

НОВОЖИЛОВ Д. О.^{1✉}, РАБОКОНЬ А. М.¹, БЛЮМ Р. Я.¹, ДЕМКОВИЧ А. Є.¹, ПРИВАЛІХІН С. М.¹, МИХАЙЛОВА Д. М.², ПІРКО Я. В.¹, БЛЮМ Я. Б.¹

¹ Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а

² Київський національний університет ім. Т. Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»,

Україна, 03022, м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2, ORCID: 0009-0008-1491-7166, 0000-0002-6249-1824, 0000-0003-4936-1803, 0000-0002-7433-1203, 0009-0006-2462-2105, 0009-0000-3669-9552, 0000-0003-1887-5406, 0000-0001-7078-7548

✉ novozhylovd@gmail.com, yarvp1@gmail.com

СТВОРЕННЯ ІЛР-МАРКЕРІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ У БАЗИДІЄВИХ ГРИБІВ

Мета. Створення маркерів для визначення поліморфізму довжини інтронів (Intron Length Polymorphism – ІЛР) генів β -тубуліну у різних груп базидіоміцетів. **Методи.** Методи класичної біоінформатики для пошуку локусів генів, що кодують β -тубуліни базидієвих грибів, кладистичний аналіз, аналіз екзон-інтронної структури генів, створення ІЛР-маркерів, верифікація отриманих праймерів за допомогою ІЛР *in silico*. **Результати.** Проаналізовано екзон-інтронну структуру генів β -тубулінів базидієвих грибів. Створено шість маркерів для визначення поліморфізму довжини інтронів, що охоплюють 2, 3, 5, 6 інтрони генів β -тубулінів базидіоміцетів і їх комбінації, що можуть бути використані для молекулярної філогенії певних груп видів грибів. **Висновки.** Доведено значну варіабельність структури генів β -тубулінів грибів, що унеможливає створення універсальних для базидіоміцетів ІЛР маркерів на основі генів β -тубуліну. Розроблено ряд маркерів, які можуть бути використані для дослідження поліморфізму довжини інтронів різних груп базидіоміцетів, що потенційно розширює можливості для генотипування грибів.

Ключові слова: генотипування, екзон-інтронна структура, β -тубулін, ІЛР-маркери, *Basidiomycota*.

Гриби є важливою частиною живих екосистем, що забезпечують розклад органічних речовин, беручи участь у симбіотичних взаємодіях з іншими організмами. Вони слугують важливим харчовим ресурсом для багатьох видів живих організмів. Точна ідентифікація видів грибів є критично важливою для широкого спектру досліджень, включаючи екологію, систематику, біоте-

хнологію та охорону природи. Баркодинг базидієвих грибів, зокрема їстівних, є актуальною задачею у селекції, контролі якості харчових продуктів, екологічних дослідженнях. Наприклад, генотипування грибів – важливий інструмент для визначення часових і просторових паттернів міграції грибів, що є важливою частиною екологічних досліджень.

Традиційно, генотипування грибів здійснюється за допомогою ITS (Internal transcribed spacer) системи, що базується на визначенні поліморфізму довжини і послідовності спейсерної ДНК, розташованої між генами малої субодиниці рибосомної РНК і великої субодиниці рибосомної РНК. Однак цей підхід не є абсолютно універсальним для грибів, а його використання пов'язане з рядом недоліків. З ростом кількості робіт з баркодування грибів зростає і необхідність у додаткових маркерах, що дозволяють розділяти види і штами у випадках, коли класичного ITS недостатньо. Тривалий пошук таких маркерів призвів до використання для баркодингу фрагментів ряду генів: субодиниці 1 мітохондріальної цитохром-с-оксидази (COI), nLSU, nSSU, mSSU, mitSSU, RPB1, RPB2 і TEF1, субодиниці 6 мітохондріальної НАДН-дегідрогенази (ND6), MCM7, кальмодуліна (CAL), γ -актина (ACT), β -тубуліну 2 (TUB2), гомолога білка обробки пре-мРНК (Tsr1), FG1093, MS204, фосфогліцераткінази (PGK), ДНК-топоізомерази I (TOP1), LNS2, індол-3-гліцеролфосфатсинтази (IGPS), фосфорибозиламіноімідазолкарбоксилази PurE, пептид-метіонінсульфоксидредуктази (Msrf), вакуолярної АТФ-ази (vATP), що дозволяють генотипувати певні групи видів [1].

