

ПОСТОВОЙТОВА А.С.¹✉, ЙОТКА О.Ю.², ПІРКО Я.В.¹, БЛЮМ Я.Б.¹¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: nastya.postovoytova@gmail.com

² Інститут луб'яних культур НААН України,

Україна, 41400, Сумська обл., м. Глухів, вул. Терещенків, 45, e-mail: flax-dslk@ukr.net

✉nastya.postovoytova@gmail.com

**ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИН ІНТРОНІВ ГЕНІВ АКТИНУ У РІЗНИХ СОРТІВ
ЛЬОНУ-ДОВГУНЦЯ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ**

Льон звичайний або льон-довгунець (*Linum usitatissimum* L.) – одна з найбільш поширених сільськогосподарських культур України, історія використання якої людством нараховує понад 8000 років [1]. Сьогодні льон є джерелом сировини для харчової промисловості, лікарських препаратів та текстильної продукції. Зокрема лляна олія, вміст якої в насінні може досягати 40 %, є цінною харчовою добавкою через високий вміст вітамінів та жирних кислот. Зі стебел льону отримують волокно, що широко використовується для продукції різних видів тканин. Практичне використання має 95–98 % маси лляної рослини. Окрім того, льон є однорічною самозапильною трав'янистою культурою і зручним об'єктом для проведення різноманітних генетичних досліджень [2].

Рід *Linum*, до якого належить льон-довгунець, нараховує близько 200 видів та сотні різних сортів. Саме тому важливим є застосування ефективних методів їх генетичного аналізу та генотипування. Ефективним інструментом для ідентифікації генотипів є фінгерпринтинг, заснований на використанні молекулярно-генетичних маркерів [3]. Молекулярні маркери можуть бути зв'язані як з кодуєчими, так і з некодуєчими ділянками геному. Деякі з них мають високу поліморфність, кодомінантність, відтворюваність, високу чутливість тощо, що робить їх важливим та інформативним інструментом для швидкої ідентифікації генотипів рослин [4].

Одним з перспективних напрямків молекулярно-генетичного аналізу є підхід, який базується на вивченні поліморфізму довжин інтронів різноманітних генів (ILP, intron length polymorphism) [5]. Відомо, що екзони часто є доволі консервативними ділянками генів, а в інтронах відбувається більша частина мутацій, пов'язаних з інсерціями та делеціями нуклеотидів. Зважаючи на це, саме некодуєчі ділянки

геному можуть бути джерелом поліморфізму, який доступний для оцінки за допомогою специфічних молекулярних маркерів. Важливою передумовою застосування цього підходу є пошук консервативних ділянок екзонів генів, що оточують певний інтрон, для подальшого підбору до них праймерів таким чином, щоб під час полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) можна було б отримати копії послідовностей інтронів [6, 7].

Подібна маркерна система для оцінки поліморфізму довжин інтронів розроблена для генів β-тубуліну (TBP, tubulin-based polymorphism) [8, 9]. TBP-метод заснований на тому, що, завдяки ключовій ролі β-тубуліну як основного білка мікротрубочок [10], послідовності екзонів генів, котрі кодуєють ці білки, є досить консервативними ділянками геномів усіх еукаріотичних організмів, включаючи рослини. Тому довжини першого інтрону генів β-тубуліну у різних видів рослин варіюють у доволі широких межах, що може бути оцінено за допомогою TBP-аналізу [11].

Раніше також було показано перспективність використання інтронів генів актину як джерела оцінки генетичного поліморфізму. Актин – основний білок мікрофіламентів цитоскелету, що виконує ряд життєво важливих функцій [12]. Як і у випадку з β-тубуліном, можна передбачити значний рівень консервативності нуклеотидних послідовностей, які кодуєють цей білок. Зокрема, раніше нами вже було продемонстровано, що, наприклад, інтрони генів актину у *L. usitatissimum* є одними з найбільш гіперваріабельних ділянок геномів (за високої консервативності самих кодуєчих актин послідовностей), що робить їх зручним об'єктом розроблення системи молекулярних маркерів для оцінки генетичного поліморфізму різних видів рослин [13].

На сьогодні для генетичної диференціації різних видів та генотипів льону широко застосовують різноманітні молекулярно-генетичні методи: SSR, ISSR, RAPD [14, 15]. Але нещодавно для генотипування різних видів та генотипів представників роду *Linum L.* почали використовувати маркери, засновані на вивченні послідовностей конкретних генів, а саме інтронів генів β -тубуліну (TBP-метод) та тих, що кодуєть актин (ABP – actin based polymorphism) [16, 17]. Саме тому метою нашого дослідження було розроблення та впровадження власної системи молекулярно-генетичних маркерів, які ґрунтуються на мінливості генів актину льону, а також виявлення поліморфізму довжини інтронів цих генів у різних сортів льону-довгунця української селекції.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були 16 сортів льону-довгунця української селекції з колекції Інституту луб'яних культур НААН України, а саме сорти Есмань, Зоря 87, Сіверський, Камінь, Журавка, Іванівський, Вручий, Глазур, Міандр, Рушничок, Гладіатор, Надія, Чарівний, Глобус, Глінум та Глухівський ювілейний. Геному ДНК виділяли з семиденних рослинних проростків за допомогою ЦТАБ-методу [18]. Кількість виділеної ДНК перевіряли спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» (США) з визначенням її концентрації та використовуючи 1,5 %-ний агарозний гель. Зразки ДНК зберігали при -20°C .

За допомогою біоінформаційного аналізу було підібрано 3 пари специфічних праймерів для оцінки поліморфізму довжин інтронів генів актину *L. usitatissimum*:

Lus_Act-F:

5'-GGATGACATGGAGAAAATCTGGCAT-3'

Lus_Act-R:

5'-GAGTTGTACGTGGTCTCGTGGAT-3';

Lus10040826-F:

5'-GGA CGA TAT GGA GAA AAT TTG GCA T-3'

Lus10040826-R:

5'-GAG TTG TAG GTA GTT TCG TGG AT-3';

Lus10016259-F:

5'-GGA TGA CAT GGA GAA AAT CTG GCA T-3'

Lus10016259-R:

5'-GAG TTG TAA GTG GTT TCG TGG AT-3'.

Праймери Lus_Act-F та Lus_Act-R були підібрані до двох консенсусних послідовностей екзонів генів актину (Lus10021057 та Lus10029286), отриманих за допомогою вирів-

нювання останніх у програмі CLUSTAL X [16]. Дві інші пари праймерів було підібрано до генів актину Lus10040826 та Lus10016259 відповідно.

ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила десятикратний ПЛР буфер з 200 мМ сульфатом амонію, 2,5 мМ MgCl_2 , 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мкМ кожного dNTPs, 0,5 од. Тақ полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили з використанням такого протоколу: початкова денатурація (95°C) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 95°C – 45 с, віджиг праймерів 63°C – 1 хв., подовження 72°C – 1 хв.), кінцеве подовження 72°C – 7 хвилин, 10°C – утримання. Кожну ПЛР-реакцію проводили як мінімум двічі, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації.

Зразок об'ємом 0,4 мкл, який містив продукти ампліфікації, розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1X TBE-буфері [18]. Візуалізацію фрагментів здійснювали за допомогою забарвлення їх нітратом срібла [19]. Цифрові зображення гелів аналізували, використовуючи програму GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Для визначення довжин фрагментів застосовували ДНК-маркер молекулярної маси (O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати та обговорення

Результати попередніх досліджень свідчать про наявність у геномі *L. usitatissimum* 13 гомологів генів актину [13]. Для оцінки поліморфізму довжин інтронів деяких із цих послідовностей було підібрано три пари специфічних праймерів до консервативних ділянок екзонів так, щоб отримати в подальшому багатократну ампліфікацію інтронів. На рис. А представлена електрофореграма з результатами аналізу 15 з 16 сортів льону-довгунця української селекції за локусами Lus10021057 та Lus10029286. Основні зони розподілу фрагментів знаходяться в діапазоні від 700 до 1000 п. н. На електрофореграмі наявні дві чіткі смуги ампліконів. Верхня смуга містить фрагменти довжиною близько 913 п. н., і в цій зоні відсутній будь-який поліморфізм. Передбачається, що амплікони цієї смуги належать інтронам гена актину Lus10029286. В межах нижньої смуги присутні фрагменти різної

довжини, що, ймовірно, відповідають інтрону гена Lus10021057 (зона виділена прямокутником). Для сортів Есмань, Зоря 87, Сіверський, Каменяр, Журавка, Іванівський, Глазур, Міандр, Рушничок, Гладіатор характерний амплікон довжиною 820 п. н., для сортів Каменяр, Надія

та Глобус – 800 п. н., і лише сорти Чарівний, Вручий та Глінум мають фрагмент 780 п. н. Варто зазначити, що отримані дані в цілому узгоджуються з результатами, описаними нами раніше для інших сортів льону [16].

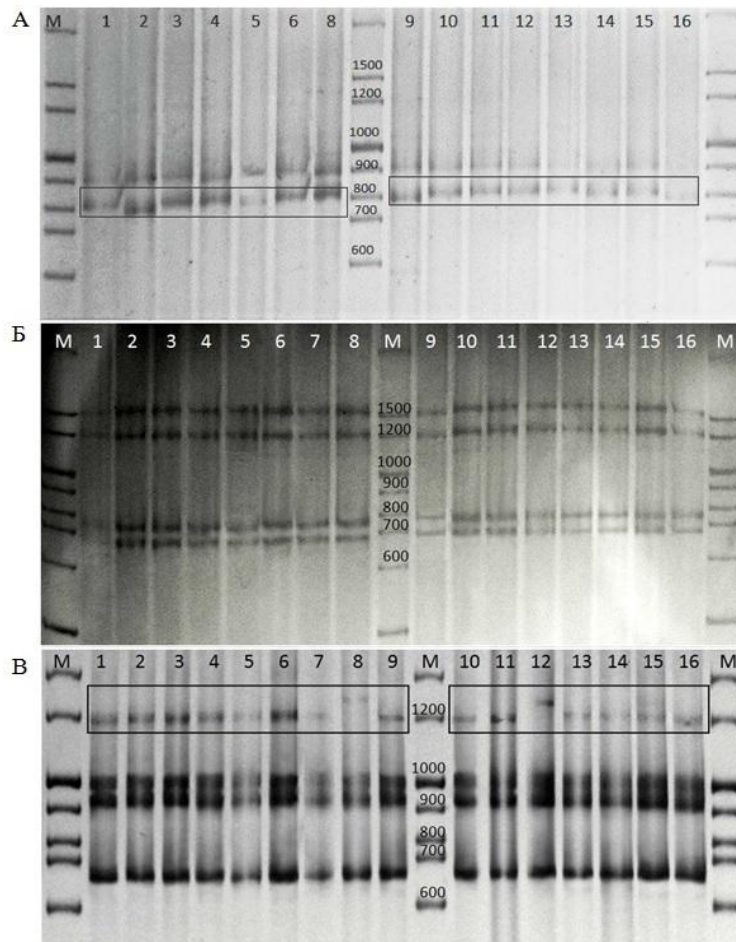


Рис. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у різних сортів льону-довгунця *L. usitatissimum* української селекції, отриманими під час ПЛР з використанням праймерів до генів актину: Lus10021057 та Lus10029286 (А), Lus10040826 (Б), Lus10016259 (В); М – маркер; 1 – 16 (у верхній частині рисунків) – номери зразків: 1 – Есмань, 2 – Чарівний, 3 – Зоря 87, 4 – Сіверський, 5 – Каменяр, 6 – Журавка, 7 – Глухівський ювілейний, 8 – Іванівський, 9 – Вручий, 10 – Глазур, 11 – Міандр, 12 – Рушничок, 13 – Гладіатор, 14 – Надія, 15 – Глобус, 16 – Глінум; прямокутником виділені поліморфні зони.

На рис. Б наведено електрофореграму, що ілюструє результати аналізу сортів льону-довгунця з використанням праймерів до гена актину, закодованого в локусі Lus10040826. Фрагменти, що утворюються, варіюють у діапазоні від 676 до 1530 п. н. Кожен із досліджених сортів на електрофореграмах мав по 4 амплікони: 676, 750, 1265 та 1530 п. н. Зважаючи на попередньо проведений біоінформаційний аналіз для гена Lus10040826, в результаті ПЛР пе-

редбачалося отримати фрагмент розміром 676 п. н. Окрім цього фрагмента, під час ампліфікації утворилися ще три амплікони, які також потенційно можуть бути фрагментами генів актину. Однак це питання потребує подальших додаткових досліджень.

Електрофореграма на рис. В відображає результати аналізу всіх 16 сортів льону-довгунця з використанням праймерів до гена, закодованого в локусі Lus10016259. Загалом для

кожного зразка отримано по чотири фрагменти довжиною 676, 926, 990 та 1210 п. н. або 1274 п. н. (поліморфна зона виділена прямокутником). Більшість сортів мають фрагмент 1210 п. н., однак для сортів Іванівський та Рушничок характерний амплікон 1274 п. н. За результатами попереднього біоінформаційного аналізу очікувалося отримати фрагмент розміром 926 п. н. Отже амплікон розміром 933 п. н. краще за всіх відповідає ділянці гена *Lus10016259*, що містить другий інтрон. Чотири інші фрагменти, імовірно, також є інтронами генів актину, зокрема фрагмент 676 п. н. відповідає інтрону гена *Lus10040826*. Можливе походження фрагментів 1274, 1210 та 990 п. н. потребує додаткового аналізу.

Загалом результати проведених досліджень 16 сортів льону української селекції дозволили виявити поліморфізм інтронів генів актину за двома локусами (*Lus10021057* та *Lus10016259*). Варто зазначити, що нам вперше

вдалося отримати стабільну ампліфікацію інтронів генів актину, закодованих у локусах *Lus10040826* та *Lus10016259*. Походження деяких фрагментів, утворених під час ПЛР із специфічними праймерами, потребує додаткового аналізу.

Висновки

У результаті проведених досліджень встановлено, що метод, який базується на виявленні поліморфізму довжин інтронів генів актину, може слугувати як інформативне джерело для генетичної диференціації різних генотипів рослин і може бути застосований разом з іншими молекулярно-генетичними маркерами для фінгерпринтингу окремих таксономічних груп. Результати аналізу 16 сортів льону-довгунця української селекції демонструють здатність цього методу виявляти відмінності між різними сортами льону.

