

ГОРДИНСЬКИЙ С.О.[✉], ПОСТОВОЙТОВА А.С., РАБОКОНЬ А.М., ПІРКО Я. В., БЛЮМ Я.Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, ORCID: 0000-0003-3768-5763, 0000-0002-6249-1824, 0000-0003-1887-5406, 0000-0001-7078-7548

[✉] serhiy_hordinskiy@ukr.net

РОЗРОБЛЕННЯ ІLP-МАРКЕРІВ ДЛЯ *AEGILOPS TAUSCHII* ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЇХ У МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОМУ АНАЛІЗІ

Мета. Розробити маркерні системи на основі вивчення поліморфізму довжини інтронів різноманітних генів (ІLP) у *Aegilops tauschii*, перевірити можливість їх використання для генетичної диференціації *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis*. **Методи.** Було використано базу даних NCBI для отримання EST послідовностей, онлайн інструменти CD-HIT, BLAST та Primer3Plus (для розроблення праймерів). Також було використано полімеразну ланцюгову реакцію (ІLP) з розробленими праймерами. Ампліфіковані фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу у неденатуруючому поліакриламідному гелі та фарбували сріблом. **Результати.** Розроблено молекулярні маркери Aet_ILP1, Aet_ILP6 та апробовано їх для різних генотипів *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis*. У всіх досліджених зразках не було помічено внутрішньовидової диференціації, проте амплікони інтронів різних видів значно відрізнялися між собою. Також встановлено, що досліджені види мали по одній копії гена HO222074.1 та від 1 до 3 копій гена CX244643.1. **Висновки.** Отримані результати свідчать про низький рівень внутрішньовидової мінливості розроблених ІLP-маркерів та можливість їх використання для міжвидової диференціації *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis*.

Ключові слова: *Aegilops tauschii*, *Aegilops biuncialis*, ІLP-маркери.

Генетико-селекційне вдосконалення сільськогосподарських культур є одним із найбільш ефективних методів підвищення врожайності, стійкості до абіотичних і біотичних факторів середовища і енергетично вигідного обробітку сільськогосподарських культур, зокрема пшениці. Економічно ефективним та екологічно безпечним способом захисту рослин є створення та використання стійких до хвороб сортів [1]. Стійкість рослин до біотичних стресів є важливою складовою потенціалу онтогенетичної адаптації. Про це свідчить факт щорічних втрат

продукції рослинництва у світі, які досягають до 40% внаслідок ураження агроценозів хворобами, шкідниками та бур'янами [2].

Різнманітність генетичних ресурсів рослин дає селекціонерам можливість створювати нові покращені сорти з бажаними характеристиками, які передбачають такі важливі агрономічні ознаки, як висока врожайність, велика кількість насіння, світлочутливість тощо, а також інші необхідні характеристики для таких показників, як стійкість до шкідників, хвороб та абіотичних факторів.

Генетичне різноманіття диких близькопоріднених видів може бути джерелом бажаних алелей і використовується селекціонерами у ході створення стійких сортів. Отримання покращених сортів потребує нових ознак, зокрема таких, як стійкість до комах-шкідників та хвороб, спеки або холоду, різних забруднювачів повітря та ґрунту. Для постійно змінюваних цілей селекції слід зберігати різні гени в культурних та диких видах культур як ресурсів зародкової плазми. Наявність генетичної різноманітності всередині та між видами рослин дозволяє селекціонерам вибирати кращі генотипи для безпосереднього застосування під час створення нових сортів або для використання у програмах з гібридизації [3].

Виявлення та використання генетичної різноманітності геномів сільськогосподарських культур було і залишається одним із найважливіших завдань генетиків та селекціонерів рослин для розуміння архітектури геному, а також для розроблення стратегій модифікації та покращення сільськогосподарських культур [4]. Молекулярні маркери використовуються як корисний інструмент для оцінки генетичної різноманітності рослин, оскільки на них не впливають фактори навколишнього середовища. Також вони є швидкими, ефективними та чутливими інструментами для виявлення великої кількості

© ГОРДИНСЬКИЙ С.О., ПОСТОВОЙТОВА А.С., РАБОКОНЬ А.М., ПІРКО Я.В., БЛЮМ Я.Б.

чітких відмінностей між генотипами на рівні ДНК [5].

Більшість генів, що кодують білки, складаються з екзонів та інтронів. Інтрони належать до некодуючої послідовності генів [6]. Поліморфізм довжини інтронів (ILP-intron length polymorphism) є одним із різновидів РІР-маркерів (Potential Intron Polymorphism). Виявлення поліморфізму генів може бути здійснено за допомогою ампліфікації інтронів під час проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі специфічними праймерами. Праймери для визначення ILP у певних видів підбираються до консервативних ділянок екзонів, через що вони мають ширші перспективи застосування, включаючи аналіз генетичної структури популяцій, побудову генетичних карт, селекцію за допомогою молекулярних маркерів і визначення місця розташування локусів кількісних ознак (QTL) [7].

