

РАБОКОНЬ А. М.[✉], БЛЮМ Р. Я., САХАРОВА В. Г., ГОРДИНСЬКИЙ С. О., БЛОНОЖКО Ю. О., ПІРКО Я. В., БЛЮМ Я. Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а, ORCID: 0000-0002-6249-1824, 0000-0003-4936-1803, 0000-0002-7335-8252, 0009-0005-7369-3359, 0000-0002-7099-0455, 0000-0003-1887-5406, 0000-0001-7078-7548

[✉] rabokonnastya@gmail.com

БАРКОДИНГ ЗЛАКІВ ШЛЯХОМ ОЦІНКИ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ γ -ТУБУЛІНУ

Мета. Отримання ДНК-профілів ряду типових злакових рослин за допомогою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів γ -тубуліну та оцінці можливості використання цього гена для ДНК-баркодингу рослинних об'єктів. **Методи.** У дослідженні використано різні види та сорти злаків рослин, зокрема пшениці, егілопсу, ячменю, рису. Використовували метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну. Ампліфіковані фрагменти ДНК розділяли за допомогою електрофорезу у неденатуруючому поліакриламідному гелі та візуалізували шляхом фарбування нітратом срібла. **Результати.** Отримано видоспецифічні ДНК-профілі проаналізованих злаків з ампліконів інтронів генів γ -тубуліну, що дозволило диференціювати види між собою. Дані фінгерпринтингу було використано для кластерного аналізу та побудови дендрограми. **Висновки.** Продемонстровано доцільність використання запропонованого методу для баркодингу злаків. ДНК-профілі досліджених рослин можуть бути успішно використані при оцінці якості таких харчових продуктів, як, зокрема, борошно.

Ключові слова: пшениця, егілопс, ячмінь, ДНК-баркодинг, γ -тубулін.

Родина Тонконогові або Злакові (*Poaceae* Varnhart.) є однією з найбільш чисельних і поширених таксономічних груп однодольних, яка включає найбільш важливі світові продовольчі культури, зокрема пшеницю, кукурудзу, рис, ячмінь, сорго, просо, овес та ін. Особливе місце займає пшениця, яка є однією з найважливіших сільськогосподарських культур не лише в Україні, а й в усьому Світі [1]. Однією з основних цілей культивування пшениці було і є її вирощування з метою отримання харчових продуктів, зокрема борошна. Окрім м'якої пшениці в

Україні в значних обсягах також культивуються й інші види, зокрема: пшениця тверда (*Triticum durum*), полба (*Triticum diccocosum*), спельта (*Triticum spelta*), пшениця польська (*Triticum polonicum*), карликова пшениця (*Triticum compactum*), тургідум (*Triticum turgidum*), тощо. Відповідно, кожна з цих культур має спеціалізоване використання, у тому числі й при виробництві різних типів борошна.

Наявність значної кількості морфологічно подібних (під)видів пшениці у сільському господарстві може призвести до контамінації насінневого матеріалу або вже безпосередньо при виробництві борошна. Окрім цього, кінцевий продукт переробки пшениці може бути контамінованим й іншими видами – як спорідненими до пшениці (напр., *Aegilops* sp.), так і більш віддаленими видами злаків (напр., *Hordeum* sp.). Борошно, зерно для якого було недостатньо очищене від контамінуючих видів у процесі виробництва, може мати неприйнятну якість або відхилення від заявлених стандартів і поживної цінності. Виявлення неякісних харчових продуктів є однією з найважливіших складових продовольчої та харчової безпеки країни.

Штрих-кодування ДНК (або ДНК-баркодинг, фінгерпринтинг) є новітньою технологією молекулярного розпізнавання, яке передбачає використання молекулярних маркерів для ідентифікації видів [2, 3]. Цей підхід знайшов застосування в ідентифікації видів, систематиці, дослідженні біорізноманіття і еволюції екологічних спільнот, захисті видів, ідентифікації археологічних зразків й інших аспектах [3, 4]. Крім того, цей метод може бути успішно використаним і для контролю якості харчових продуктів [5, 6]. Однак використання маркерів за одним з генів вважається малоефективним, тому зазвичай використовують їх комбінацію.

