



РАБОКОНЬ

Анастасія Миколаївна — кандидат біологічних наук, науковий співробітник відділу популяційної генетики Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ ТУБУЛІНУ ЯК ЕФЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ ГЕНЕТИЧНОЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ РОСЛИН

За матеріалами наукового повідомлення на засіданні Президії НАН України 15 вересня 2021 року

Проведено дослідження можливості та ефективності застосування маркерної системи оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну (Tubulin Base Polymorphism – TBP) для молекулярно-генетичного диференціювання рослин на рівні генотипів (сортів), популяцій та видів, зокрема сортів пшениці м'якої, ячменю звичайного, рижію посівного та льону-довгулицю, острівних популяцій щучника антарктичного, кримських популяцій егілопсу, а також видів льону, елевсини та підвидів омели білої. Отримані результати дозволяють рекомендувати TBP-метод для використання в молекулярній генетиці рослин для аналізу на всіх таксономічних рівнях, а також для цілеспрямованого застосування в молекулярній селекції.

Ключові слова: молекулярно-генетичні маркери, тубулін, TBP, ген, поліморфізм довжини інтронів, генетична диференціація, генотип, сорт, популяція, вид.

Молекулярно-генетичні маркери широко застосовують як у фундаментальних, так і в прикладних дослідженнях генетичного спрямування. Новим підходом у цьому напрямі, який набуває все більшого практичного використання, є оцінка поліморфізму довжини інтронів різних генів (Intron Length Polymorphism, ILP) [1]. Адже, як відомо, гени складаються з екзонних (кодуючих) ділянок, які представлені в геномах різних організмів гомологічними послідовностями, та інтронних (некодуючих) ділянок, які належать до гіперваріабельних областей генів і можуть мати різну довжину. Саме завдяки поліморфізму довжини інтрони виявилися універсальним і зручним інструментом молекулярно-генетичних досліджень для широкого спектру організмів. На сьогодні розроблено багато варіантів ILP-маркерів, які ґрунтуються на дослідженні різних генів.

Універсальність, відтворюваність та інформативність ILP-маркерів дозволяє проводити диференціювання та ДНК-

профілювання рослин. Метод має важливу перевагу порівняно з більшістю інших ДНК-маркерів, адже він не потребує попередньої інформації про конкретні послідовності досліджуваних генів, оскільки праймери (маркери) можуть бути розроблені для видів із секвенованим геномом з можливістю подальшого застосування до будь-яких інших видів. Це досягається вирівнюванням їх EST-послідовностей з послідовностями CDS споріднених видів для визначення ймовірної позиції інтрону [2].

Один з найбільш вдалих типів ІLP-маркерів ґрунтується на оцінці поліморфізму довжини інтронів у представників родини генів β -тубуліну (Tubulin Base Polymorphism, TBP) [3]. В основу методу покладено саме гени тубуліну, оскільки тубулін, що складається з α - та β -субодиниць, є ключовим елементом мікротрубочок, які забезпечують формування мітотичного веретена і, відповідно, основні процеси поділу й росту еукаріотичних клітин. Тому особливо консервативним у всіх організмах є β -тубулін. До того ж у рослинах майже всі гени β -тубуліну мають спільну геномну організацію: два інтрони, розташовані в фіксованих позиціях у межах трьох екзонів, за винятком генів β -тубуліну кукурудзи, що містять тільки перший інтрон і, відповідно, лише два екзони. Також ген β -тубуліну представлений у геномі кількома ізоטיפами, від 5 до 29 (для гексаплоїдних видів). Висока міжвидова гомологія та велика кількість генів β -тубуліну дозволяють використовувати лише одну пару вироджених праймерів до ділянок інтронів на межі з екзонами для аналізу будь-якої рослинної ДНК. Тому можна за допомогою полімеразної ланцюгової реакції отримати копії послідовностей, що знаходяться між ними, – інтронів.

