

---

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.12.087>

УДК 575.2:577.2

**Я.В. Пірко, Д.Д. Буй, А.С. Постовойтова,  
А.М. Рабокoнь, Л.О. Калафат, Я.Б. Блюм**

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України”, Київ

E-mail: yarvp1@gmail.com

## **Поліморфізм довжини інтронів генів $\gamma$ -тубуліну як новий підхід до генотипування рослин**

*Представлено академіком НАН України Я.Б. Блюмом*

*Запропоновано нову маркерну систему для оцінки генетичного різноманіття рослин, яка ґрунтується на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів  $\gamma$ -тубуліну. Розроблено пару вироджених праймерів до генів  $\gamma$ -тубуліну на основі особливості їх екзон-інтронної структури. Показано простоту та універсальність використання маркерної системи в молекулярно-генетичному аналізі рослин на прикладі видів і сортів *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*.*

**Ключові слова:**  $\gamma$ -тубулін, ген, інтрон, довжина інтронів, поліморфізм, молекулярно-генетичні маркери.

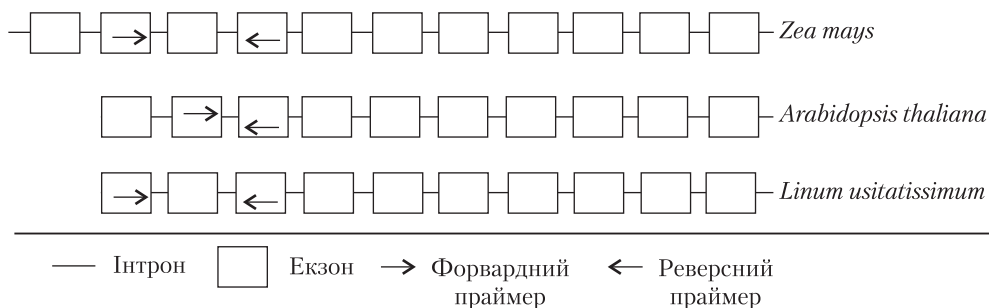
Останнім часом все більш широкого застосування в молекулярно-генетичних дослідженнях набуває метод оцінки генетичного різноманіття, який базується на вивченні поліморфізму довжини інтронів генів (ILP (intron length polymorphism)) [1]. Цей метод виявився універсальним для молекулярно-генетичної диференціації широкого спектра організмів і зручним для оцінки їх генетичного різноманіття, оскільки інтрони безпосередньо пов'язані з конкретними генами [2, 3]. Крім того, відомо, що на відміну від інтронів екзони є більш консервативними, а отже, і менш варіабельними за своїми послідовностями у всіх еукаріотичних організмів внаслідок різної швидкості еволюції цих двох елементів. Це особливо характерно для послідовностей геномних ділянок, які містять гени, що кодують структурні білки, такі як, наприклад, білки цитоскелета. Зважаючи на це, саме некодуючі ділянки геному можуть бути джерелом генетичного поліморфізму, який доступний для оцінки за допомогою специфічних молекулярно-генетичних маркерів.

ILP-маркери є нейтральними, кодомінантними, стабільними і специфічними [4]. Аналіз, заснований на простій ПЛР-реакції з використанням праймерів до ділянок екзонів, що фланкують інтрон (exon-primed intron crossing (EPIC-PCR)), дає змогу використовувати всього одну комбінацію вироджених праймерів для будь-якої рослинної ДНК. У результаті можна швидко та зручно отримувати надійні, відтворювані та легко інтерпретовані резуль-

© Я.В. Пірко, Д.Д. Буй, А.С. Постовойтова, А.М. Рабокoнь, Л.О. Калафат, Я.Б. Блюм, 2018

ISSN 1025-6415. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2018. № 12

87



**Рис. 1.** Схематичне зображення місця відпалу вироджених праймерів

тати [1, 4]. ІЛР-маркери працюють як ефективна мультиплексна реакція при дослідженні інтронів різних представників конкретної родини генів, даючи змогу отримати специфічний ДНК-профіль досліджуваного генотипу або виду. Вже існують досить вдалі ІЛР-маркери, що ґрунтуються на дослідженні поліморфізму довжини інтронів генів “домашнього господарства” [5, 6], ферментів електронно-транспортного ланцюга [7] та різних ключових структурних білків [8], таких як тубулін (ТБП (tubulin based polymorphism)) [9].