© РАБОКОНЬ А. М., БЛЮМ Р. Я., САХАРОВА В. Г., ГОРДИНСЬКИЙ С. О., БЛОНОЖКО Ю. О., ПІРКО Я. В., БЛЮМ Я. Б.

Метод оцінки поліморфізму довжини інтронів β -тубуліну вже успішно застосовувався для розрізнення різних видів і сортів рослин [7]. Перевагою цього підходу є те, що він дозволяє у рамках однієї ПЛР охопити велику кількість незчеплених локусів у різних ділянках геному. Однак, в окремих випадках довжина інтронів β -тубуліну може варіювати в межах одного виду. З огляду на це, нами було запропоновано метод оцінки поліморфізму довжини інтронів більш консервативного γ -тубуліну. У попередніх дослідженнях було показано, що за допомогою цього підходу можна успішно розрізняти види рослин [8].

Тому метою цього дослідження було отримати ДНК-профілі ряду типових злакових культур за допомогою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів γ -тубуліну та оцінити можливість застосування цього гену для ДНК-баркодингу досліджених об'єктів, із перспективою подальшого використання отриманих профілів рослин для оцінки якості харчових продуктів.

Матеріали і методи

У рамках цього дослідження було проаналізовано наступний рослинний матеріал: 1) сорти рису посівного (липкий або азійський, *Oryza sativa* L.), а саме: YIP-4970, YIP-4558, Лазурит, Віконт, Преміум та Консул; 2) сорти ячменю звичайного (*Hordeum vulgare* L.), зокрема вітчизняної селекції – Едем, Адапт, Дружба, Вестнік, Гетьман; 3) кримські популяції егілопсу (*Aegilops biuncialis* Vis.); 4) сорти пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) – Харківська 30, Харківська 26, Колективна, Елегія, які відносяться до ярої пшениці, та Безоста 1 та Миронівська 808, які належать до озимої пшениці; 5) сорти пшениці твердої (*Triticum durum* Desf.) – Лагуна та Континент; 6) різні види пшениці та егілопсу – *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, *Ae. geniculata*, *Ae. speltoides*, *T. monococcum*, *T. sinskajae*, *T. dicocoides*, *T. dicocon*.

Геному ДНК екстрагували із зерна чи паростків досліджуваних рослин за допомогою ЦТАБ-методу [9]. Якість отриманої ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі, а також спектрофотометрично на спектрофотометрі «Nanodrop» з визначенням її концентрації.

Надалі проводили ПЛР-ампліфікацію з використанням власноруч розроблених вирожджених праймерів до ділянки, яка охоплює пос-

лідовності інтронів генів γ -тубуліну: TGP-F: 5'-GAYGTBTTTATTTTACCARGCKGA-3' та TGP-R: 5'-GAGTTGTARGGYTGGACRAC-3'. ПЛР проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 мМ MgCl₂, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мМ кожного дНТФ, 0,5 од. DreamTaq полімерази («ThermoFisher», США). Ампліфікацію проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (94°C) – 4 хв, 30 циклів ампліфікації (денатурація 94°C – 30 с, гібридизація праймерів 59°C – 45 с, подовження 72°C – 1 хв 30 с), кінцеве подовження 72°C – 8 хв, 15°C – утримання [8]. Кожну ПЛР-реакцію проводили як мінімум у дворазовій повторності, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації, які відрізняються між однаковими реакціями.

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1 x TBE-буфері [9]. Візуалізацію фрагментів проводили шляхом забарвленням нітратом срібла [10]. Аналіз зображень із виявленими ДНК-фрагментами виконували у програмі GelAnalyzer (gelanalyzer.software.informer.com/1.0/). Для визначення довжини фрагментів використовували ту ж програму та ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; («ThermoFisher», США).

Результати та обговорення

Результати проведеного аналізу поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну у сортів пшениці м'якої та твердої з використанням розробленої системи дозволили отримати їх ДНК-профілі та диференціювати значну частину зразків. На електрофореграмі (рис. 1) продемонстровано фрагменти, які містять інтрони генів γ -тубуліну, розподілені в діапазоні від 700 п. н. до 1200 п. н. При цьому у сортів пшениці твердої в ході ампліфікації утворюється 2 амплікони довжиною 705 п. н. та 1040 п. н., а в пшениці м'якої у сортів Колективна, Харківська 26, Харківська 30, Елегія – 3 фрагменти: 705 п. н., 840 п. н. та 935 п. н.; у сортів Миронівська 808 та Безоста 1 – 4 фрагменти: 705 п. н., 840 п. н., 935 п. н. та 1140 п. н.. До того для усіх зразків є характерною наявність високомолекулярного фрагменту в 2150 п. н., який потенційно

може бути гомо- чи гетеродимером. Отже, у пшениці твердої, яка є алотетраплоїдним видом ($2n = 4x = 28$; ВВАА) у ході аналізу було детектовано 2 фрагменти, що може свідчити про наявність принаймні по одному повному функціональному гену γ -тубуліну на підгеном. Однак фрагмент 1040 п. н. потребує додаткової перевірки за допомогою інших методів, адже його молекулярна вага відхиляється від біоінформатично очікуваної. У пшениці м'якої, яка є алогексаплоїдною рослиною ($2n = 6x = 42$; ВВААDD), спостерігається наявність 3 або 4 ампліфікованих фрагментів. Однак, щоб остаточно підтвердити приналежність високомолекулярних ампліконів (понад 1000 п. н.) до того чи іншого гена γ -тубуліну в подальшому слід було би провести їх секвенування. У ході попереднього біоінформатичного аналізу в геномі пшениці м'якої було відібрано 3 послідовності генів γ -тубуліну: Traes_1A_TUBG2, Traes_1BS_2A33D289F та Traes_1DS_1D69583A1, кожен з яких складається

з 11 екзонів і 10 інтронів. При цьому слід зазначити, що довжина 1-го інтрону становить 815–817 п. н., а другого – 174–176 п. н.

При дослідженні за допомогою цієї маркерної системи кримських популяцій егілопсу не вдалося диференціювати зразки між собою, адже для всіх зразків характерним є утворення одного фрагменту ДНК довжиною 705 п. н. При цьому у всіх зразків спостерігаються ще два високомолекулярні амплікони – 1400 п. н. та 1660 п. н., які вірогідно можуть бути димерами цільового продукту. Показовим є те, що у зразків егілопсу в ході ампліфікації утворюється ідентичний за розміром фрагмент до такого ж у пшениці, що додатково підтверджує спорідненість пшениці та егілопсу. В свою чергу утворення лише одного фрагменту ДНК також свідчить про те, що γ -тубулін у геномі егілопсу скоріш за все представлений лише одним повним функціональним ізотипом або двома ідентичними паралогічними / онологічними копіями.

