

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ У СОРТІВ *TRITICUM AESTIVUM* L. ТА *HORDEUM VULGARE* L.

ДНК-маркери широко застосовуються як у фундаментальних, так і в прикладних дослідженнях для вирішення багатьох завдань генетики, селекції, збереження біорізноманіття, вивчення механізмів еволюції, картування хромосом, а також для насінництва, племінної справи тощо [1, 2]. Розвиток маркерних систем спрямований від оцінки анонімних послідовностей (ISSR, RAPD) до визначення поліморфізму цільових послідовностей генів. До нової генерації ДНК-маркерів можна віднести маркери, що ґрунтуються на знанні структури генів, які кодують тубуліни: ТВР (tubulin base polymorphism). Цей метод вперше був запропонований Д. Брев'яріо та його колегами [2]. Тубулін – один із ключових структурних білків цитоскелету клітини, який складає основу мікротрубочок. Мікротрубочки, як частина цитоскелету, беруть участь у більшості фундаментальних клітинних процесів, зокрема у поділі клітин [3–6]. Саме тому спостерігається доволі значна гомологія тубулінів у різних видів організмів.

Метод ТВР стосовно рослин ґрунтується на трьох принципах: гени b-BC1C;V=0 <VABOBL-9 V=B@>= C <560E :>4CNG>W ?>A;V4>2=>ABV, який починається з 397 нуклеотиду після стартового кодону АТГ. Довжина цього інтрону може варіювати між різними ізо типами, що визначають родину генів b-BC1C;V=0 [7–10], до того ж інтрон фланкується з обох боків нуклеотидними послідовностями екзонів, які є досить консервативними. Підібравши до цих консервативних ділянок праймери, можна за допомогою полімеразної ланцюгової реакції отримати багато копій ділянок, що знаходяться між ними, тобто, інтронів. Враховуючи всі ці обставини, І-й інтрон β -тубуліну може бути джерелом ДНК-поліморфізму, бо є більш варіабельною та менш консервативною ділянкою в генах b-BC1C;V=0, =V6 5:7>==V ?>A;V4>2=>ABV, 70 @0EC=>: @V7=>W H284:>ABV 52>;NFVW F8E 42>E 5;5<5=BV2 [11–13]. Варто зазначити, що в подальшому дослідникам вдалося залучити до аналізу і другий інтрон β -тубуліну, збільшивши тим самим диференціюючу здатність методу [14–16]. Модифікований метод отримав назву h-ТВР (horse-ТВР). Цей метод дозволяє ампліфікувати

ділянку гена, яка містить перший і другий інтрони, разом з другим кодуючим екзоном і частинами кодуючих послідовностей екзонів 1 і 3. Однак ІІ-й інтрон зустрічається не у всіх рослин, наприклад, він відсутній у *Zea mays* L. [2, 8], що може створити певні незручності у проведенні аналізу.

Таким чином, поліморфізм довжин інтронів (ТВР) – нова маркерна система, яка ґрунтується на визначенні поліморфізму довжин інтронів генів β -тубуліну і може використовуватися у генетичному аналізі рослин [11]. Використання цієї системи вже було апробоване на деяких видах родів *Brassica* L., *Lotus* L., *Coffea* L., *Eleusine Gaertn.*, *Rosa* L. тощо [16]. У той же час інформація по застосуванню ТВР для диференціації однодольних рослин, зокрема злаків, є вкрай неповною: в одному із досліджень не було виявлено міжсортовий поліморфізм у пшениці та ячменю [11], в іншому – метод працював, проте поліморфізм був обмежений та система не могла конкурувати з іншими молекулярними маркерами [2].

Мета роботи – оцінити можливості використання поліморфізму довжин інтронів у генетичних дослідженнях злаків на основі аналізу вітчизняних сортів пшениці та ячменю.

Матеріали і методи

Аналізували 7 сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) вітчизняної селекції – етиольовані проростки, та 30 сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.) – насіння. Кожному сорту присвоювали порядковий номер, який наведено у таблиці 1.

ДНК з насіння ячменю екстрагували за допомогою Gen Elute™ Plant Genomic DNA Mini prep Kit («Sigma-Aldrich», США). З проростків пшениці – ЦТАБ-методом [17]. Якість отриманої ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі, а також спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» з визначенням її концентрації.