Відомо, що крім  $\alpha$ - та  $\beta$ -тубуліну до складу мікротрубочок входить  $\gamma$ -тубулін, який є критично необхідним для їх нуклеації. До того ж його амінокислотна послідовність є високонсервативною серед філогенетично різних організмів [10, 11]. Мета дослідження полягала в розробці нового варіанта ІЛР-методу, що базувався б на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів  $\gamma$ -тубуліну.

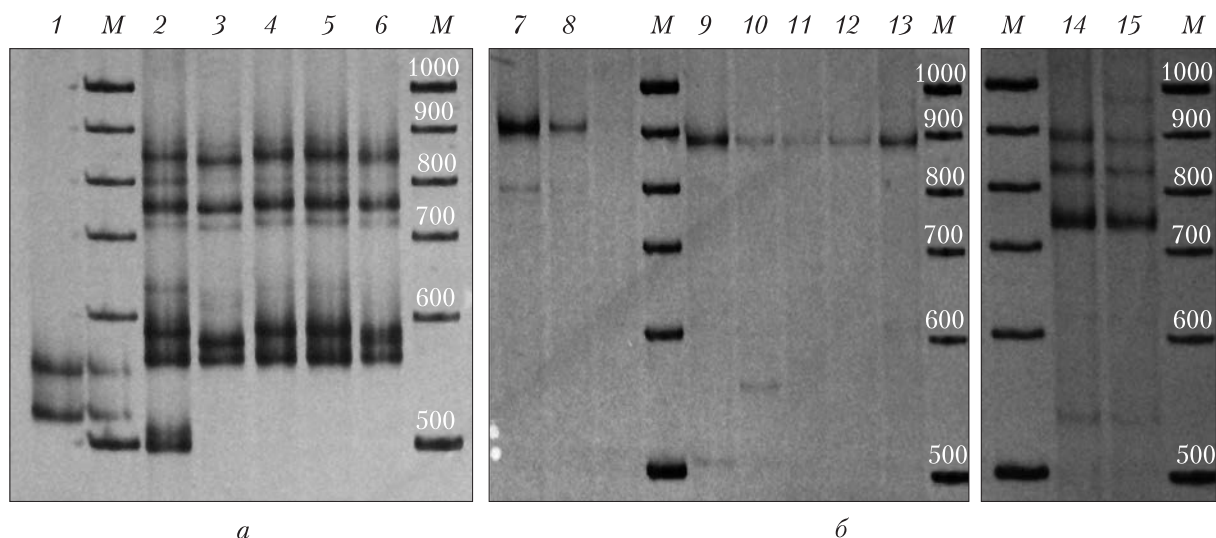
Для цього проведено пошук консервативних ділянок екзонів генів  $\gamma$ -тубуліну, що оточують інтрон, для подальшого підбору до них праймерів таким чином, щоб під час ІЛР можна було отримати копії послідовностей інтронів. Праймери підібрано з використанням послідовностей генів  $\gamma$ -тубулінів таких видів рослин, як *Zea mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *Arabidopsis thaliana* (AT3G61650), *Linum usitatissimum* (Lus10010986.g, Lus10007851.g), для яких екзон-інтронна структура гена  $\gamma$ -тубуліну є доступною в базі даних Phytozome.v12 (www.phytozome.net). Після вирівнювання послідовностей генів з використанням алгоритму MUSCLE та програмного забезпечення UniproUGENE [12] вибирали найбільш консервативні ділянки екзонів, до яких було підібрано пару вироджених праймерів:

F: 5'-GAYGTBTTYTTTTACCARGCKGA-3';

R: 5'-GAGTTGTARGGYTGGACRAC-3'.

У складі ампліконів інтронів  $\gamma$ -тубуліну продукти ампліфікації *Arabidopsis thaliana* містять повну послідовність II інтрону, продукт *Zea mays* – II інтрону, III екзону та III інтрону, продукт *Linum usitatissimum* – I інтрону, II екзону та II інтрону (рис. 1). Середня очікувана довжина продуктів ІЛР (інтронів) для вказаних видів рослин становить 500 п.н. та вище.

ДНК з проростків льону, арабідопсису, картоплі, рису та пшениці виділяли за допомогою ЦТАБ-методу [13]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ІЛР) проводили за таким протоколом: початкова денатурація (95 °C) – 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація 95 °C – 45 с, відпал праймерів 59 °C – 40 с, елонгація 72 °C – 1 хв), кінцева елонгація 72 °C – 7 хв, 10 °C – утримання. Продукти ІЛР розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-му неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1 × ТВЕ-буферній системі [13].



**Рис. 2.** Електрофореграма з ампліконами інтронів генів  $\gamma$ -тубуліну: *a* – рослини, на основі нуклеотидної послідовності  $\gamma$ -тубуліну яких були розроблені вироджені праймери: 1 – *A. thaliana*, 2–6 – *L. usitatissimum* (сорти Глобус, Міандр, Вручий, Журавка, Каменярь); *б* – рослини, нуклеотидна послідовність  $\gamma$ -тубуліну яких невідома: 7, 8 – *S. tuberosum* (сорти Левада, Світанок), 9–13 – *O. sativa* (сорти Преміум, Консул, Віконт, УІР-4970, УІР-4558), 14, 15 – *T. aestivum* (сорти Елегія, Миронівська 808); М – ДНК – маркер “100bp Ladder”

Візуалізацію фрагментів, отриманих під час ПЛР, здійснювали за допомогою фарбування нітратом срібла [14].

Результати електрофоретичного аналізу ампліконів льону та арабідопсису, на основі нуклеотидної послідовності генів  $\gamma$ -тубуліну яких була розроблена вироджена пара праймерів, наведено на рис. 2, *a*. Як видно з наведених даних, для *Arabidopsis thaliana* характерні два фрагменти ДНК завдовжки приблизно 520 та 560 п.н. Їх розміри цілком узгоджуються з даними біоінформаційного аналізу. На сьогодні в базі даних Uniprot (<http://www.uniprot.org/help/sequence-alignments>) розміщені дві достовірно анотовані послідовності  $\gamma$ -тубулінів з геному *Arabidopsis thaliana* (*TUBG1*, *TUBG2*). Для *Linum usitatissimum* наразі немає достовірно анотованих послідовностей  $\gamma$ -тубуліну (згідно з Uniprot). Проте, як видно з рис. 2, *a*, для нього характерна значно більша кількість фрагментів у діапазоні довжин від 500 до 900 п.н. Тому можна припустити, що в геномі льону міститься більша кількість генів  $\gamma$ -тубуліну, ніж у арабідопсису. Важливо, що у випадку *Linum usitatissimum* найбільше за профілем інтронів виокремлюється серед інших сорт Глобус. Однак даний сорт льону слабо диференціюється від інших зразків у процесі ТВР- та SSR-аналізу, що було показано нами раніше [15]. Що стосується сортів Міандр та Каменярь, то вони також значно різняться за спектрами фрагментів ДНК, як і у випадку використання ТВР та SSR маркерів.

Оскільки розроблені праймери є виродженими, то, ймовірно, вони працюватимуть і на інших видах рослин. У зв'язку з цим розроблену пару праймерів було застосовано для дослідження поліморфізму інтронів генів  $\gamma$ -тубуліну в організмів, для яких ще невідома екзон-інтронна структура цих генів (див. рис. 2, *б*). Для прикладу досліджено три сільськогосподарські культури – картоплю, рис та пшеницю. Для *S. tuberosum* характерне утворення

одного та двох фрагментів ДНК: приблизно 800 і 910 п.н. (сорт Левада) та лише 910 п.н. (сорт Світанок). У всіх досліджених сортів *O. sativa* виявлено чіткий фрагмент ДНК завдовжки приблизно 895 п.н. та два менш яскравих — 505 п.н. (сорт Преміум) і 560 п.н. (сорт Консул). Результати електрофоретичного аналізу зразків *T. aestivum* свідчать про наявність фрагментів ДНК у діапазоні від 500 до 1000 п.н.

Отже, запропонований нами метод, що базується на оцінці поліморфізму довжин інтронів генів  $\gamma$ -тубуліну, дає змогу однозначно розрізняти різні види рослин і навіть досліджувати їх генетичний поліморфізм на рівні генотипів (сортів) на основі отриманих електрофоретичних профілів. Розроблена пара вироджених праймерів може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу рослин без наявності попередньої інформації про екзон-інтронну структуру їх генів  $\gamma$ -тубуліну. Крім того, надалі можна додатково доповнити метод новими варіаціями, наприклад підвищити виродженість праймерів, залучивши до біоінформаційного аналізу більшу кількість послідовностей гена  $\gamma$ -тубуліну, або, навпаки, розробити специфічні праймери для конкретного виду рослин, підвищивши за рахунок цього чутливість методу.

Таким чином, доведено, що запропонований метод є простим, надійним молекулярно-генетичним інструментом, який може бути ефективно застосований для фінгерпринтингу та молекулярно-генетичного аналізу різних видів та сортів рослин як у поєднанні з іншими маркерними системами, так і самостійно.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. 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**. P. 417–427. doi: <https://doi.org/10.1093/dnares/dsi019>
2. Рабоконь А.Н., Демкович А.Е., Пирко Я.В., Блюм Я.Б. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. *Молекуляр. и прикл. генетика*. 2015. **19**. С. 35–44.
3. Morello L., Breviario D. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste. *Curr. Genom.* 2008. **9**. P. 227–238. doi: <https://doi.org/10.2174/138920208784533629>
4. Braglia L., Manca A., Mastromauro F., Breviario D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity*. 2010. **2**. P. 572–585. doi: <https://doi.org/10.3390/d2040572>
5. Thomas B.C., Rapaka L., Lyons E., Pedersen B., Freeling M. Arabidopsis intragenomic conserved non-coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. **104**. P. 3348–3353. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0611574104>
6. 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**. P. 11–18. doi: <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0388-4>
7. 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**. P. 520–531. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01291.x>
8. Perumal B.S., Sakharkar K.R., Tak Kwong Chow V., Kanguane P., Sakharkar M.K. Intron position conservation across eukaryotic lineages in tubulin genes. *Front. Biosci.* 2005. **10**. P. 2412–2419.
9. 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. P. 281–291. doi: <https://doi.org/10.1139/g03-132>

10. 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. Int.* 2018. doi: <https://doi.org/10.1002/cbin.11001>
11. Ovechkina Y., Oakley Berl R. Gamma tubulin in plant cells. *Methods Cell Biol.* 2001. **67**. P. 195–212. doi: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)67014-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)67014-6)
12. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012. **28**. P. 1166–1167. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
13. Sambrook J.F., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. P. 763.
14. Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudin J.-P. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver-staining method to detect SSR markers in polyacrylamidegels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006. **10**. № 2. P. 77–81.
15. 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. Genet.* 2018. **52**. № 1. P. 3–15.