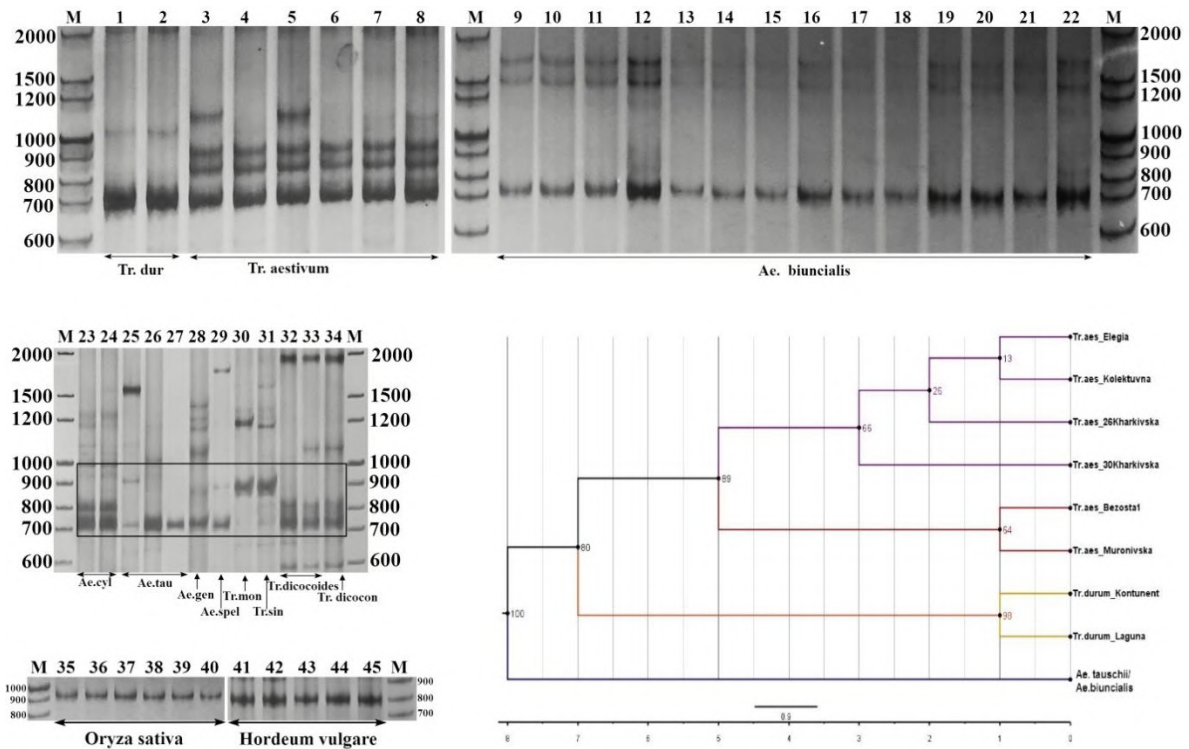


Рис. 1. Молекулярно-генетичні профілі пшениці, егілопсу, рису та ячменю, отримані за допомогою вироджених праймерів до інтронів генів γ -тубуліну. 1–2: *T. durum* (Континент, Лагуна); 3–8: *T. aestivum* (Миронівська 808, Елегія, Безоста 1, Колективна, Харківська 26, Харківська 30); 9–22: *Ae. biuncialis* (популяції); 23–24: *Aegilops cylindrica*; 25–27: *Ae. tauschii*; 28: *Ae. geniculata*; 29: *Ae. speltoides*; 30: *T. monococcum*; 31: *T. sinskajae*; 32–33: *T. dicocoides*; 34: *T. dicocon*; 35–40: *O. sativa* (сорта); 41–45: *H. vulgare* (сорта); М – ДНК-маркер «100bp Ladder».

Як видно з отриманих ДНК-профілів досліджених зразків різних видів пшениці та егілопсу, різні види диференціюються один від одного за рахунок відмінностей у наборах ампліконів інтронів γ -тубуліну. При цьому всі зразки, за виключенням *T. monosocum* та *T. sin-skajae*, мають спільний фрагмент, тоді, як різні види егілопсу продемонстрували високу подібність ампліфікованих фрагментів.

Використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну показало, що у сортів ячменю утворюється лише один фрагмент ДНК, довжина якого складає 800 п. н. Подібна молекулярна вага амплікону добре корелює з отриманими біоінформатичними даними щодо очікуваного розміру такого амплікону. Так, у геномі ячменю міститься лише один повний ген γ -тубуліну (HORVU1Hr1G023030), який складається з 11 екзонів і 10 інтронів. Довжина першого інтрону становить 843 п. н., а другого – 173 п. н.

У результаті проведеного генотипування сортів рису було виявлено утворення одного мономорфного фрагменту ДНК довжиною 910

п. н., ідентичного для усіх досліджених зразків. Наявність лише одного амплікону відповідає результатам проведеного біоінформатичного аналізу, на основі якого у базі даних Phytozome виявлено лише один анотований ген γ -тубуліну (TUG2), який складається з 10 екзонів і 9 інтронів. Довжина першого інтрону становить 757 п. н., а другого – 191 п. н. Оскільки у всіх зразків рису в результаті ампліфікації утворюється однаковий фрагмент (як і у випадку генотипів ячменю), використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів γ -тубуліну не дозволяє диференціювати рослини на рівні *різних сортів*. Однак при цьому отримані результати добре узгоджуються з наявною в літературних джерелах інформацією про те, що характерною особливістю сортів рису різних країн є тісний генетичний зв'язок, а дані, отримані з використанням різних ДНК-маркерних систем (зокрема RAPD, AFLP, SSR, поліморфізм довжини інтронів гену актину та ін.), свідчать про низьку генетичну різноманітність сортів рису посівного [11].

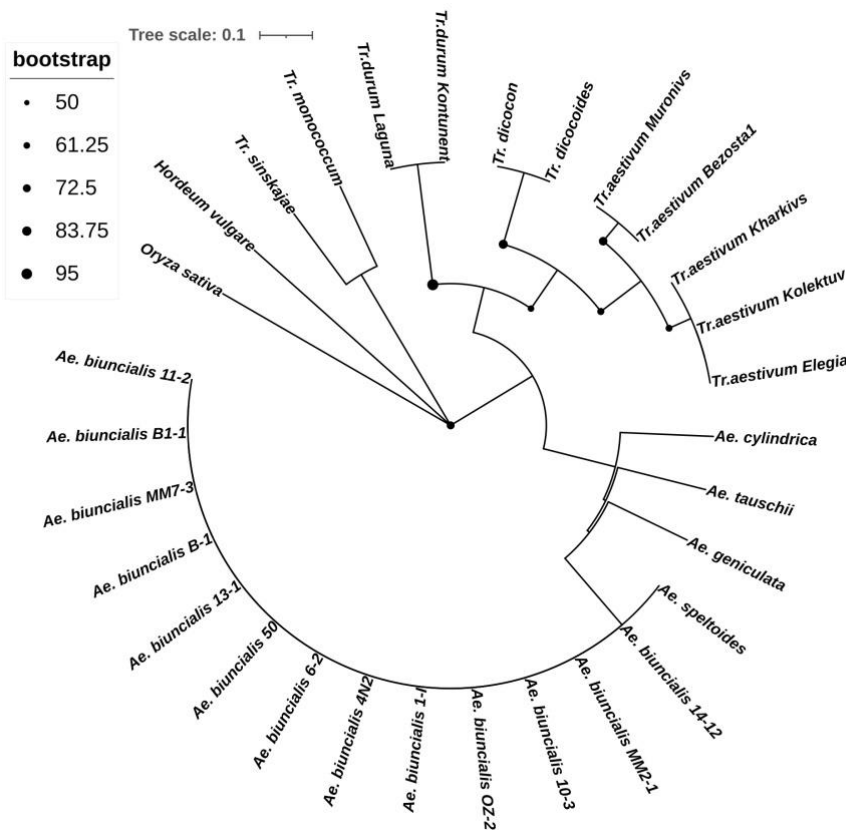


Рис. 2. Дендрограма генетичної схожості зразків пшениці, егілопсу, рису та ячменю, побудована на основі результатів методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну.

Дані фінгерпринтингу, отримані за допомогою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну, були використані для кластерного аналізу за допомогою методу UPGMA. З отриманої дендрограми (рис. 2) видно, що всі зразки зазвичай диференціюються за видовою приналежністю, хоча часто є дуже подібними в межах одного роду. До того ж при кластеризації сортів м'якої і твердої пшениці, а також їх найближчого родича – егілопсу (рис. 1, фореграма), зразки розподілились на окремі клади – групу егілопсу та групу пшениці (рис. 2). При цьому клада зразків пшениці, поділяється на дві підгрупи, що відповідають сортам твердої і м'якої пшениці. У межах групи пшениці м'якої зразки також чітко розподіляються на мінорні підклади сортів ярої (Елегія, Колективна, Харківська 26, Харківська 30) та озимої (Континент, Лагуна) м'якої пшениці.

Таким чином, використовуючи запропонований метод ДНК-баркодингу досліджені зразки злаків вдається розділити за їх видовою приналежністю, а сорти пшениці м'якої додатково можна диференціювати на ярі та озимі групи сортів. Крім того, серед всіх досліджених злаків загалом спостерігається закономірність: у ході аналізу утворюється один амплікон інтрону γ -тубуліну на кожен (під)геном диплоїдної при-

роди. У цілому, отримані результати свідчать про достатню диференціюючу спроможність методу оцінки поліморфізму довжини інтронів γ -тубуліну, завдяки чому цей підхід може бути використаний для фінгерпринтингу різних видів злаків.

Висновки

Отримані ДНК-профілі різних видів пшениці, егілопсу, а також ячменю звичайного та рису посівного на основі оцінки поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну. Запропонований підхід дозволив легко, швидко та достовірно диференціювати між собою досліджені види злакових рослин на основі їх специфічних видових ДНК-профілів. Встановлена доцільність використання запропонованого методу для баркодингу злакових рослин, особливо у випадку пшениці. Отримані дані свідчать про можливість ефективного використання запропонованого методу, наприклад, при оцінці якості харчових продуктів, зокрема борошна.