Послідовності праймерів для проведення полімеразної ланцюгової реакції взято з літературних джерел [16]. Було використано наступні праймери:

ТВР-F: 5Ч - ААСТGGGCBAARGGNCAУТА
УАС-3Ч;

Список сортів рослин *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L., задіяних в дослідженні

№	Назва сорту	№	Назва сорту	№	Назва сорту
	<i>Hordeum vulgare</i> L.	13	Одеський 151	26	Гетьман
1	Дружба	14	Престиж	27	Оболонь
2	Одеський 100	15	Дерибас	28	Чудовий
3	Вестник	16	Переможний	29	Селеніт
4	Одеський 111	17	Гамбринус	30	Чарівний
5	Романтик	18	Едем		<i>Triticum aestivum</i> L.
6	Тайфун	19	Сталкер	31	Харківська 30
7	Одеський 115	20	Незалежний	32	Безоста 1
8	Итиль	21	Адапт	33	Етюд
9	Прерія	22	Галатея	34	Елегія
10	Рось	23	Галактик	35	Харківська 26
11	Паллідум 107	24	Зоряний	36	Миронівська 808
12	Одеський 131	25	Південний	37	Колективна

TBP-R: 5'-ACCATRCAYTCRTCDGCRRTTY TC -3'.

ПЛР проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 25 мкл) містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 мМ MgCl₂, 50 нг рослинної ДНК, 1мМ кожного з праймерів, 0,2 мМ кожного dNTPs, 0,5 од. Тақ полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (94 °С) – 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація 94 °С – 30 с, ренатурація праймерів 55 °С – 40 с, подовження 72 °С – 1,5 хв), кінцеве подовження 72 °С – 8 хвилин, 15 °С – утримання [2]. Кожну ПЛР-реакцію проводили як мінімум в двократній 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 % неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1X TBE-буфері [17]. Візуалізацію фрагментів проводили шляхом забарвленням нітратом срібла [18, 19]. Аналіз зображень виконували у програмі GelAnalyzer (gelanalyzer.software.informer.com/1.0/).

Для визначення довжини фрагментів використовували маркер молекулярної маси (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати та обговорення

Результати проведеного електрофоретичного аналізу свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються амплікони (ділянки інтронів β -тубуліну) довжиною приблизно від 94 пар нуклеотидів (п.н.) до 3000 п.н. – для пшениці, та

від 97 п.н. до 1500 п.н. – для ячменю. При цьому більша частина чітких та поліморфних смуг у ячменю візуалізується в діапазоні 300–1500 п.н., а у пшениці – 300–3000 п.н. Нижче цих зон спостерігаються мономорфні нечіткі смуги, характерні для ПЛР-продуктів неповної ампліфікації. В подальшому ці амплікони не аналізувалися. Необхідно також відмітити, що для всіх сортів ячменю характерною є дуже чітка, проте ідентична для всіх проаналізованих сортів смуга, що відповідає ПЛР-продукту в районі 104 п.н.

На рис. 1 зображено електрофореграми з ампліконами в діапазоні 300–1500 п.н., отриманими для різних сортів ячменю, а на рис. 2 – продукти ампліфікації для різних сортів пшениці. Всім відтворюваним смугам, що відповідали ампліконам певної довжини, були надані номери в порядку зростання розмірів ампліконів (табл. 2).

Більшість досліджених зразків характеризуються своїм специфічним набором смуг з певними відмінностями. Кількість смуг відрізняється як між сортами, так і між видами. Різниця в наборі ампліконів базується не лише на наявності специфічних смуг, але і на їх відсутності. Наприклад, для сорту ячменю Чарівний характерні смуги номер 2, 4, 10, 11, 13, 17, 19, а для сорту Зоряний – номери 3, 4, 10, 11, 13; тобто амплікони № 17 та № 19 відсутні, що і вирізняє цей сорт від інших. Кількість ампліконів, виявлених у сортів пшениці була більшою, ніж у сортів ячменю – 45 (№ 21–65) та 20 (№ 1–20), відповідно.

Таким чином, у цьому дослідженні за допомогою ТВР-методу вперше вдалося доволі чітко виявити поліморфізм інтронів у злаків. Слід зазначити, що кластерний аналіз на базі ТВР у *Rosa* ssp. [1, 16] демонстрував узгодженість результатів досліджень з напрямками селекційних про-