Література

1. Karg S., Hist V. New research on the cultural history of the useful plant *Linum usitatissimum* L. (flax), a resource for food and textiles for 8,000 years // *Archaeobot.* – 2011. – V. 20. – P. 507–508.
2. Jhala A.J., Hall L.M. Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current uses and future applications // *Austral. J. Basic Appl. Sci.* – 2010. – V. 4 (9). – P. 4304–4312.
3. Лемеш В.А. Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов // *Мол. и прикл. генетика: Сб. науч. тр.* – 2008. – Т. 8. – С. 94–104.
4. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // *Экол. генетика.* – 2011. – Т. 9. – С. 32–43.
5. 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. – V. 12. – P. 417–427.
6. Breviario D., Giani S., Ponzoni T., Mastromauro F., Morell L. Plant tubulin intronics // *Cell Biol. Int.* – 2008. – V. 32. – P. 571–573.
7. 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. – V. 2. – P. 572–585.
8. Рабокоть А.Н., Пирко Я.В., Демкович А.Е., Блюм Я.Б. Поліморфізм довжин інтронів генів бета-тубуліна як ефективний інструмент генотипування рослин // *Мол. и прикл. генетика: Сб. науч. тр.* – 2015. – Т. 19. – С. 35–44.
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. – V. 47. – P. 281–291.
10. Nick P. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants // *Int. Rev. Cytol.* – 1998. – V. 184. – P. 33–80.
11. McKean P.G., Vaughan S., Gull K. The extended tubulin superfamily // *J. Cell Sci.* – 2001. – V. 114. – P. 2723–2733.
12. McCundy D.W., Kovar D.R., Staiger C.J. Actin and actin-binding proteins in higher plants // *Protoplasma.* – 2011. – V. 215. – P. 89–104.
13. Поставойтова А.С., Баєр Г.Я., Пидюра М.О., Пастухова Н.Л., Пирко Я.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Пошук та аналіз послідовностей генів актину в геномі льону [Електронний ресурс] // *Наукові доповіді НУБіП.* – 2015. – Т. 8 (57). – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/index.html.
14. Gupta P.K., Rustgi S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants // *Funct. Integr. Genomics.* – 2004. – V. 4. – P. 62–139.
15. Schulman A.H. Molecular markers to assess genetic diversity // *Euphytica.* – 2007. – V. 158. – P. 313–321.
16. Поставойтова А.С., Пирко Я.В., Блюм Я.Б. Поліморфізм довжин другого інтрону генів актину в геномі *Linum usitatissimum* L. // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – К.: Логос, 2016. – Т. 19. – С. 38–42.
17. Рабокоть А.Н., Демкович А.Е., Пирко Я.В., Блюм Я.Б. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – К.: Логос, 2016. – Т. 19. – С. 43–46.
18. Sambrook J., David W.R. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* // Cold Spring Harbor. – 2001. – V. 2. – 763 p.
19. Rahman M.H., Jaquish B., Khalsa P.D. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2000. – V. 18. – P. 339–348.

POSTOVOITOVA A.S.¹, YOTKA O.Yu.², PIRKO Ya.V.¹, BLUME Ya.B.¹

¹ *Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: nastya.postovoytova@gmail.com*

² *Institute of Bast Crops, Nat. Acad. of Agr. Sci. of Ukraine, Ukraine, 41400, Sumy Region, Hlukhiv, Tereshchenkiv str., 45, e-mail: flax-dslk@ukr.net*

INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF ACTIN GENES IN DIFFERENT VARIETIES OF UKRAINIAN SELECTION FLAX

Aim. Intron length polymorphism (ILP) is an effective tool to identify genotypes and a reliable source of information with high interspecies and intraspecies variability. As the flax is one of the most widespread crops in Ukraine, to explore the various members of the genus *Linum* L. are very useful. The main aim of this paper is to develop of molecular genetic markers based on the variability of flax actin genes to detect intron length polymorphism in different varieties of Ukrainian selection flax. **Methods.** CTAB-method for the isolation of DNA was used. Intron length polymorphism was identified by PCR amplification with specific primers, electrophoretic analysis under non-denaturing polyacrylamide gel was done. **Results.** 16 varieties of Ukrainian selection flax have been analyzed. It was shown that polymorphic amplicons were available in analyzed plants. The lengths of fragments corresponding actin introns have varied from 676 bp to 1530 bp. **Conclusions.** The analysis of 16 varieties of Ukrainian selection flax demonstrated the ability of this method to detect the difference between genotypes at intraspecies level. From these results we can make a conclusion that method based on actin intron length polymorphism can be a source of useful information about genetic differentiation of taxonomic groups of plants.

Keywords: molecular marker, actin, ILP (intron length polymorphism), *Linum usitatissimum* L.