: 1 – *A. thaliana* – дикий тип; 2–6 – сорти *L. usitatissimum* (2 – 'Чарівний', 3 – 'Сіверський', 4 – 'Каменярь', 5 – 'Журавка', 6 – 'Іванівський'); 7–11 – сорти *O. sativa* (7 – 'Преміум', 8 – 'Консул', 9 – 'Віконт', 10 – 'YIP-4970', 11 – 'YIP-4558'). М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

Fig. 2. The electrophoregram of PCR products of the plants DNA with primers to the 1<sup>st</sup> intron of  $\alpha$ -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, and *Oryza sativa*. 1– *A. thaliana* wild type, 2–6 – *L. isitatissimum* varieties, 2 – 'Charivnyi', 3 – 'Severskyi', 4 – 'Kamenyar', 5 – 'Zhuravka', 6 – 'Ivanivskiy', 7–11 – *O. sativa* varieties, 7 – 'Premium', 8 – 'Consul', 9 – 'Vikont', 10 – 'YIP-4970', 11 – 'YIP-4558'. M – molecular weight marker O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

487 і 814 п. н., проте відсутній фрагмент 343 п. н. Такий ДНК-профіль інтронів у сорту 'Преміум' є унікальним та відрізняє його від інших зразків у вибірці. Загалом, ДНК-маркери, засновані на виявленні поліморфізму довжини I інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну, вдало генотипували сорти *O. sativa* та продемонстрували значну кількість поліморфних ампліконів інтронів.

На рис. 3 представлені результати аналізу поліморфізму довжини I інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну в сортів *S. lycopersicum* та *S. tuberosum*. ДНК-профілі п'яти сортів *S. lycopersicum* представлені в зразках 1–5 (рис. 3). Утворені фрагменти інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну розподілилися в широкому діапазоні довжин, від 200 до 2000 п. н. Більшість ампліконів є мономорфними, однак спостерігається поява поліморфних фрагментів інтронів переважно у

верхній частині електрофореграми від 1 000 до 2 000 п. н. Слід зазначити, що сорт 'Американський синій' (рис. 3, зразок 5) містить декілька унікальних ампліконів з довжинами близько 205, 268 та 396 п. н., що значно відрізняє цей сорт від інших. Загалом кожен з проаналізованих сортів, що має унікальний ДНК-профіль інтронів, відрізняється один від одного за рахунок кількості та розподілу ампліконів інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну.

Також на рис. 3 продемонстровані ДНК-профілі інтронів 4 сортів (зразки 4–9) *S. tuberosum*, проаналізовані з використанням ДНК-маркерів, які виявляють поліморфізм довжини I інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну. Утворені амплікони інтронів візуалізувалися в діапазоні 150–2 000 п. н. Більшість фрагментів є мономорфними, хоча були присутні й поліморфні фрагменти. У зразка 9 сорту 'Вернісаж'

наявний фрагмент 410 п. н., що відрізняє ДНК-профіль цього сорту від інших. Характерною ознакою сорту 'Світанок' є відсутність декількох ампліконів у ДНК-профілі. Загалом, за допомогою ДНК-маркерів, що оцінюють поліморфізм довжин інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну, вдалося диференціювати генотипи різних сортів *S. tuberosum*.

Отже, результати проведеного аналізу свідчать про те, що розроблений підхід дозволяє генотипувати різні рослини та ідентифікувати поліморфізм довжини інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну на міжсортівому та міжвидовому рівнях. Слід зазначити, що ряд утворених фрагментів ДНК з великою довжиною потребує додаткових досліджень, оскільки вони не були передбачені попереднім біоінформаційним аналізом і за своєю природою можуть бути гетеродимерами.

### Висновки

Запропонована нова ІLP-маркерна система, що дозволяє оцінити поліморфізм довжини І інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну у різних видів рослин. Розроблена ДНК-маркерна система є універсальною й дає можливість проводити генотипування та диференціацію різних видів (сортів) вищих рослин, поєднуючи в собі надійність, швидкість отримання вихідних даних і простоту їхнього аналізу. Вона може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу вищих рослин і є простим, надійним інструментом молекулярно-генетичного аналізу, який можна використовувати як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами.