Зважаючи на перспективність ILP-маркерних систем, було розроблено дві пари праймерів для *Aegilops tauschii*, оскільки вважається, що цей вид є джерелом одного з генів пшениці м'якої (*Triticum aestivum*) [8].

Матеріали і методи

Було проаналізовано вибірку з 22 зразків *Aegilops tauschii* та 9 зразків *Aegilops biuncialis*. Для пошуку інтронів використовували EST послідовності *Ae. tauschii* з публічної бази даних NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), які в подальшому були перевірені за допомогою онлайн-інструмента CD-HIT (Cluster Database at High Identity with Tolerance) (http://weizhonglab.ucsd.edu/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi) задля того, щоб позбутися повторів. Отримані послідовності порівнювалися з геномом *Oryza sativa* за допомогою інструмента BLAST (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>) для ідентифікації положення інтронів. Праймери для ампліфікації інтронів генів підбиралися за допомогою програми Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

ДНК з насіння виділяли за допомогою ЦТАБ методу. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США), використовуючи по 10 мкл реакційної суміші (5х ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl₂, 50 нг ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 ммоль кожного дНТФ, 0,5 од. Taq-

полімерази («Fermentas», Литва)). Якість отриманої ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі, а також визначенням її концентрації спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» (США). ПЛР здійснювали за умов початкової денатурації 95°C протягом 5 хв, 35–40 циклів ампліфікації (денатурація – 95°C – 30 с, відпал праймерів – 59,7–60,2° С – 30 с, елонгація – 72°C – 30 с), заключна елонгація – 72°C – 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу у 6%-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1х TBE-буфері. Фарбування фрагментів ДНК здійснювали нітратом срібла з наступною фотодокументацією. Електрофореграми аналізували з використанням програми GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і чітких фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати та обговорення

У результаті аналізу бази даних NCBI було знайдено 208 EST *Ae. tauschii*, з яких за допомогою онлайн-інструмента CD-HIT було відібрано 181 послідовність. На основі аналізу всіх унікальних EST послідовностей *Ae. tauschii* через порівняння з гомологічними послідовностями генів *O. sativa* виявлено 14 позицій інтронів та розроблено 14 ILP-маркерів *Ae. tauschii*, які в подальшому планується використати для генетичного аналізу поліморфізму довжини інтронів і диференціації генотипів *Ae. tauschii* та інших близькоспоріднених видів культурних та дикорослих злаків. Два з таких маркерів, а саме Aet_ILP1 та Aet_ILP6, праймерні послідовності яких наведено у таблиці, було використано у цьому дослідженні.

На електрофореграмі (рис. 2) зображено результати проведення ПЛР з використанням праймерів Aet_ILP1. Можна зазначити, що різні зразки *Ae. tauschii* не відрізняються між собою та мають однакову довжину ампліфікованих фрагментів, що містять інтрони, яка в середньому складає 260 п. н. Так само у зразків *Ae. biuncialis* середня довжина фрагментів, отриманих під час ПЛР з праймерами до маркера Aet_ILP1, склала 296 п. н. Водночас очікувана (розрахована) довжина продуктів ПЛР без урахування інтрона – 181 п. н.

Таблиця. Праймери та їх характеристики

Назва праймерів	Тип праймера	Послідовність	Tm (°C)	Розмір продукту* (п. н.)
Aet_ILP1	F	AAAGAGCCCAACAGGGAGTT	60,2	181
	R	CGTGGAAGACTCCGCACTAT		
Aet_ILP6	F	AGGCTTGTCTTTCTGGAGGA	59,6	180
	R	GATGTGCATGCTTGAATGG		

Примітка. * без урахування розміру інтрону.

Відсутність поліморфізму вказує на наявність низької генетичної мінливості егілопсів за геном HO222074.1 Слід зазначити, що довжина інтрона у гомологічного гена рису LOC_Os12g01449, на підставі аналізу якого була локалізована інтронна послідовність *Ae. tauschii*, становить 1082 пар нуклеотидів.