Поліморфізм спостерігається в тому випадку, коли довжина інтронів у зразків виявляється різною. При цьому класичний TBP-підхід спирається на аналіз поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну. Однак з метою додаткового збільшення диференційної спроможності методу було розроблено різні варіанти TBP-методу: сTBP-метод (combinatorial), який спирається на поліморфізм

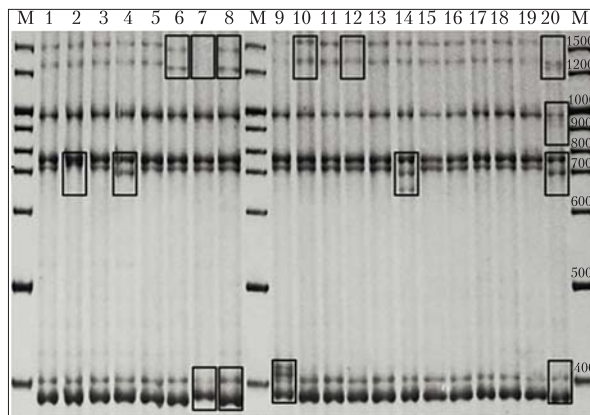


Рис. 1. TBP-аналіз сортів ячменю звичайного: 1–20 – номери сортів; М – ДНК-маркер. Прямокутниками позначено поліморфні зони

довжини другого інтрону гена β -тубуліну, та hTBP-метод (horse), який дозволяє оцінити поліморфізм ділянки гена, що містить перший та другий інтрони разом з другим кодуючим екзоном.

Отже, TBP являє собою перспективну маркерну систему для генетичного аналізу рослин. Тому необхідно було оцінити можливість та ефективність її застосування для молекулярно-генетичного диференціювання рослин на рівні генотипів (сортів), популяцій та видів.

Диференціація генотипів (сортів) за допомогою TBP-методу. Оскільки пшениця (*Triticum aestivum*) та ячмінь (*Hordeum vulgare*) є найдавнішими та найпоширенішими сільськогосподарськими культурами у світі загалом і в Україні зокрема, ми вперше за допомогою TBP-аналізу диференціювали сорти пшениці та ячменю вітчизняної селекції [4]. Було доведено високий рівень диференційної спроможності методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну при дослідженні міжсортного поліморфізму у ячменю (рис. 1) та пшениці, що може бути використано при розробленні селекційних програм для цих видів.

Серед високопродуктивних олійних рослин промислового використання рижій посівний (*Camelina sativa*) є однією з найперспективніших культур. Останнім часом цю давню культуру все ширше використовують як потенцій-

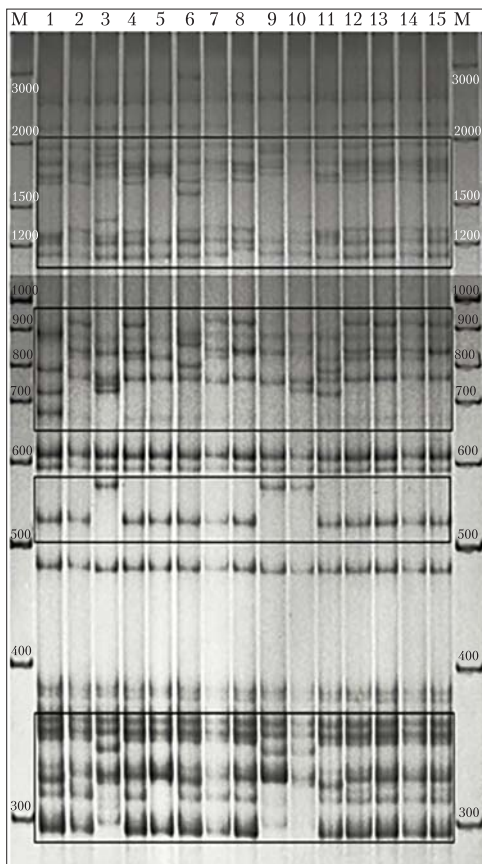


Рис. 2. сТВР-аналіз зразків егілопсу з різних місцевостей Криму: 1–15 (у верхній частині рисунка) – номери популяцій; М – ДНК-маркер. Прямокутниками позначено поліморфні зони

