

ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИН ДРУГОГО ІНТРОНУ ГЕНІВ АКТИНУ В ГЕНОМІ *LINUM USITATISSIMUM* L.

ДНК-маркери займають важливе місце у вирішенні фундаментальних та прикладних завдань генетики. Вони широко використовуються у популяційній, порівняльній генетиці, у філогенетичних дослідженнях тощо. Окрім того, за їх допомогою вирішується ряд селекційних проблем, створюються методики картування геномів, а також вивчаються механізми еволюції [1]. Поява загальнодоступних баз даних, що містять інформацію щодо генних послідовностей організмів, значно прискорила перехід від маркерних систем, спрямованих на оцінку анонімних послідовностей, так звані AADs (arbitrarily amplified DNA markers), до яких належать AFLP, ISSR та RAPD, до визначення поліморфізму цільових послідовностей генів (gene-targeted and functional markers (GTMs and FMs), що ґрунтується на знанні структури генів [2].

В останні роки виникло багато перспективних систем молекулярно-генетичного аналізу у рослинній генетиці. Однією з таких систем є маркери, що ґрунтуються на виявленні поліморфізму довжин інтронів (ILP, intron length polymorphism markers) [3]. Дослідження останніх років показали, що інтронний поліморфізм є надійним та достовірним джерелом інформації щодо міжвидової та внутрішньовидової мінливості організмів. Інтрони є гіперваріабельними ділянками генів, оскільки саме в них відбуваються мутаційні процеси, зокрема інсерції або делеції нуклеотидів, на порядок частіше, ніж в екзонних ділянках генів. Такі кількісні зміни послідовностей інтронів чітко відображають різницю між гомологічними генами як одного виду, так і між різними видами організмів [4]. Серед переваг ILP – їх кодомінантність, нейтральність та стабільність. Зазвичай детекція ILP здійснюється за допомогою ПЛР та подальшого електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелі. Праймери для ПЛР підбираються до консервативних екзонних ділянок генів таким чином, щоб отримати велику кількість копій послідовностей між ними, тоб-

то інтронів. Подібні маркерні системи вже розроблені для генів α -амілази [5] та β -тубуліну [6].

ТВР (tubulin base polymorphism) – порівняно нова маркерна система, яка базується на виявленні поліморфізму довжин інтронів генів β -тубуліну (основний білок мікротрубочок клітини, що утворює велику родину генів). Було встановлено, що екзонні ділянки генів β -тубуліну є достатньо консервативними. Перший інтрон може бути джерелом ДНК-поліморфізму, оскільки є гіперваріабельною ділянкою в генах β -тубуліну [7]. На сьогодні вже існує декілька модифікацій ТВР-методу. Наприклад, сТВР (combinatorial tubulin-based polymorphism) – ампліфікуються другі інтрони β -тубуліну [8], h-ТВР (horse-ТВР) – дозволяє копіювати ділянку гена, що включає перший і другий інтрони разом з екзоном посередині [9]. Доцільність використання цієї системи було випробувано на таких видах родів: *Brassica* L., *Lotus* L., *Coffea* L., *Eleusine Gaertn.*, *Rosa* L. [10] та на деяких видах злаків, зокрема *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare* L. [11].

Актин – ключовий білок мікрофіламентів клітин, що відіграє ключову роль у більшості фундаментальних клітинних процесів [12]. Як і β -тубулін, утворює родину генів, що характеризується значною гомологією у різних видів організмів. Було показано, що гени актину, зокрема в геномі льону-довгунця (*Linum usitatissimum* L.), характеризуються консервативністю екзонних ділянок та гіперваріабельністю інтронних послідовностей [13]. Отже, інтрони генів актину можуть слугувати джерелом генного поліморфізму. Мета роботи – виявити поліморфізм довжин другого інтрону генів актину у вітчизняних та зарубіжних сортів льону-довгунця.

Матеріали і методи

Пошук генів, що кодують актин у геномі льону, здійснювали на основі анотованої послідовності актину – actin-1 (ACT1_ARATH) з *Arabidopsis thaliana*. За допомогою он-лайн інструмента BLASTN версії 2.2.26+ був проведе-

ний пошук відповідних послідовностей у базі даних Phytozome v9.1 (www.phytozome.net). Така методика використовувалася в попередніх роботах [14, 15], а повні результати пошуку генів актину в геномі льону-довгунця описано раніше [13, 14]. Для подальшого аналізу було відібрано дві послідовності генів актину, а саме ті, що закодовані в локусах Lus10021057 та Lus10029286. Дизайн ПЛР-праймерів для виявлення поліморфізму довжин другого інтрону генів актину, закодованих у локусах Lus10021057 та Lus10029286, здійснювали за допомогою програми **Primer-BLAST** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Було підібрано таку пару праймерів:

Lus-F: 5'- GGATGACATGGAGAAAATCTGGCAT-3'
Lus-R: 5'- GAGTTGTACGTGGTCTCGTGGAT-3'

Аналізували 10 сортів льону (*L. usitatissimum* L.) вітчизняної та зарубіжної селекції, що були люб'язно надані Інститутом луб'яних куль-

тур НААН України та Інститутом генетики і цитології НАН Білорусі, які представляють інтерес для сучасних селекційних досліджень, а саме: Глазур, Зенга, Ескаліна, Електра, Антей, Світанок, Светоч, Л-1120, Хейя 13, Хейя 15. ДНК з семиденних проростків цих сортів виділяли за допомогою ЦТАБ-методу [16]. Якість отриманої ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1 % агарозному гелі, а також спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» (США) з визначенням її концентрації.

ПЛР здійснювали 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. Taq полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили за таким протоколом: початко-