© НОВОЖИЛОВ Д. О., РАБОКОНЬ А. М., БЛЮМ Р. Я., ДЕМКОВИЧ А. Є., ПРИВАЛІХІН С. М., МИХАЙЛОВА Д. М., ПІРКО Я. В., БЛЮМ Я. Б.

Серед сучасних підходів ДНК-баркодингу одним з найбільш вживаних є оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, основного білку мікротрубочок. У контексті грибів метод успішно застосовувався переважно для аскомікотових грибів та лише деяких базидіомікотових [2, 3]. Більшість існуючих маркерів, котрі використовуються для генотипування базидієвих грибів вимагають залучення дороговартісних та складних експериментальних процедур, що значно ускладнює молекулярно-генетичні та біотехнологічні дослідження. Зважаючи на це, нами була здійснена спроба створити ІЛР маркери, що ґрунтуються на використанні поліморфізму інтронів генів β -тубуліну базидіоміцетів, що розширило б можливості для генотипування грибів.

Матеріали і методи

Усі послідовності генів β -тубуліну взяті з бази даних NCBI GenBank [4]. Була створена вибірка кодуючих нуклеотидних послідовностей β -тубулінів базидіоміцетів, повних та часткових, довжиною щонайменше 1000 п.о. Загалом 341 послідовність, з яких 85 належать макроміцетам. Оскільки більшість кодуючих послідовностей (CDS) вибірки була неповною, для створення потенційних ІЛР-маркерів для інтронів 5 і 6 було проведено вирівнювання спільних фрагментів цих CDS. У випадку створення ІЛР-маркерів для інтронів 2 і 3 з вибірки були відібрані послідовності, що містили 5'-термінальний фрагмент до 5 екзону включно. Вирівнювання послідовностей проводилось за допомогою ClustalX [5], за результатами якого були побудовані кладограми за N-J алгоритмом. Дизайн праймерів здійснювався за допомогою вбудованих інструментів програмного пакету AliView [6]. Перевірка маркерів здійснювалась шляхом *in silico* ПЛР за допомогою програмного пакету FastPCR [7] та сервісу NCBI PrimerBLAST [8].

Результати та обговорення

Аналіз відібраних послідовностей генів β -тубулінів грибів, депонованих у базі даних NCBI GenBank, показав суттєві відмінності в їх екзон-інтронній структурі (рис. 1). Аскомікотові та базидіомікотові гриби демонструють два різні патерни екзон-інтронної структури, що ставить під питання можливість використання, точність та універсальність маркерів поліморфізму довжини інтронів (ІЛР) генів β -тубуліну, дизайн більшості з яких спирається на послідовності генів аскомікотових грибів.

Взявши за мету створення ІЛР-маркерів, придатних до використання для генотипування базидієвих грибів, нами була створена широка вибірка кодуючих послідовностей β -тубулінів. Аналіз результатів вирівнювання та клади-стичний аналіз 341 послідовності очікувано показав, що створити єдині універсальні маркери для базидієвих грибів, навіть в межах макроміцетів, є доволі складною задачею, проте вдалося створити маркери для певних груп грибів.

Було запропоновано маркер (*tubb5/6*) для вивчення поліморфізму довжини 5 і 6 інтронів, спільний для β -тубулінів різних видів деревних грибів роду герицій (*Hericium*). Ця ж пара праймерів при перевірці *in silico* показала можливість застосування також для кандоломіцесу широкоспорового *Candolleomyces eurysporus*, гнойовика звичайного (*Coprinus cinereus*) та солом'яного гриба (*Volvariella volvacea*). (рис. 2)

Серед їстівних грибів спільні маркери (*tubb4/5*) можна створити для дослідження поліморфізму довжини 4 і 5 інтронів генів β -тубулінів енокітаке (*Flammulina filiformis*), козляка (*Suillus bovinus*), солом'яного гриба (*Volvariella volvacea*), лаковиці двоколірної (*Laccaria bicolor*), печериці садової (*Agaricus bisporus*), гливи саджор-каю (*Pleurotus sajor-caju*) та рядовки мацутаке (*Tricholoma matsutake*). (рис. 2)



Рис. 1. Екзон-інтронна структура генів β -тубулінів аско- і базидіоміцетів на прикладі кордіцепсу військового (*Cordyceps militaris*) та печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*).