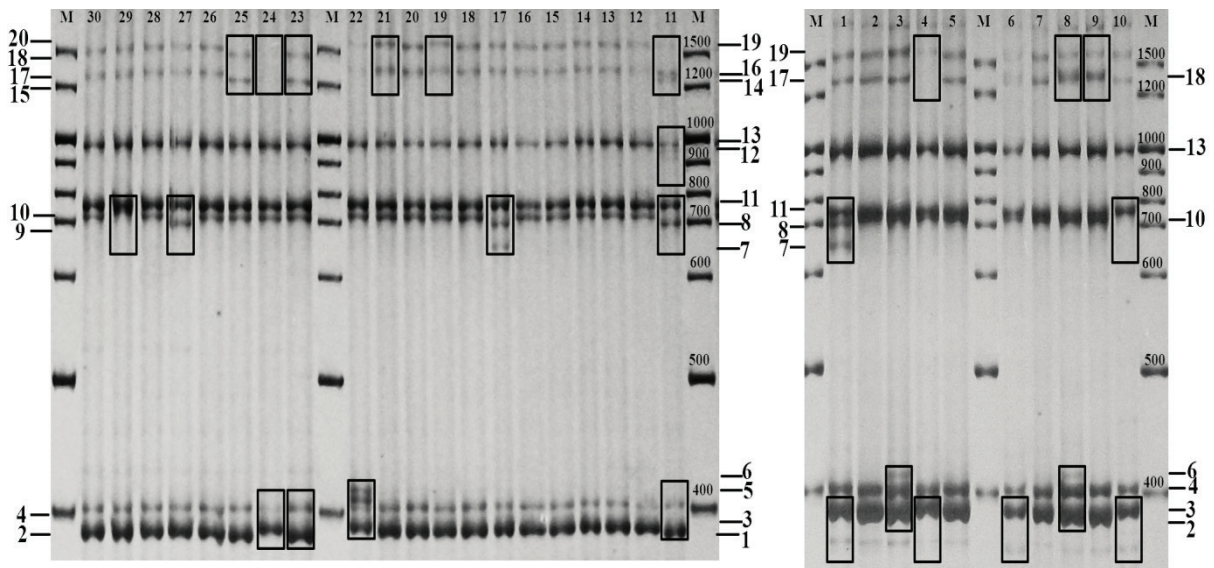


Рис. 1. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -Тубуліну сортів ячменю (інтервал 300–1500 п.н.), отриманими за допомогою ТВР-методу. Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; 1–30 (у верхній частині рисунка) – номери сортів; 1–20 (з боків рисунка) – номери смуг

Таблиця 2

ТВР-профілі сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L.

№ сорту	Номери смуг	№ сорту	Номери смуг	№ сорту	Номери смуг
<i>Hordeum vulgare</i> L.		13	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	26	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19
1	3, 4, 7, 10, 11, 13, 17, 19	14	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	27	2, 4, 9, 11, 13, 17, 19
2	1, 4, 10, 11, 13, 17, 19	15	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	28	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19
3	2, 4, 6, 10, 11, 13, 17, 19	16	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	29	2, 4, 11, 13, 17, 19
4	2, 4, 10, 11, 13, 19	17	2, 4, 7, 8, 11, 13, 17, 19	30	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19
5	3, 4, 10, 11, 13, 17, 19	18	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	<i>Triticum aestivum</i> L.	
6	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	19	2, 4, 10, 11, 13, 17, 20	31	21-28, 29, 31-33, 35-38, 40, 43, 44, 47, 48, 54-57, 60, 61, 63, 65
7	3, 4, 10, 11, 13, 17, 19	20	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	32	21-28, 30, 32-34, 36-38, 41-43, 45, 50, 54-57, 61, 63, 65
8	2, 4, 6, 10, 11, 13, 18, 19	21	2, 4, 10, 11, 13, 17, 20	33	21-28, 29, 31-33, 35, 38, 41, 43, 46, 53, 56, 58, 59, 62, 64, 65
9	2, 4, 10, 11, 13, 18, 19	22	3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 17, 19	34	21-28, 29, 31, 33, 35, 37, 38, 40, 43, 44, 49, 55-57, 60, 61, 63, 65
10	3, 4, 11, 13, 17, 19	23	1, 4, 10, 11, 13, 14, 15	35	21-28, 29, 31-33, 35, 37, 39, 40, 43, 44, 51, 52, 54-57, 59, 61, 63, 65
11	1, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 19	24	3, 4, 10, 11, 13	36	21-28, 29, 31-33, 35, 37, 38, 40, 43, 44, 46, 51, 55-57, 63, 65
12	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	25	2, 4, 10, 11, 13, 14, 15	37	21-28, 29, 31-33, 35, 37, 38, 40, 43, 44, 46, 51, 54-57, 60, 61, 63, 65