### СПИСОК ПОСИЛАНЬ

- Andersen J.R., Lübberstedt T. Functional markers in plants. *Trends Plant Sci.*, 2003, 8(11): 554–560. <https://doi.org/10.1007/s10142-004-0107-0>
- Bardini M., Lee D., Donini P., Mariani A., Giani S., Toschi M., Lowe C., Breviario D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*, 2004, 47(2): 281–291. <https://doi.org/10.1139/g03-132>
- Everaert I., Riek J. D., Loose M. D., Waes J.V., Bockstaele E.V. Most similar variety grouping for distinctness evaluation of flax and linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties by means of AFLP and morphological data. *Plant Var Seeds*, 2001, 14: 69–87.
- Favery B., Ryan E., Foreman J., Linstead P., Boudonck K., Steer M., Shaw P., Dolan L. KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.*, 2001, 15: 79–89. <https://doi.org/10.1101/gad.188801>

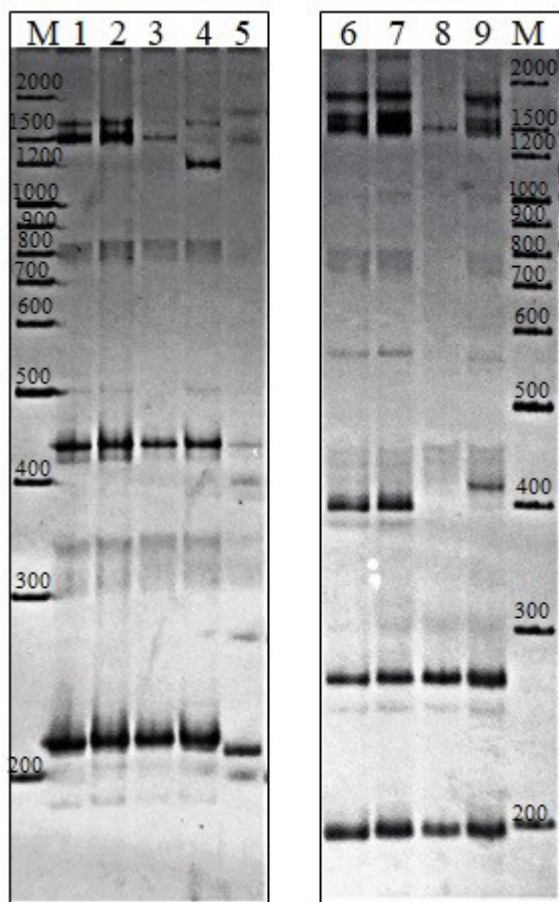


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР ДНК рослин з праймерами до І інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну у *Solanum lycopersicum* та *Solanum tuberosum*: 1–5 – сорти *S. lycopersicum* (1 – 'Money Maker', 2 – 'Перлина', 3 – 'Волгоградський', 4 – 'Балконне чудо золоте', 5 – 'Американський синій'); 6–9 – сорти *S. tuberosum* (6 – 'Зарево', 7 – 'Левада', 8 – 'Світанок', 9 – 'Вернісаж'). М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

Fig. 3. The electropherogram of PCR products of the plants DNA with primers to the 1<sup>st</sup> intron of  $\alpha$ -tubulin genes in *Solanum lycopersicum* and *Solanum tuberosum*. 1–5 – *S. lycopersicum* varieties, 1 – 'Money Maker', 2 – 'Perlyna', 3 – 'Volgogradskyi', 4 – 'Balcone chydo zolote', 5 – 'Amerykansky syniy', 6–9 – *S. tuberosum* varieties, 6 – 'Zarevo', 7 – 'Levada', 8 – 'Svitanok', 9 – 'Vernisage'. M – molecular weight marker O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

Ferreira A.O., Cardoso H.G., Macedo E.S., Breviario D., Arnholdt-Schmitt B. Intron polymorphism pattern in AOX1b of wild St John's wort (*Hipericum perforatum*) allows discrimination between individual plants. *Physiol. Plant.*, 2009, 137: 520–531. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01291.x>

- Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S., Hertzog J., Zietlow A., Carlomagno T., Kollmar M. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol. Evol.*, 2014, 6: 2274–2288. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu187>
- Fu Y.B. Redundancy and distinctiveness in flax germplasm as revealed by RAPD dissimilarity. *Plant Genet. Resour.*, 2006, 4: 117–124. <https://doi.org/10.1079/PGR2005106>
- Gupta P.K., Rustgi S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct. Integr. Genomics*, 2004, 4(3): 139–162. <https://doi.org/10.1007/s10142-004-0107-0>
- Kim E., Wriggers W., Phillips M., Kokabi K., Rubenstein P.A., Reisler E. Cross-linking constraints on F-actin structure. *J. Mol. Biol.*, 2000, 299: 421–429. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3727>
- Kopczak S.D., Haas N.A., Hussey P.J., Silflow C.D., Snustad D.P. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed alpha-tubulin genes. *Plant Cell*, 1992, 4: 539–547. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.5.539>
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Li X., Tan L., Wang L., Hu S., Sun C. Isolation and characterization of conserved non-coding sequences among rice (*Oryza sativa* L.) paralogous regions. *Mol. Genet. Genomics*, 2009, 281: 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0388-4>
- Pali V., Mehta N., Verulkar S.B., Xalxo M.S., Saxena R.R. Molecular diversity in flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by DNA based markers. *Vegetos*, 2015, 28(1): 157–165. <https://doi.org/10.5958/2229-4473.2015.00022.1>
- Postovoitova A.S., Yotka O.Yu., Pirko Ya.V., Blume Ya.B. *Factors in Exp. Evol. Organisms*, 2017, 20: 99–103. [Постовойтова А.С., Йотка О.Ю., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Поліморфізм довжин інтронів генів актину у різних сортів льону—довгунця української селекції. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 2017, 20: 99–103].
- Postovoitova A.S., Yotka O.Yu., Pirko Ya.V., Blume Ya.B. Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci. *Cytol. Genetics*, 2018, 52(6): 448–460. <https://doi.org/10.3103/S0095452718060099>
- Pydiura N., Pirko Ya., Galinousky D., Postovoitova A., Yemets A., Kilchevsky A., Blume Ya. Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterisation of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). *Cell Biol. Intl.*, 2018. <https://doi.org/10.1002/cbin.11001>
- Rabokon A.N., Pirko Ya.V., Demkovych A.Ye., Blume Ya.B. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of  $\beta$ -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genetics*, 2018, 52(1): 3–15. <https://doi.org/10.3103/s0095452718010115>
- Rahman M.H., Jaquish B., Khasa P.D. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2000, 18(4): 339–348.
- Sambrook J.F., David W.R. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, vol. 2, 763 pp.
- Sambrook J.F., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2100 pp.
- Singh P., Mehta N., Sao A. Genetic purity assessment in linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties using microsatellite markers. *Suppl. Genetics Plant Breed.*, 2015, 10(4): 2031–2036.
- Thomas B.C., Rapaka L., Lyons E., Pedersen B., Freeling M. *Arabidopsis* intragenomic conserved noncoding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104: 3348–3353. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611574104>
- Wang X., Zhao X., Zhu J., Wu W. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.*, 2005, 12: 417–427. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsi019>

Рекомендує до друку  
О.К. Золотарьова

Надійшла 15.11.2018



Пірко Я.В., Поставойтова А.С., Рабокoнь А.М., Калафат Л.О., Привалихін С.М., Білоножко Ю.О., Пірко Н.М., Блюм Я.Б. **Вивчення поліморфізму довжин інтронів генів  $\alpha$ -тубуліну як метод аналізу генетичної диференціації рослин.** Укр. бот. журн., 2018, 75(6): 576–584.

ДУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України"  
вул. Осиповського, 2а, Київ 04123, Україна

Розроблено та впроваджено новий вид ДНК-маркерів, які ґрунтуються на аналізі поліморфізму І інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну. Здійснено біоінформаційний пошук генів  $\alpha$ -тубуліну *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*. Показано, що більшість генів  $\alpha$ -тубуліну містили по 4–5 екзонів та 3–4 інтрони. Виявлено декілька винятків, зокрема ген  $\alpha$ -тубуліну *A. thaliana* TUBA6 містить лише 2 екзони та 1 інтрон, а ген TUBA4 – 3 екзони та 2 інтрони. Встановлено, що довжини інтронів значною мірою відрізняються, навіть у межах одного виду. Також виявлено певну системність у кількості пар нуклеотидів екзонів. На основі даних аналізу екзон-інтронної структури генів  $\alpha$ -тубуліну розроблено пару універсальних вирожджених праймерів та проведено оцінку поліморфізму довжини І інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну в *Arabidopsis thaliana* та різних сортів *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. Показано утворення видоспецифічних ДНК-профілів, які містили різну кількість ампліконів І інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну. Діапазон варіювання розмірів ампліконів фрагментів інтронів, наприклад у *S. tuberosum*, становив 150–2 000 п. н. Природа появи великих фрагментів ДНК (понад 1 500 п. н.) у електрофоретичних спектрах проаналізованих видів потребує додаткових досліджень, оскільки такі фрагменти в цілому не передбачені результатами біоінформаційного аналізу. Виявлено поліморфізм довжин окремих фрагментів інтронів  $\alpha$ -тубуліну серед сортів *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, що дозволило диференціювати їх між собою. Отримані результати підтверджують доцільність подальшого використання поліморфізму довжин І інтрону генів  $\alpha$ -тубуліну для генотипування та оцінки генетичної різноманітності різних видів та сортів вищих рослин. Розроблена ДНК-маркерна система є універсальною й поєднує в собі надійність, швидкість отримання вихідних даних і простоту їхнього аналізу.

**Ключові слова:** ДНК-маркер, генотипування, полімеразна ланцюгова реакція, *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*

Пірко Я.В., Поставойтова А.С., Рабокoнь А.Н., Калафат Л.А., Привалихин С.Н., Белоножко Ю.А., Пірко Н.Н., Блюм Я.Б. **Исследование полиморфизма длины интронов генов  $\alpha$ -тубулина как метода анализа генетической дифференциации растений.** Укр. бот. журн., 2018, 75(6): 576–584.

ГУ "Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України"  
ул. Осиповского, 2а, Киев 04123, Украина

Разработан и внедрен новый вид ДНК-маркеров, которые оценивают полиморфизм I интрона генов  $\alpha$ -тубулина. Выполнен биоинформационный поиск генов  $\alpha$ -тубулина у *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum* и *Solanum lycopersicum*. Показано, что большинство генов  $\alpha$ -тубулина содержат по 4–5 экзонам и 3–4 интрона. Было выявлено несколько исключений. Например, ген  $\alpha$ -тубулина *A. thaliana* TUBA6 содержит только 2 экзона и 1 интрон, а ген TUBA4 – 3 экзона и 2 интрона. Установлено, что длина интронов значительно варьирует даже внутри одного вида. Учитывая данные анализа экзон-интронной структуры генов  $\alpha$ -тубулина, была разработана пара универсальных вырожденных праймеров и проведена оценка полиморфизма длины I интрона генов  $\alpha$ -тубулина у *A. thaliana* и различных сортов *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*. Показано наличие видоспецифических ДНК-профилей, содержащих разное количество ампликонов I интрона генов  $\alpha$ -тубулина. Диапазон варьирования размеров ампликонов фрагментов интронов например, *S. tuberosum*, составлял 150–2 000 п. н. Причина появления больших фрагментов ДНК (свыше 1 500 п. н.) в электрофоретических спектрах проанализированных видов требует дополнительных исследований, поскольку такие фрагменты в целом не предусмотрены результатами биоинформационного анализа. Выявлен полиморфизм длин отдельных фрагментов интронов генов  $\alpha$ -тубулина, что позволило дифференцировать различные сорта *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. lycopersicum*, *S. tuberosum* между собой. Полученные результаты подтверждают целесообразность дальнейшего использования оценки полиморфизма длин I интрона генов  $\alpha$ -тубулина в качестве универсальной ДНК-маркерной системы для проведения генотипирования и оценки генетического разнообразия различных видов (сорт) высших растений.

**Ключевые слова:** ДНК-маркер, генотипирование, полимеразная цепная реакция, *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum*