

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.02.078>

УДК 575.22:577.21

А.С. Постовойтова, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Київ

E-mail: yarvp1@gmail.com, nastya.postovoytova@gmail.com

Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний засіб генетичного профілювання злакових (*Poaceae* L.)

Представлено академіком НАН України Я.Б. Блюмом

Вперше проведено генетичне профілювання різних генотипів злакових культур (пшениці, ячменю та рису) шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Виявлено відмінності між сортами пшениці, ячменю, а вибірку сортів рису охарактеризовано як генетично мономорфну. Доведено можливість застосування оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для проведення молекулярно-генетичного аналізу представників родини злакових, які є типовими однодольними.

Ключові слова: *гени актину, поліморфізм довжини інтронів, генетичне профілювання, злаки.*

Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів (intron length polymorphism (ILP)) як новий підхід для вивчення генетичного різноманіття рослин набуває все більшого практичного застосування [1–4]. Універсальність, відтворюваність та інформативність ILP-маркерів дають змогу проводити ДНК-профілювання та генотипування рослин з ефективністю, яка порівнюється із застосуванням мікросателітних (SSR)-маркерів [5–8]. Однією з надійних ILP-маркерних систем, яка набуває все більшого поширення, є метод оцінки довжини інтронів тубуліну (tubulin based polymorphism (TBP)), запропонований Д. Брев'яріо зі співавт. у 2004 р. [9]. Цей метод дає можливість оцінити поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну – однієї із субодиниць тубуліну, який формує мікротрубочки в клітинах усіх еукаріотичних організмів. У результаті апробування TBP-маркерів нами було продемонстровано ефективність їх застосування в молекулярно-генетичному аналізі диких та культурних злаків [10, 11], видів та сортів льону [7, 12] тощо.

Зважаючи на той факт, що інший цитоскелетний білок – актин, який формує мікрофіламенти, є ще більш висококонсервативним, ніж β -тубулін, нами була запропонована і вже експериментально охарактеризована ILP-маркерна система, яка дає змогу оцінити поліморфізм довжини інтронів саме генів актину [8]. У попередніх роботах вже було показано можливість застосування цієї системи для молекулярно-генетичного аналізу представників роду *Linum* L. та родини пасльонових (*Solanaceae*) [8, 13]. Виходячи з цих результатів

Рис. 1. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у різних сортів пшениці (*T. aestivum* L.) (прямокутниками позначені зони, що містять поліморфні фрагменти з інтронами генів актину): 1 – Черемшина; 2 – Елегія; 3 – Етюд; 4 – X 12; 5 – Retown; 6 – Недра; 7 – Selkirk (Канада); M – ДНК-маркер

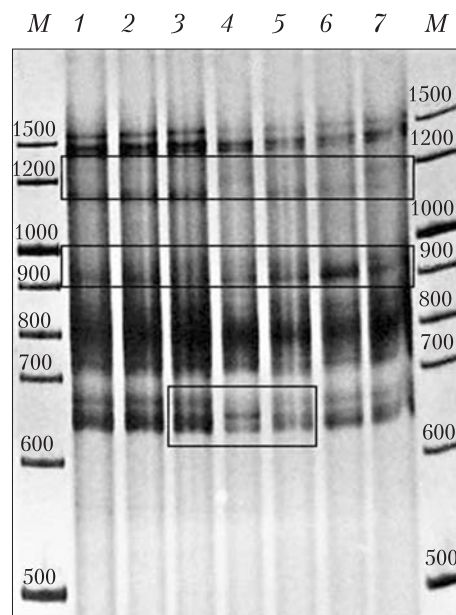
було поставлено мету здійснити генотипування та диференціацію сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.) та рису (*Oryza sativa* L.), як цінних сільськогосподарських культур, що належать до злаків, за допомогою оцінки поліморфізму інтронів генів актину.

Усього в роботі досліджено 7 сортів ярої пшениці (*T. aestivum*), 29 сортів ячменю (*H. vulgare*) та 6 сортів рису посівного (*O. sativa*). Геномну ДНК виділяли з проростків за допомогою методу із використанням цетилтриметиламонію броміду (ЦТАБ) [14]. Для оцінки поліморфізму інтронів генів актину попередньо були розроблені та синтезовані вироджені праймери для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), які дають можливість оцінити поліморфізм довжини II інтрону генів актину у рослин: ActIn_F: 5'-TGG CAT CAY ACN TTY TAC AAY GA-3'; ActIn_R: 5'-CCM CCA CTT DAG VAC RAT GTT-3' [8].

Протокол проведення ПЛР був таким: початкова денатурація (95 °C) – 3 хв; 40 циклів ампліфікації (денатурація (95 °C) – 45 с, відпал праймерів (59 °C) – 45 с, елонгація (72 °C) – 1 хв); кінцева елонгація: 72 °C – 7 хв, 10 °C – утримання. Продукти ПЛР розділяли, використовуючи електрофорез в 6 %-му неденатуруючому поліакриламідному гелі в TBE-буфері [14].

Використання для ампліфікації інтронів генів актину універсальних ПЛР-праймерів дало змогу отримати видоспецифічні ДНК-профілі та генотипувати досліджувані сорти пшениці (рис. 1). Фрагменти ДНК, які містили інтрони генів актину, розподілялися в діапазоні від 600 до 1500 п. н. Загалом більшість утворених фрагментів ДНК виявилися монорфними, однак на рис. 1 відмічено три поліморфні зони (виділено прямокутниками). У сорту X 12 (зразок 4) відсутній фрагмент ДНК завдовжки близько 676 п. н., що вирізняє ДНК-профіль цього сорту пшениці серед усіх інших. Поліморфна смуга спостерігається в межах від 900 до 1000 п. н., де містяться фрагменти ДНК з довжиною близько 932 та 964 п. н. Ще одна поліморфна зона візуалізується у межах 1139–1204 п. н.

У більшості проаналізованих сортів пшениці, а саме Черемшина, Елегія, Етюд, Retown та Недра (зразки 1–3, 5, 6), виявлено лише один фрагмент завдовжки близько 1139 п. н. Для сорту X 12 (зразок 4) спостерігається фрагмент завдовжки близько 1204 п. н., а для сорту Selkirk (зразок 7) відмічена поява одночасно двох фрагментів (1139 та 1204 п. н.), що вирізняє саме цей сорт пшениці серед усіх інших. Загалом у проаналізованих сортів пшениці виявлено чотири різні алельні фенотипи, з яких унікальні алельні фенотипи мали сорти X 12 та Selkirk. Значення PIS становило 0,69, що свідчить про досить високий рівень поліморфізму в даній вибірці сортів пшениці.