ний альтернативний ресурс для виробництва біопалива. Тому ми провели ТВР-аналіз перспективних сортів та сортозразків *C. sativa* [5]. Виявлено низький міжсортний поліморфізм при проведенні аналізу поліморфізму довжини першого та другого інтронів генів β -тубуліну сортів та сортозразків рижю посівного, що є свідченням їх близької спорідненості.

У різних галузях промисловості широко використовують також льон (*Linum usitatissimum*). На сьогодні льон-довгунець належить до основних олійних та прядильних культур світу. Тому ми дослідили між- та внутрішньосортну гетерогенність сучасних сортів льону української селекції за допомогою ТВР-методу та аналізу мікросателітних локусів (SSR-методу)

з метою оцінки ефективності використання ТВР-аналізу порівняно з класичним дуже поширеним молекулярно-генетичним маркером, яким є SSR-метод [6]. При цьому більшість досліджених сортів льону української селекції виявилися генетично неоднорідними за ТВР- та SSR-маркерами, однак сорти, отримані на Дослідній станції луб'яних культур Інституту сільського господарства Північного Сходу НААН, здебільшого представлені гомогенними сортами, що свідчить про високий рівень проведеної в цій установі селекційної роботи.

При порівнянні результатів дослідження, отриманих за допомогою ТВР- та SSR-методів, встановлено досить високу ефективність ТВР-методу для диференціації генотипів льону порівняно з SSR-аналізом. При цьому метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну має кілька практичних переваг у використанні, оскільки надійність системи ідентифікації на основі мікросателітного аналізу прямо залежить від збільшення кількості SSR-маркерів. А при проведенні ТВР-аналізу використовується лише одна пара вироджених праймерів, що полегшує отримання результатів та їх подальший аналіз.

Виявлена за допомогою ТВР-методу внутрішньосортна гетерогенність значної частини сортів льону української селекції також може мати практичний ефект у нових селекційних програмах цієї культури.

Крім того, ми оцінили можливість використання ТВР-методу в молекулярно-генетичних дослідженнях білоруських ландрасів льону. Вивчення ландрасів може допомогти виявити генотипи, які можна використовувати як донори рідкісних алелів генів. У Білорусі створено і вже багато років підтримується досить велика колекція сортів льону, частину з яких і було досліджено.

ТВР-аналіз дав змогу диференціювати ландраси льону білоруської селекції, хоча вони і не групуються за якоюсь певною ознакою. При дослідженні внутрішньосортного поліморфізму встановлено значну генетичну гетерогенність стародавніх сортів. Виявилось, що порівняно із сучасними сортами української

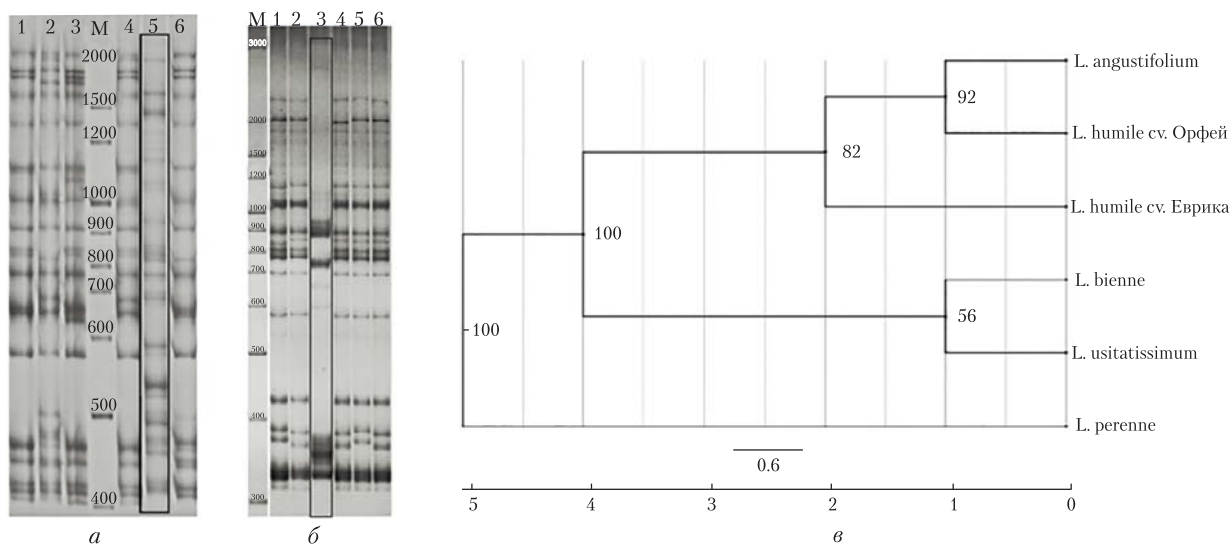


Рис. 3. Молекулярно-генетичні ТВР- (а) та сТВР-профілі (б) видів льону: 1–6 – зразки; М – ДНК-маркер; в – дендрограма, побудована за результатами аналізу отриманих ТВР/сТВР-профілів досліджених видів льону

селекції білоруські ландраси є більш різноманітними за поліморфізмом довжини інтронів генів β -тубуліну. Це зрозуміло, адже ландраси – це давні сорти, які зростали та еволюціонували в різних екогеографічних умовах, а тому є більш гетерогенними.

Отже, вже зараз ТВР-метод можна рекомендувати для використання при оцінці генетичної чистоти та однорідності різних сортів як однодольних, так і дводольних сільськогосподарських культур.

Диференціація популяцій за допомогою ТВР-методу. Після оцінки можливостей використання нового ДНК-маркера для дослідження різних сортів рослин наступним кроком стало дослідження можливостей використання цієї маркерної системи для диференціації окремих популяцій рослин. Зокрема, було досліджено острівні популяції щучника антарктичного (*Deschampsia antarctica*), який є одним з двох видів судинних рослин Антарктики та привертає до себе увагу науковців через низку фізіологічних ознак, що забезпечують його виживання у суворих умовах Антарктики. Застосування всіх можливих варіантів методу аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну дозволило встановити низький рівень генетичного різноманіття острівних по-

пуляцій щучника антарктичного з двох віддалених регіонів морської Антарктики [7], що підтверджується результатами інших досліджень цього виду з використанням AFLP та хлоропластних маркерів.

Дослідження популяцій егілопсу (*Aegilops biuncialis*) також має велике практичне значення, адже він є найближчим родичем пшениці і використовується для інтрогресії корисних генів у геном пшениці. За допомогою ТВР-методу (рис. 2) виявлено чіткий внутрішньовидовий поліморфізм, притаманний кожній з кримських популяцій егілопсу [8].

Отже, методи, основані на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, можна застосовувати в дослідженнях генетичних відмінностей між популяціями різних екогеографічних зон.

Диференціація видів за допомогою ТВР-методу. Поряд з можливістю використання ТВР-методу для молекулярно-генетичного аналізу сортів та популяцій рослин встановлено, що довжина інтронів генів β -тубуліну може бути джерелом надійної інформації для генетичної диференціації видів, наприклад видів льону (*Linum*). Адже таксономія роду *Linum* і досі залишається неоднозначною. Деякі автори вважають певні види підвидами *L. usitatissimum*

simum або розглядають *L. angustifolium* та *L. bienne* як один вид. Уперше використавши ТВР/сТВР-метод для дослідження філогенії видів льону, ми отримали молекулярно-генетичні профілі п'яти видів льону. Одержані результати вказують на те, що *L. angustifolium* та *L. bienne* — два різні види (рис. 3).

Також за допомогою ТВР-методу можна досягти високого рівня генетичної диференціації таких видів роду елевсини (*Eleusine*), як пальчасте просо (*E. coracana*) та гусяча трава (*E. indica*) [3], які за морфологічними ознаками є дуже подібними.

Додатково ТВР-метод було використано нами для дослідження омели білої. Омела біла — вічнозелена напівпаразитарна рослина, що зростає на гілках та стовбурах деревних рослин. Дослідженню генетичних особливостей омели наразі приділяють небагато уваги. Зважаючи на те, що уявлення про систематичне положення омели білої не є загальноприйнятним, а також з огляду на недостатню кількість інформації щодо генетичної диференціації цього виду, доцільною видається генетична диференціація омели білої, що зростає на різних видах рослин-хазяїв.

Результати дослідження, отримані з використанням ТВР-методу, продемонстрували чітке розділення зразків омели на три підвиди залежно від рослини-хазяїна. Крім того, несподіваною виявилася можливість розрізнити чоловічі та жіночі рослини омели [9], адже омела є дводомною рослиною. При цьому у чоловічих рослин спостерігається додатковий фрагмент, який відсутній у жіночих особин.

Інші варіанти ІЛР-маркерів. Оскільки методичні можливості ТВР-методу засвідчили його високу ефективність, для розширення палітри

ІЛР-маркерів ми розробили нові ДНК-маркери, основані на аналізі поліморфізму довжини інтронів інших генів тубуліну — α - та γ -тубуліну [10]. При цьому система оцінки поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну не продемонструвала будь-яких переваг порівняно з ТВР-методом, а от система оцінки на основі аналізу генів γ -тубуліну може бути більш перспективною при диференціації різних видів унаслідок обмеженої кількості генів цього білка. Найчастіше для γ -тубуліну характерна наявність у геномі лише двох генів, що значно спрощує отримання та подальший аналіз результатів.

Висновок. Проаналізовано та узагальнено можливості застосування й ефективність методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Отримані результати дозволяють рекомендувати метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для молекулярно-генетичної диференціації представників як однодольних, так і дводольних рослин на рівні генотипів (сортів), популяцій та видів, а також для цілеспрямованого застосування в молекулярній селекції, наприклад при створенні та перевірці нових сортів, адже ТВР-метод поєднує в собі надійність та швидкість отримання вихідних даних.

Автор висловлює глибоку подяку академіку НАН України, доктору біологічних наук, професору, директору ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» Ярославу Борисовичу Блому та доктору біологічних наук, старшому науковому співробітнику, ученому секретарю ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» Ярославу Васильовичу Пірку за постійну увагу, підтримку і допомогу в науковій роботі.

REFERENCES

[СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. Poczai P., Varga I., Laos M., Cseh A., Bell N., Valkonen J.P.T., Hyvönen J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*. 2013. **9**: 6. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-6>
2. Yang L., Jin G., Zhao X., Zheng Y., Xu Z., Wu W. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics*. 2007. **23**(16): 2174–2177. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm296>
3. Rabokon A., Pirko Ya., Demkovych A., Blume Ya. Intron length polymorphism of beta-tubulin genes as an effective instrument for plant genotyping. *Mol. Appl. Genetics (Minsk)*. 2015. **19**: 35–44 (in Russian).