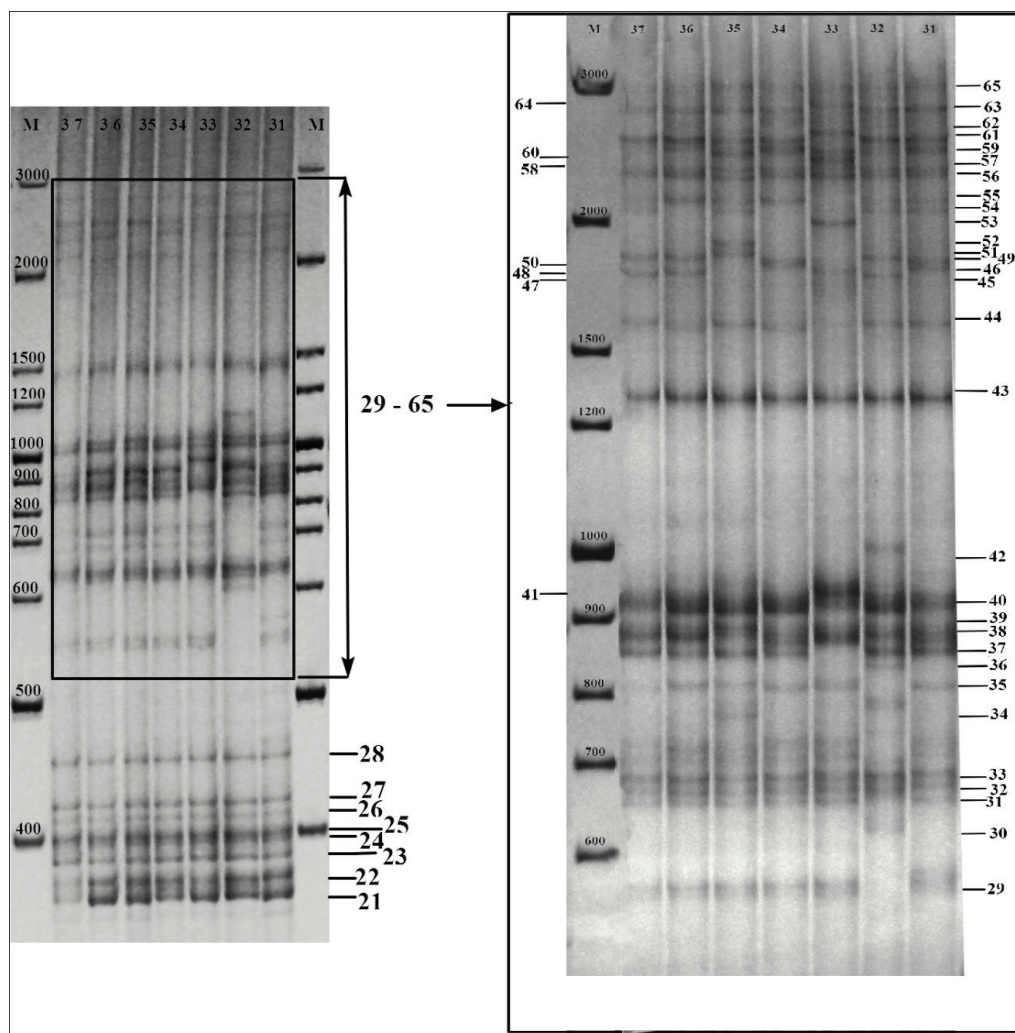


Рис. 2. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -Тубуліну сортів пшениці (інтервал 300–3000 п.н.), отриманими за допомогою ТВР-методу. Праворуч – поліморфна зона; м – маркер; 31–37 (у верхній частині рисунка) – досліджені сорти (див. табл. 2); 21–65 (з боків рисунка) – номери смуг.

грам для 20 різних різновидів *Rosa*, які мали різні властивості і були виведені для різних цілей. Подальше збільшення аналізованих вибірок рослин пшениці та ячменю зробить можливим оцінку генетичного поліморфізму як на рівні сортів, так і на міжвидовому рівні.