Надійшло до редакції 10.10.2018

## REFERENCES

1. Wang, X., Zhao, X., Zhu, J. & Wu, W. (2005). Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.*, 12, pp. 417-427. doi: <https://doi.org/10.1093/dnares/dsi019>
2. Rabokon, A. N., Demkovych, A. Ye., Pirko, Ya. V. & Blume, Ya. B. (2015). Intron length polymorphism of  $\beta$ -tubulin gene as an effective tool for genotyping of plants. *Mol. Appl. Genet.* (Minsk), 19, pp. P. 35-44 (in Russian).
3. Morello, L., Breviario, D. (2008). Plant spliceosomal introns: not only cut and paste. *Curr. Genom.*, 9, pp. 227-238. doi: <https://doi.org/10.2174/138920208784533629>
4. Braglia, L., Manca, A., Mastromauro, F. & Breviario, D. (2010). cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity*, 2, pp. 572-585. doi: <https://doi.org/10.3390/d2040572>
5. Thomas, B. C., Rapaka, L., Lyons, E., Pedersen, B., & Freeling, M. (2007). Arabidopsis intragenomic conserved noncoding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, pp. 3348-3353. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0611574104>
6. Li, X., Tan, L., Wang, L., Hu, S. & Sun, C. (2009). Isolation and characterization of conserved non-coding sequences among rice (*Oryza sativa* L.) paralogous regions. *Mol. Genet. Genomics*, 281, pp. 11-18. doi: <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0388-4>
7. Ferreira, A. O., Cardoso, H. G., Macedo, E. S., Breviario, D. & Arnholdt-Schmitt, B. (2009). Intron polymorphism pattern in AOX1b of wild St John's wort (*Hipericum perforatum*) allows discrimination between individual plants. *Physiol. Plant.*, 137, pp. 520-531. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01291.x>
8. Perumal, B. S., Sakharkar, K. R., Tak Kwong Chow, V., Kanguane, P. & Sakharkar, M. K. (2005). Intron position conservation across eukaryotic lineages in tubulin genes. *Front. Biosci.*, 10, pp. 2412-2419.
9. Bardini, M., Lee, D., Donini, P., Mariani, A., Giani, S., Toschi, M., Lowe, C. & Breviario, D. (2004). Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome*, 47, No. 2. P. 281-291. doi: <https://doi.org/10.1139/g03-132>
10. Pydiura, N., Pirko, Ya., Galinousky, D., Postovoitova, A., Yemets, A., Kilchevsky, A. & Blume, Ya. (2018). Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterisation of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). *Cell Biol. Int.* doi: <https://doi.org/10.1002/cbin.11001>
11. Ovechkina, Y. & Oakley Berl, R. (2001). Gamma tubulin in plant cells. *Methods Cell Biol.*, 67, pp. 195-212. doi: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(01\)67014-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(01)67014-6)
12. Okonechnikov, K., Golosova, O. & Fursov, M. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28, pp. 1166-1167. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
13. Sambrook, J. F. & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

14. Benbouza, H., Jacquemin, J.-M. & Baudin, J.-P. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silverstaining method to detect SSR markers in polyacrylamidegels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 10, No. 2. P. 77-81.
15. Rabokon, A. N., Pirko, Ya. V., Demkovych, A. Ye. & Blume, Ya. B. (2018). Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of  $\beta$ -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.*, 52, No. 1, pp. 3-15.

Received 10.10.2018

Я.В. Пирко, Д.Д. Буй, А.С. Постовойтова,  
А.М. Рабокоть, Л.А. Калафат, Я.Б. Блюм

ГУ “Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины”, Киев  
E-mail: yarvp1@gmail.com

#### ПОЛИМОРФИЗМ ДЛИНЫ ИНТРОНОВ ГЕНОВ $\gamma$ -ТУБУЛИНА КАК НОВЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ

Предложена новая маркерная система для оценки генетического разнообразия растений, которая основана на оценке полиморфизма длины интронов генов  $\gamma$ -тубулина. Разработана пара вырожденных праймеров к генам  $\gamma$ -тубулина на основе особенностей их экзон-интронной структуры. Показана простота и универсальность использования маркерной системы в молекулярно-генетическом анализе растений на примере видов и сортов *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*.

**Ключевые слова:**  $\gamma$ -тубулин, ген, интрон, длина интронов, полиморфизм, молекулярно-генетические маркеры.

Ya. V. Pirko, D. D. Buy, A. S. Postovoi tova,  
A. M. Rabokon, L. O. Kalafat, Ya. B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine, Kiev  
E-mail: yarvp1@gmail.com

#### NEW ILP METHOD BASED ON $\gamma$ -TUBULIN GENES INTRON LENGTH POLYMORPHISM

A new marker system for the estimation of a genetic diversity based on the  $\gamma$ -tubulin genes intron length polymorphism is proposed. A pair of degenerate primers to  $\gamma$ -tubulin genes was developed based on the characteristics of their exon-intron structures. The simplicity and versatility of the marker system in the molecular-genetic analysis of plants are demonstrated on species and varieties of *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Solanum tuberosum*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*.

**Keywords:**  $\gamma$ -tubulin, gene, intron, length of introns, polymorphism, molecular genetic markers.