Результати електрофоретичного аналізу фрагментів ДНК, отриманих із використанням праймерів Aet_ILP6, представлені на Рис. 2. Кожен зразок *Ae. tauschii* має три чіткі амплікони довжиною 300, 324 та 367 п. н., мінімальна очікувана довжина продукту ПЛР становить 222 п. н. На нашу думку, наявність 1–3 фрагментів у кожного зразка *Ae. tauschii* може вказувати на можливість присутності до трьох копій гена CX244643.1 з низьким або із зовсім відсутнім поліморфізмом у кожній копії. В усіх проаналі-

зованих зразках *Ae. biuncialis* було виявлено лише один амплікон, який має приблизний розмір у 320 п. н. Загалом цей маркер вказує на наявність трьох копій гена CX244643.1 у *Ae. tauschii*, незважаючи на те, що цей вид є диплоїдним. Також за допомогою маркера Aet_ILP6 можна легко відрізнити *Ae. tauschii* від *Ae. biuncialis*.

На сьогодні багато робіт присвячено розробці ILP-маркерних систем. Наприклад, для *Triticum aestivum* було розроблено 61 ILP-маркер та перевірено застосування їх для 12 видів злаків, у тому числі для *Ae. tauschii*. Було встановлено, що за декількома маркерами *Ae. tauschii* відрізнявся від інших досліджених видів. Зокрема, міжвидова диференціація була помічена з *Ae. geniculata* [9].

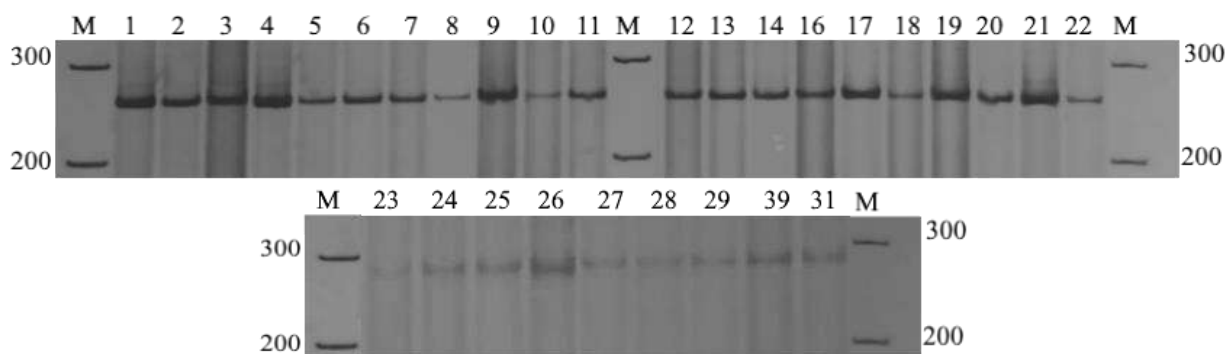


Рис. 1. Електрофореграма, що демонструє результати ПЛР-аналізу зразків егілопсів із використанням маркера Aet_ILP1. Зразки *Ae. tauschii* – 1–22, *Ae. biuncialis* – 23–31, М – ДНК-маркер «100pb Plus Ladder».

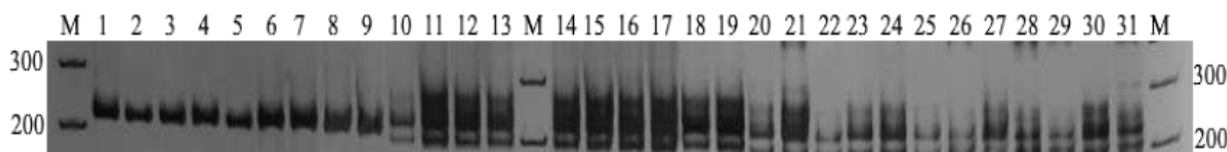


Рис. 2. Електрофореграма, що демонструє результати ПЛР-аналізу зразків егілопсів з використанням маркера Aet_ILP6. 1–9 – зразки *Ae. biuncialis*, 10–31 – зразки *Ae. tauschii*, М – ДНК-маркер «100pb Plus Ladder».

Також в іншій роботі було розроблено 5123 ІЛР-маркерів для мишію італійського (*Setaria italic* L.), які дозволили продемонструвати генетичний зв'язок цього виду з сорго (~50%), кукурудзою (~46%), рисом (~21%) та куцоніжкою (~21%) [10]. Ще в одній роботі було розроблено 110 ІЛР-маркерів для вігні китайської (*Vigna unguiculata* L.), 98 з них успішно проампліфіковані, але 36% маркерів виявили поліморфізм. Загалом 95% маркерів диференціювали інші види вігні, що демонструє користь у застосуванні ІЛР-маркерів для вивчення генетичного різноманіття видів та у філогенетичних дослідженнях [11]. Отже, розроблені нами генетичні маркери Aet_ILP1 та Aet_ILP6 для *Ae. tauschii* виявилися корисними в оцінці міжвидової диференціації егілопсів, але мало засто-

сованими щодо вивчення внутрішньогенетичної мінливості.