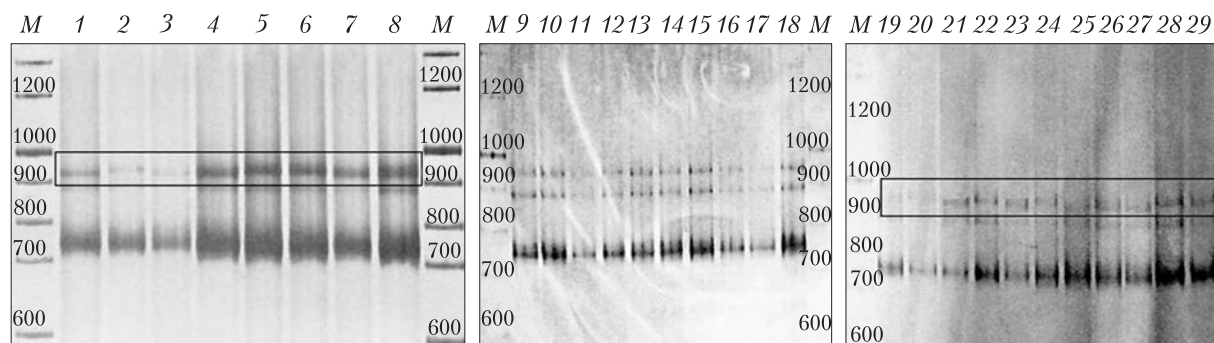


Рис. 2. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у досліджених сортів ячменю (*H. vulgare* L.) (прямокутниками позначені зони, що містять поліморфні фрагменти з інтронами генів актину): 1 – Паллідум 32; 2 – Медікум 46; 3 – Одеський 9; 4 – Одеський 14; 5 – Одеський 18; 6 – Южний; 7 – Степовий; 8 – Нутанс 106; 9 – Південний; 10 – Гетьман; 11 – Оболонь; 12 – Чудовий; 13 – Чарівний; 14 – Чорноморець; 15 – Нутанс 244; 16 – Славутич; 17 – Одеський 70; 18 – Нутанс 518; 19 – Незалежний; 20 – Едем; 21 – Престиж; 22 – Одеський 131; 23 – Итіль; 24 – Одеський 82; 25 – Одеський 69; 26 – Одеський 36; 27 – Романтик; 28 – Тайфун; 29 – Одеський 115; М – ДНК-маркер

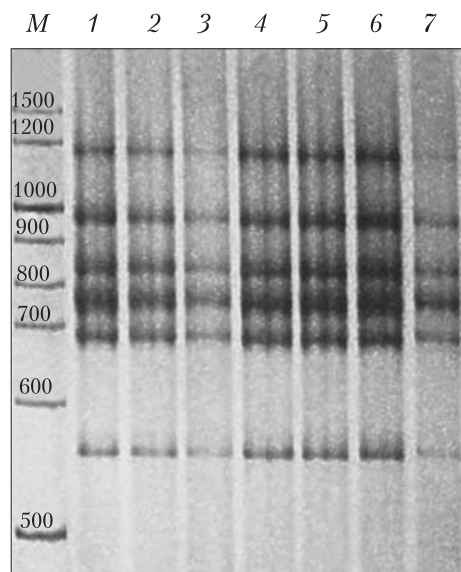


Рис. 3. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у рису посівного (*Oryza sativa*): 1 – *O. sativa japonica*; 2 – YIP-4970; 3 – YIP-4558; 4 – Лазурит; 5 – Віконт; 6 – Преміум; 7 – Консул; М – ДНК-маркер

У подальшому за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину було проведено генетичне профілювання сортів ячменю (*H. vulgare*). Результати аналізу свідчать про стабільне утворення ДНК-профілів зі специфічними фрагментами ДНК, що містять інтрони генів актину (рис. 2).

Загалом для кожного проаналізованого сорту ячменю характерним є утворення трьох фрагментів. Утворені амплікони, що містять інтрони генів актину, розподілялися в межах від 700 до 1000 п. н. Довжина мономорфних фрагментів ДНК становила близько

769 та 884 п. н. Поліморфізм довжини інтронів виявлений лише в межах верхньої смуги фрагментів. Для більшості проаналізованих сортів ячменю були характерні амплікони розміром близько 938 п. н. Це стосується, насамперед, сортів Медікум 46, Одеський 18, Южний, Нутанс 106, Південний, Гетьман тощо. У сортів Паллідум 32, Одеський 9, Одеський 14, Степовий, Престиж та інших виявлено фрагмент ДНК завдовжки 908 п. н. За результатами аналізу сортової вибірки ячменю встановлено наявність двох різних алейних фенотипів. Значення РІС становило 0,43, що свідчить про достатній рівень поліморфізму в проаналізованій вибірці сортів ячменю.

Також нами проведено аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у шести сортів рису посівного (*O. sativa*) української селекції та одного з підвидів рису, а саме *O.*

sativa japonica (рис. 3). У всіх проаналізованих зразках рису посівного амплікони, що містять інтрони генів актину, варіювали в діапазоні від 500 до 1200 п. н. (див. рис. 3). Розміри фрагментів ДНК мали довжину близько 560, 708, 770, 840, 963 та 1191 п. н. Усі досліджувані сорти рису виявилися генетично гомогенними за даним видом ДНК-маркерів, оскільки не було визначено жодної поліморфної зони та охарактеризований лише один алейний фенотип.

Отже, у результаті генетичного профілювання і генотипування сортів таких злаків, як пшениця, ячмінь та рис, проведеного шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, отримано чіткі ДНК-профілі кожного з проаналізованих сортів. Кількість алейних фенотипів у вибірках сортів пшениці, ячменю та рису становила чотири, два та один відповідно. Загалом поліморфізм довжини інтронів генів актину виявлений у сортах пшениці та ячменю, які були охарактеризовані як генетично гетерогенні. Водночас, сорти рису виявилися генетично однорідними за даним видом ДНК-маркерів. Таким чином, оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину може бути використана як додатковий інструмент для генетичного профілювання та диференціації сортів злакових культур.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Jaikishan I., Rajendrakumar P., Madhusudhana R., Elangovan M., Patil J.V. Development and utility of PCR-based intron polymorphism markers in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 2015. **18**. P. 309–318.
2. Muthamilarasan M., Venkata Suresh B., Pandey G., Kumari K., Parida S.K., Prasad M. Development of 5123 intron-length polymorphic markers for large-scale genotyping applications in foxtail millet. *DNA Res.* 2013. **21**, № 1. P. 41–52.
3. 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**, № 6. P. 417–427.
4. Yang L., Jin G., Zhao X., Zheng Y., Xu Z., Wu W. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics.* 2007. **23**, № 16. P. 2174–2177.
5. Huang L., Cao H., Yang L., Yu Y., Wang Y. Large-scale development of PIP and SSR markers and their complementary applied in *Nicotiana*. *Russ. J. Genet.* 2013. **49**. P. 827–838.
6. Xia X., Luan L.L., Qin G., Yu L.F., Wang Z.W., Dong W.C., Song Y., Qiao Y., Zhang X.S., Sang Y.L., Yang L. Genome-wide analysis of SSR and ILP markers in trees: diversity profiling, alternate distribution, and applications in duplication. *Sci. Rept.* 2017. **7**, № 1. P. 1–10. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17203-6>
7. Rabokon A.N., Pirko Ya.V., Demkovich 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. P. 3–15.
8. Postovoiyova 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. Genet.* 2018. **52**, № 6. P. 448–460.
9. Bardini M., Lee D., Donini P., Mariani A., Giani S., Toschi M., Lowe C., Breviaro 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.
10. Рабоконь 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. **17**. С. 82–86.
11. 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>

12. Рабокoнь А.М., Дeмкoвич А.Е., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. **19**. С. 43–46.
13. Постовойтова А.С., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Поліморфізм інтронів генів актину як інструмент генотипування представників родини *Solanaceae*. *Наук. вісн. НУБіП*. 2018. **287**. С. 70–78.
14. Sambrook J.F., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2100 p.

Надійшло до редакції 21.01.2019

REFERENCES

1. Jaikishan, I., Rajendrakumar, P., Madhusudhana. R., Elangovan, M. & Patil, J.V. (2015). Development and utility of PCR-based intron polymorphism markers in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *J. Crop Sci. Biotechnol.*, 18, pp. 309-318.
2. Muthamilarasan, M., Venkata Suresh, B., Pandey, G., Kumari, K., Parida, S.K. & Prasad, M. (2013). Development of 5123 intron-length polymorphic markers for large-scale genotyping applications in foxtail millet. *DNA Res.*, 21, No. 1, pp. 41-52.
3. 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, No. 6, pp. 417-427.
4. Yang, L., Jin, G., Zhao, X., Zheng, Y., Xu, Z. & Wu, W. (2007). PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics*, 23, No. 16, pp. 2174–2177.
5. Huang, L., Cao, H., Yang, L., Yu, Y. & Wang, Y. (2013). Large-scale development of PIP and SSR markers and their complementary applied in *Nicotiana*. *Russ. J. Genet.*, 49, pp. 827-838.
6. Xia, X., Luan, L. L., Qin, G., Yu, L. F., Wang, Z.W., Dong, W.C., Song, Y., Qiao, Y., Zhang, X. S., Sang, Y. L. & Yang L. (2017). Genome-wide analysis of SSR and ILP markers in trees: diversity profiling, alternate distribution, and applications in duplication. *Sci. Rept.*, 7, No. 1, pp. 1-10. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17203-6>
7. Rabokon, A.N., Pirkov, Ya.V., Demkovich, A.Ye. & Blume, Ya.B. (2018). Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. *Cytol. Genet.*, 52, No. 1, pp. 3-15.
8. Postovoytova, A.S., Yotka, O.Yu., Pirkov, Ya.V. & Blume, Ya.B. (2018). Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci. *Cytol. Genet.*, 52, No. 6, pp. 448-460.
9. Bardini, M., Lee, D., Donini, P., Mariani, A., Giani, S., Toschi, M., Lowe, C. & Breviaro, 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, pp. 281-291.
10. Rabokon, A.N., Demkovich, A.E., Pirkov, Ya.V. & Blume, Ya.B. (2015). Studing of β -tubulin gene intron length polymorphizm of *Triticum aestivum* L. and *Hordeum vulgare* L. varieties. *Factors Exp. Evol. Organisms*, 17, pp. 82-86 (in Ukrainian).
11. Rabokon, A., Demkovich, A., Sozinov, A., Kozub, N., Pirkov, Ya. & Blume, Ya. (2017). Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. *Cell Biol. Int.* doi: <https://doi.org/10.1002/cbin.10886>
12. Rabokon, A.N., Demkovich, A.Ye., Pirkov, Ya.V. & Blume, Ya.B. (2016). Studying of intron length polymorphism of β -tubulin genes in plants of genus *Linum* L. *Factors Exp. Evol. Organisms*, 19, pp. 43-46 (in Ukrainian).
13. Postovoytova, A.S., Pirkov, Ya.V. & Blume, Ya.B. (2018). Polymorphism of actin gene introns as an instrument for genotyping of the representatives from *Solanaceae* family. *Sci. Bull. NUBiP*, 287, pp. 70-78 (in Ukrainian).
14. Sambrook, J.F. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Vol. 3). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Received 21.01.2019

А.С. Постовойтова, Я.В. Пирко, Я.Б. Блюм

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

ПОЛИМОРФИЗМ ДЛИНЫ ИНТРОНОВ ГЕНОВ АКТИНА
КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ГЕНЕТИЧЕСКОГО
ПРОФИЛИРОВАНИЯ ЗЛАКОВЫХ (*POACEAE* L.)

Впервые проведено генетическое профилирование различных генотипов злаковых культур (пшеницы, ячменя и риса) путем оценки полиморфизма длины интронов генов актина. Обнаружены различия между сортами пшеницы, ячменя, а выборка сортов риса охарактеризована как генетически мономорфная. Показана возможность использования оценки полиморфизма длины интронов генов актина для проведения молекулярно-генетического анализа представителей семейства злаковых, являющихся типичными однодольными.

Ключевые слова: гены актина, полиморфизм длины интронов, генетическое профилирование, злаки.

A.S. Postovoytova, Ya.V. Pirko, Ya.B. Blume

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

INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF ACTIN GENES
AS THE EFFICIENT TOOL FOR AN GENETIC PROFILING
OF SELECTED CEREALS FROM THE GRASS (*POACEAE* L.) FAMILY

The genetic profiling of wheat, barley and rice varieties was carried out by evaluating the intron length polymorphism of the actin genes for the first time. The differences were found between the wheat and barley varieties, and a sample of rice varieties was characterized as genetically monomorphic. In general, the possibility of using the assessment of the intron length polymorphism of the actin genes for the molecular genetic analysis of the grass family (*Poaceae* L.) has been proved.

Keywords: actin genes, intron length polymorphism, genetic profiling, *Poaceae* L.