- [Рабокoнь А.Н., Пирко Я.В., Демкович А.Е., Блюм Я.Б. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. *Молекулярная и прикладная генетика (Минск)*. 2015. Т. 19. С. 35–44.]
4. Rabokon A.N., Demkovich A.E., Pirko Ya.V., Blume Ya.B. Studing of β -tubulin gene intron length polymorphizm of *Triticum aestivum* L. and *Hordeum vulgare* L. varieties. *Factors Exp. Evol. Organisms*. 2015. **17**: 82–86 (in Ukrainian). [Рабокoнь А.М., Демкович А.Е., Пирко Я.В., Блюм Я.Б. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 17. С. 82–86.]
 5. Blume R.Y., Rabokon A.M., Postovoytova A.S., Demkovich A.Ye., Pirko Ya.V., Yemets A.I., Rakhmetov D.B., Blume Ya.B. Evaluating the diversity and breeding prospects of Ukrainian spring *Camelina* genotypes. *Cytol. Genet.* 2020. **54**(5): 54–74. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0095452720050084>
 6. Rabokon A.N., Pirko Ya.V., Demkovych A.Ye., Blume Ya.B. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.* 2018. **52**(1): 3–15. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0095452718010115>
 7. Rabokon A.M., Pirko Y.V., Demkovych A.Ye., Andreev I.O., Parnikoza I.Yu., Kozeretska I.A., Yu Z., Kunakh V.A., Blume Y.B. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in *Deschampsia antarctica* E. Desv. across the western coast of the Antarctic Peninsula. *Polar Science*. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.11.001>
 8. Rabokon A., Demkovich A., Sozinov A., Kozub N., Pirko Ya., Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. *Cell Biol. Int.* 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.10886>
 9. Bilonozhko Yu.O., Rabokon A.M., Postovoytova A.S., Kalafat L.O., Privalikhin S.M., Demkovych A.E., Blume Ya.B., Pirko Ya.V. Intraspecific differentiation of white mistletoe (*Viscum album* L.) by assessment of intron length polymorphism of β -tubulin genes and SSR-analysis. *Cytol. Genet.* 2021. **55**(1): 1–9. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0095452721010035>
 10. Pirko Y.V., Rabokon A.M., Postovoytova A.S., Blume Y.B. New approaches in plant genotyping. In: *National Academy of Sciences of Ukraine: on the results of 2018*. Kyiv, 2019. P. 17–18. (in Ukrainian)
[Пирко Я.В., Рабокoнь А.М., Постовойтова А.С., Блюм Я.Б. Нові підходи до генотипування рослин. *Національна академія наук України: про підсумки 2018 року*. Київ, 2019. С. 17–18.]

Anastasiia M. Rabokon

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6249-1824>

INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF TUBULIN GENES AS AN EFFECTIVE TOOL FOR GENETIC PLANT DIFFERENTIATION

According to the scientific report at the meeting of the Presidium of the NAS of Ukraine, September 15, 2021

A systematic assessment of the application possibility and effectiveness of one of the modern molecular marker systems based on the presence of an intron-specific DNA polymorphism of the tubulin family in plants (tubulin-based polymorphism, TBP) was carried out in the present work. Because it is not yet widely used, this method requires verification of its effectiveness for genotyping plants at different taxonomic levels. The previous data were reviewed and new application examples of the TBP analysis in monocotyledonous and dicotyledonous plants assessment at the interspecies and intraspecies level were presented. Following plants were tested: wheat and barley cultivars, varieties and cultivars of camelina, cultivars of flax and Belarusian flax landraces, Antarctica island populations of hair grass, Crimean populations of aegilops, flax species, finger millet and Indian goosegrass, mistletoe subspecies. The high application efficiency of the β -tubulin gene intron length polymorphism assessment was shown for fingerprinting of various plant genotypes, that can be used both for plant molecular genetics and for purposeful application in molecular selection, for example, during creating and testing new varieties. The obtained results allow us to recommend this β -tubulin gene intron length evaluation method for the molecular genetic differentiation of monocotyledonous and dicotyledonous plant representatives, because this method combines reliability and high output data obtaining speed with data analysis simplicity.

Keywords: molecular genetic markers, tubulin, TBP (tubulin base polymorphism), gene, intron length polymorphism, genetic differentiation, genotype, cultivar, population, species.