Висновки

У результаті проведених досліджень було запропоновано дві маркерні системи: Aet_ILP1 та Aet_ILP6, які базуються на визначенні довжини інтронів генів NO222074 та CX244641 у *Ae. tauschii*. Встановлено, що усі досліджені зразки в межах *Ae. tauschii* та *Ae. biuncialis* мають однакову довжину інтронів у наведених генах, проте наявна чітка міжвидова диференціація. Також результати проведеного аналізу вказують на можливість існування 1–3 копій гена CX244643.1 у *Ae. tauschii* та лише однієї копії у *Ae. biuncialis*, що полегшує молекулярно-генетичну диференціацію (ідентифікацію) вище зазначених видів.

References

1. Boyd L.A., Ridout C., O'Sullivan D.M., Leach J.E., Leung H. Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends Genet.* 2013. Vol. 29 (4). P. 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011>.
2. Quenouille J., Paulhiac E., Moury B., Palloix A. Quantitative trait loci from the host genetic background modulate the durability of a resistance gene: a rational basis for sustainable resistance breeding in plants. *Heredity.* 2014. Vol. 112. P. 579–587. doi: 10.1038/hdy.2013.138.
3. Verma P., Yadav A.N., Khannam K.S., Panjari N., Kumar S., Saxena A.K., Suman A. Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. *Annals Microbiol.* 2015. Vol. 65 (4). P. 1885–1899. doi: 10.1007/s13213-014-1027-4.
4. Varshney R.K. et al. Identification and validation of a core set of informative genic SSR and SNP markers for assaying functional diversity in barley. *Mol. Breed.* 2008. Vol. 22 (1). P. 1–13. doi: 10.1007/s11032-007-9151-5.
5. Melchinger A.E., Messmer M.M., Lee M., Woodman W.L., Lamkey K.R. Diversity and relationships among US maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.* 1991. Vol. 31 (3). P. 669–678. doi: 10.2135/cropsci1991.0011183X003100030025x.
6. Hawkin J.D. A survey on intron and exon lengths. *Nucl. Acids Res.* 1988. Vol. 16 (21). P. 9893–9908. doi: 10.1093/nar/16.21.9893.
7. Lessa E. P. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Mol. Biol. Evol.* 1992. Vol. 9 (2). P. 323–330. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040723.
8. Luo M.C., Gu Y., Puiu D. et al. Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature.* 2017. Vol. 551. P. 498–502.
9. Sharma H., Bhandawat A., Rahim M.S., Kumar P., Choudhoury M.P., Roy J. Novel intron length polymorphic (ILP) markers from starch biosynthesis genes reveal genetic relationships in Indian wheat varieties and related species. *Mol. Biol. Repts.* 2020. Vol. 47 (5). P. 3485–3500. doi: 10.1007/s11033-020-05434-2.
10. 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.* 2014. Vol. 21 (1). P. 41–52. doi: 10.1093/dnares/dst039.
11. Gupta S.K., Bansal R., Gopalakrishna T. Development of intron length polymorphism markers in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and their transferability to other *Vigna* species. *Mol. Breed.* 2012. Vol. 30 (3). P. 1363–1370. doi: 10.1007/s11032-012-9722-y.

HORDYNSKYI S.O., POSTOVOITOVA A.S., RABOKON A.M., PIRKO Ya.V., BLUME Ya.B.

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

DEVELOPMENT OF ILP-MARKERS FOR AEGILOPS TAUSCHII AND THEIR APPLICATION IN MOLECULAR GENETIC ANALYSIS

Aim. To develop marker systems based on the study of intron length polymorphism of various genes (ILP) in *Ae. tauschii*, to test the possibility of their use for genetic differentiation of *Ae. tauschii* and *Ae. biuncialis*. **Methods.** The NCBI database was used to obtain EST sequences, online tools CD-HIT, BLAST and Primer3Plus (for the development of primers). The polymerase chain reaction (PCR) method with the developed primers was done. Amplified fragments

were separated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and stained with silver. **Results.** Molecular markers Aet_ILP1, Aet_ILP6 were developed and tested for different genotypes of *Ae. tauschii* and *Ae. biuncialis*. No intraspecific differentiation was observed in all studied samples, but amplicons of introns of different species differed significantly. It was also found that the studied species had one copy of the HO222074.1 gene and 1 to 3 copies of the CX244643.1 gene. **Conclusions.** The obtained results indicate a low level of intraspecific variability of the developed ILP markers and the possibility of their use for interspecific differentiation of *Ae. tauschii* and *Ae. biuncialis*.

Keywords: *Aegilops tauschii*, *Aegilops biuncialis*, ILP markers.