Висновки

Проведено аналіз сортів *H. vulgare* та *T. aestivum* за допомогою ТВР-методу. Виявлено міжсортний поліморфізм у межах дослідже-

них видів. Результати продемонстрували непогану диференціюючу спроможність ТВР-методу для оцінки генетичного поліморфізму рослин та можливість використання його для фінгерпринт-аналізу сортів пшениці та ячменю. Продемонстровано швидкість, простоту та надійність ТВР-методу, який не вимагає наявності великої попередньої інформації про геном об'єкта і може бути широко задіяний в генетичних дослідженнях рослин.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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.
2. 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. – P. 281–291.
3. Blume Ya., Lloyd C.V., Yemets A.I. Plant tubulin phosphorylation // *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for Agrobiotechnology* / Eds. Ya. Blume, W. Baird, A. Yemets, D. Breviario. – Berlin; Heidelberg; NY: Springer-Verlag, 2008. – P. 145–159.
4. Peter N. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants // *Int. Rev. Cytol.* – 1998. – 184. – P. 33–80.
5. Nogales E. Structural insights in to microtubule function // *Annu. Rev. Biochem.* – 2000. – 69. – P. 277–302.
6. Blume Ya., Yemets A., Sheremet Ya., Nyporko A., Sulimenko V., Sulimenko T., Dr̄ber P. Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on a Arabidopsis thaliana microtubule protofilament model and in the cells [Електронний ресурс] // *BMC Plant Biology*. – 2010. – 10. – P. 29. – Режим доступу: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/29>.
7. McKean P. G., Vaughan S., Gull K. The extended tubulin superfamily // *J. Cell Sci.* – 2001. – 114. – P. 2723–2733.
8. Liaud M.-F., Brinkmann H., Cerff R. The ν -tubulin gene family of pea: primary structures, genomic organization and intron independent evolution of genes // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – 18. – P. 639–651.
9. Sakurai A., Fujimori S., Kochiwa H., Kitamura-Abe S., Washio T., Saito R., Carninci P., Hayashizaki Y., Tomita M. On biased distribution of introns in various eukaryotes // *Gene*. – 2002. – 300. – P. 89–95.
10. Luduena R.F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications // *Int. Rev. Cytol.* – 1998. – 178. – P. 207–275.
11. Пірко Я.В. Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів b-BC1C;V=0 // *@><KH;5==00 1>B0=V:0*. 2011. 11. !. 152 156.
12. Li S.C., Tang P., Lin W.C. Intronic microRNA: discovery and biological implications // *DNA Cell Biol.* – 2007 – 26. – P. 195–207.
13. Morello L., Breviario D. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste // *Curr. Genomics*. – 2008. – 9. – P. 227–238.
14. Breviario D., Giani S., Ponzoni T., Mastromauro F., Morell L. Plant tubulin intronics // *Cell Biol. Int.* – 2008. – 32. – P. 571–573.
15. Galasso I., Manca A., Braglia L., Martinelli T., Morello L., Breviario D. h-TBP: an approach based on intron-length polymorphism for the rapid isolation and characterization of the multiple members of the b-tubulin gene family in *Camelina sativa* (L.) Crantz // *Mol. Breeding*. – 2010. – 28. – P. 635–645.
16. Breviario D., Baird W. V., Sangoi S., Hilu K., Blumetti P., Giani S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined b-tubulin introns // *Mol. Breeding*. – 2007. – 20. – P. 249–259.
17. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. – Cold Spring Harbor, 2001. – 2. – 763 p.
18. Benbouza H., Jean-Marie J., Jean-Pierre B. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silverstaining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2006. – 10 (2). – P. 77–81.
19. Rahman M.H., Jaquish B., Khasa P.D. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains // *Plant Mol. Biol. Reporter*. – 2000. – 18. – P. 339–348.

RABOKON A.N., DEMKOVICH A. E., PIRKO YA.V., BLUME YA.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Akademika of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: nastya-rabokon@rambler.ru

STUDING OF B-TUBULIN GENE INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF *TRITICUM AESTIVUM* L. AND *HORDEUM VULGARE* L. VARIETIES

Aims. Tubulin-Based-Polymorphism (TBP) was originally introduced as a novel method for assaying genetic diversity in plants. In this connection, testing of this method in genetic research of cereals like as local wheat and barley varieties is very necessary. **Methods.** The CTAB-method for the isolation of DNA, PCR amplification, electrophoretic analysis under non-denaturing polyacrylamide gel and staining by silver nitrate method were used. **Results.** Genetic polymorphism of wheat and barley varieties was described on the basis of electrophoresis of TBP products. It was found that the number of the amplicons that correspond to the first intron of β -tubulin can be varying quite widely (94–3000 bp – *Triticum aestivum* L.; 97–1500 bp – *Hordeum vulgare* L.). **Conclusions.** Obtained data show that the intron length polymorphism method has good differentiating ability at least on some cereals. Thus, TBP – rapid, simple and reliable method that does not require much preliminary information about the genome of the object of interest; it can be useful in various genetic studies of plants.

Keywords: molecular markers, β -tubulin, TBP (tubulin base polymorphism).