Дослідження проведені в рамках проекту для дослідницьких груп молодих вчених НАН України «Баркодинг ДНК на основі генів тубулінів: автентифікація видів пшениці та споріднених зернових культур у харчових продуктах» (2024–25 рр.) (Державний реєстраційний номер 0124U002378).

References

1. Dinu M., Whittaker A., Pagliai, G., Benedettelli, S., Sofi F. Ancient wheat species and human health: Biochemical and clinical implications. *J. Nutr. Biochem.* 2018. Vol. 52. P. 1–9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.09.001.
2. Li H., Xiao W., Tong T., Li Yo., Zhang M., Lin X., Zou X., Wu Q., Guo X. The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of Orchidaceae plants. *Scientific Reports.* 2021. Vol. 11. P. 1424. doi: 10.1038/s41598-021-81087-w.
3. Techen N., Parveen I., Pan Z., Khan I. A. DNA barcoding of medicinal plant material for identification. *Curr. Opin. Biotech.* 2014. Vol. 25. P. 103–110. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.010.
4. Coissac E., Hollingsworth P. M., Lavergne S. From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding. *Mol. Ecol.* 2016. Vol. 25. P. 423–428. doi: 10.1111/mec.13549.
5. Ponzoni E., Morello L., Giani S., Breviario D. Traceback identification of plant components in commercial compound feed through an oligonucleotide microarray based on tubulin intron polymorphism. *Food Chemistry.* 2014. Vol. 162. P. 72–80. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.021.
6. Casazza A. P., Morcia C., Ponzoni E., Gavazzi F., Benedettelli S., Breviario D. A reliable assay for the detection of soft wheat adulteration in Italian pasta is based on the use of new DNA molecular markers capable of discriminating between *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *J. Cereal Sci.* 2012. Vol. 56. P. 733–740. doi: 10.1016/j.jcs.2012.08.015.
7. Braglia L., Gavazzi F., Giani S., Morello L., Breviario D. Tubulin-Based Polymorphism (TBP) in Plant Genotyping. *Plant Genotyping: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Science+Business Media.* 2023. Vol. 2638. doi: 10.1007/978-1-0716-3024-2_28.
8. Pirko Ya. V., Buy D. D., Postovoytova A. S., Rabokon A. M., Kalafat L. O., Blume Ya. B. Intron length polymorphism of γ -tubulin genes as a new approach to plant genotyping. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2018. Vol. 12. P. 87–92. [in Ukrainian]
9. Green M. R., Sambrook J. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1890 p.
10. Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P., Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006. Vol. 10 (2). P. 77–81.
11. Herrera T. G., Duque D. P., Almeida I. P., Nunez G. T. et al. Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers. *Electron. J. Biotechnol.* 2008. Vol. 11 (5). P. 3–4. doi: 10.4067/S0717-34582008000500003.

RABOKON A. M., BLUME R. Y., SAKHAROVA V. H., HORDYNSKYI S. O., BILONozHKO Y. O., PIRKO Y. V., BLUME Y. B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevetskoho str., 2A

CEREAL BARCODING BY ASSESSING INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF γ -TUBULIN GENES

Aim. The aim of the study was to obtain typical DNA profiles for common cereal plants using a method of assessing γ -tubulin intron length polymorphism and to evaluate the possibility of using this gene for plant species barcoding.

Methods. Cereals, in particular wheat, *aegilops*, barley, and rice, have been studied. The method of γ -tubulin intron length polymorphism assessment was used. Amplified DNA fragments were separated via polyacrylamide gel electrophoresis under non-denaturing conditions and were visualized via silver nitrate staining.

Results. The analyzed cereal species-specific DNA profiles of amplicons of the γ -tubulin gene introns were obtained, which made it possible to differentiate the species. Fingerprinting data was used for cluster analysis and dendrogram construction.

Conclusions. The feasibility of using the proposed cereal barcoding method has been established. The studied plant DNA profiles can be effectively used in assessing the quality of food products such as flour.

Keywords: wheat, *aegilops*, barley, DNA barcoding, γ -tubulin.