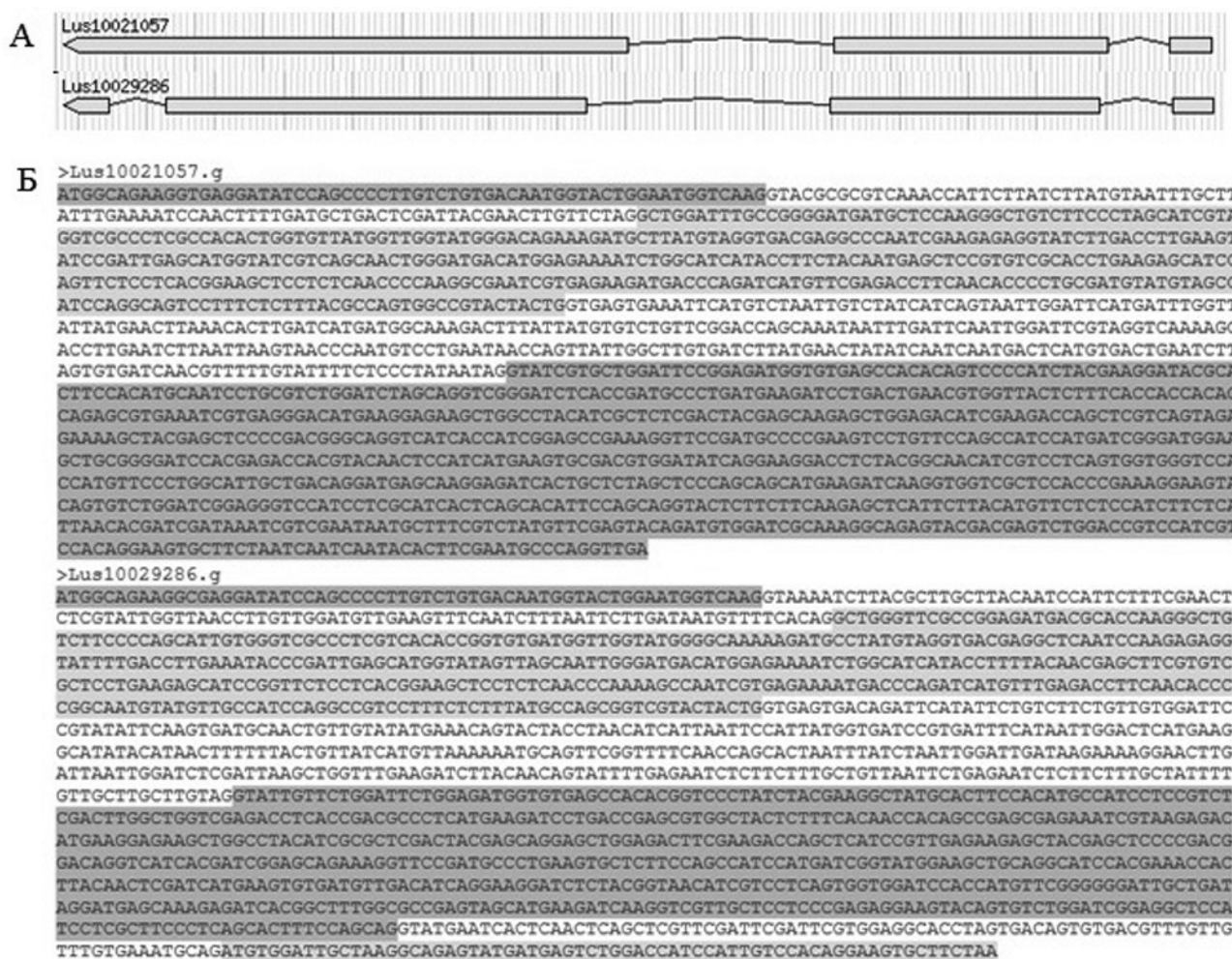


Рис. 1. Схематичне зображення генів актину (А) та їх нуклеотидні послідовності (Б). Блакитним кольором виділені екзони

ва 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 хв, 10°C – утримання. Кожну ПЛР-реакцію проводили як мінімум у двократній повторності, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації.

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 6 % неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1xTBE-буфері [16]. Візуалізацію фрагментів проводили за допомогою забарвлення нітратом срібла [17, 18]. Аналіз зображень здійснювали у програмі GelAnalyzer (gelanalyzer.software.informer.com/1.0/). Для визначення довжини фрагментів використовували маркер молекулярної маси (O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати та обговорення

У результаті попереднього біоінформаційного пошуку в базі даних Phytozome v9.1, було виявлено 13 нуклеотидних послідовностей, що належать до генів актину [13]. Для дослідження поліморфізму довжин другого інтрону у різних сортів льону-довгунця було обрано дві послідовності, закодовані в локусах *Lus10021057* та *Lus10029286*. Ген *Lus10005457* містить три екзони і два інтрони, а ген *Lus10029286* складається з чотирьох екзонів та трьох інтронів. Ці гени кодуєть поліпептидні ланцюги довжиною 377 амінокислот. Довжина гена *Lus10021057* складає 1650 п.н., а *Lus10029286* – 1680 п.н. (рис. 1).

Варто зазначити, що за результатами попереднього біоінформаційного аналізу обраних генів було передбачено, що довжини ампліконів загалом для генів *Lus10021057* та *Lus10029286* можуть складати близько 800 п.н. та 900 п.н. відповідно.

На електрофореграмі (рис. 2) показано наявність двох смуг ампліконів. Смуга 1 містить амплікони однакової довжини близько 913 п.н., які, ймовірно, відповідають другому інтрону гена *Lus10029286*. У межах смуги 2 (виділена прямокутником) амплікони мають різну кількість нуклеотидів. Для сортів Глазур, Електра, Світанок, Светоч та Хейя 15 довжина ампліконів складала приблизно 820 п.н.; для сортів Ескаліна, Антей, Л-1120 та Хейя 13 – приблизно 780 п.н. Зважаючи на це, смуга 2 є поліморфною.

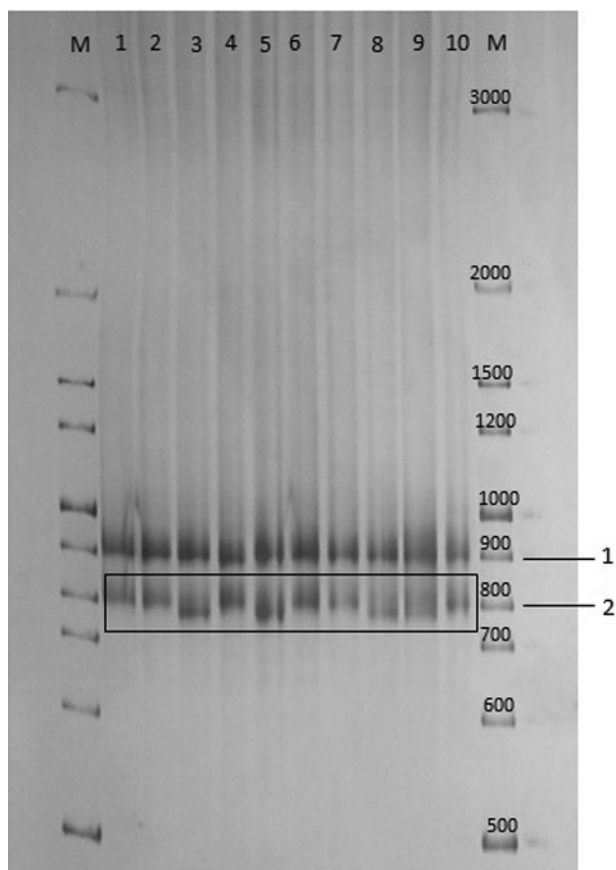


Рис. 2. Електрофореграма з ампліконами II-го інтрону генів актину *Lus10021057* та *Lus10029286* сортів льону-довгунця (діапазон 700–1000 п.н.). М – ДНК-маркер, 1–10 (у верхній частині рисунка) – досліджені сорти (Глазур, Зенга, Ескаліна, Електра, Антей, Світанок, Светоч, Л-1120, Хейя 13, Хейя 15); 1, 2 (з правого боку рисунка) – номери смуг; прямокутником виділена поліморфна смуга

Необхідно також зазначити, що для кожного проаналізованого сорту льону-довгунця притаманна наявність лише двох цільових ампліконів та повністю відсутні мономорфні нечіткі смуги, характерні для продуктів неспецифічного зв'язування з ДНК-матрицею та ПЛР-продуктами неповної ампліфікації.

Отже, результати проведеного дослідження свідчать про те, що вперше вдалося показати наявність поліморфізму довжин інтронів для одного з генів актину (*Lus10021057*) у різних сортів льону-довгунця. Для гена *Lus10029286* поліморфізм довжин інтронів поки не був встановлений. Отримані дані свідчать про те, що вивчення поліморфізму довжин інтронів актину може стати перспективним напрямком досліджень для роз-

робки нової маркерної системи з генотипування рослин та дослідження генетичної диференціації як на внутрішньовидовому, так і на міжвидовому рівні. В подальшому планується такий самий аналіз для всіх виявлених генів актину льону-довгунця, розроблення вироджених праймерів для дослідження поліморфізму інтронів актину льону, а також збільшення вибірок рослин.

Висновки

У результаті аналізу 10 сортів льону-довгунця вітчизняної та зарубіжної селекції виявлено міжсортний поліморфізм довжин другого інтрону в одному з генів актину. Продемонстровано доцільність проведення подальших досліджень із метою створення нової маркерної системи для генотипування та оцінки генетичної диференціації рослин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экол. генетика. – 2011. – 9. – С. 32–43.
2. Gupta P.K., Rustgi S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants // Funct. Integr. Genomics. – 2004. – 4. – P. 62–139.
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. – P. 417–427.
4. Vali U., Brandstrom M., Johansson M., Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations [Electronic resource] // BMC Genet. – 2008. – 9:8. – Mode of access: <http://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2156-9-8>.
5. Poczai P., Cernak I., Gorji AM., Nagy S., Taller J., Polgar Z. Development of intron targeting (IT) markers for potato and cross-species amplification in *Solanum nigrum* (Solanaceae) // Am. J. Bot. – 2010. – 97. – P. 142–145.
6. 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.
7. Пірко Я.В. Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів // Промышленная ботаника. – 2011. – 11. – С. 152–156.
8. Braglia L., Manca A., Mastromauro F., Breviario D. cTBP: a successful ILP-based genotyping method targeted to well defined experimental needs // Diversity. – 2010. – 2. – P. 572–585.
9. 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 β -tubulin gene family in *Camelina sativa* (L.) Crantz // Mol. Breeding. – 2011. – 28. – P. 635–645.
10. 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.
11. Рабокоть А.М., Демкович А.Є., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів в-тубуліну у сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – 2015. – 17. – С. 82–86.
12. McCundy D.W., Kovar D.R., Staiger C.J. Actin and actin-binding proteins in higher plants // Protoplasma. – 2011. – 215. – P. 89–104.
13. Постовойтова А.С., Баєр Г.Я., Пидюра М.О., Пастухова Н.Л., Пірко Я.В., Смець А.І., Блюм Я.Б. Пошук та аналіз послідовностей генів актину в геномі льону [Електронний ресурс] // Наукові доповіді НУБіП. – 2015. – № 8 (57). – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/index.html
14. Пидюра Н.А., Баєр Г.Я., Галиновский Д.В., Емец А.И., Пірко Я.В., Подвицкий Т.А., Анисимова Н.В., Хотылева Л.В., Кильчевский А. В., Блюм Я. Б. Биоинформационный поиск генов целлюлозосинтазы льна (*Linum usitatissimum*) и их филогенетический анализ // Цитология и генетика – 2015. – 49, № 5. – P. 3–12.
15. Рабокоть А.Н., Постовойтова А.С., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Анализ гомологов генов основных белков цитоскелета у различных видов высших растений // Фактори експериментальної еволюції організмів: Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – 2014. – 14 – P. 71–76.
16. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – Cold Spring Harbor, 2001. – 2. – P. 763.
17. Benbouza H., Jean-Marie J., Jean-Pierre B. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. – 2006. – 10, № 2. – P. 77–81.
18. 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.

POSTOVOITOVA A.S., PIRKO YA.V., BLUME YA.B.

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

THE SECOND INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF ACTIN GENES IN *LINUM USITATISSIMUM* L. GENOME

Aim. In recent years many promising new alternative molecular marker techniques have been developed in plant genetics. Molecular markers may be generated from functional and/or transcribed regions of the genome using different gene-targeting approaches. Recent reports have shown intron length polymorphism (ILP) to be a convenient and reliable source of information with high interspecies and intraspecies variability. **Methods.** PCR amplification and CTAB-method for the isolation of DNA were used. Amplification products were divided by electrophoresis in 6 % polyacrylamide gel and visualized using silver nitrate method. **Results.** 10 varieties of flax (*Linum usitatissimum* L.) were analysed. The presence of intron length polymorphism has been shown in one of the actin genes. That is gene *Lus10021057*. It was found that the number of the amplicons that correspond the second intron of actin varying within 780 to 820 bp. **Conclusions.** The data obtained show that the intron length polymorphism of actin genes can be used for the detection of genetic diversity in different taxa of plants.

Keywords: molecular marker, actin, (tubulin base polimorphism), ILP (intron length polymorphism).