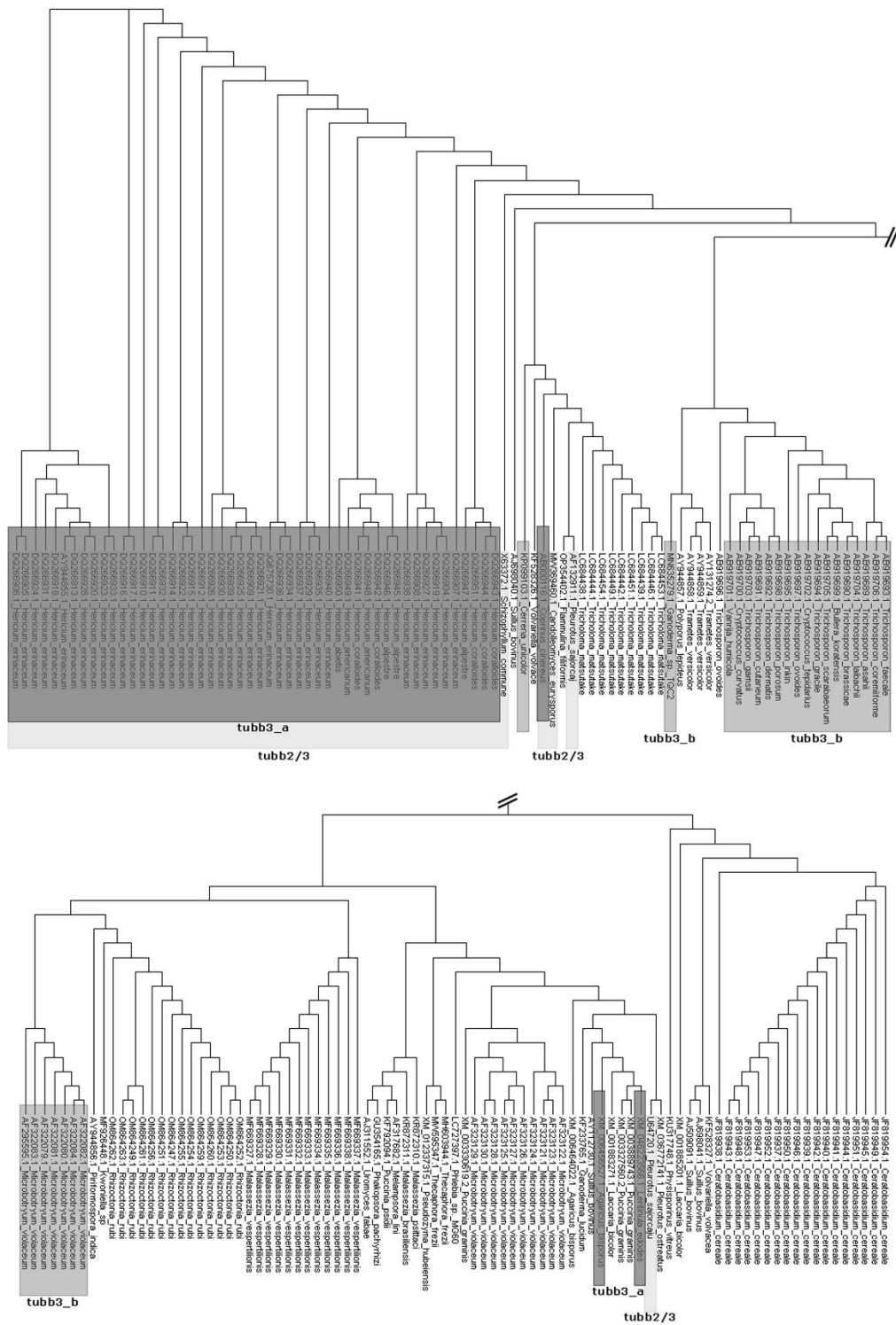


Рис. 3. Кладистичне дерево (у двох частинах), що відображає подібність послідовностей вибірки фрагментів (екзони 1-4) CDS β -тубулінів базидієвих грибів. Прямокутниками позначені послідовності, для яких створені потенційні ILP-маркери для 3 інтрону (**tubb3_a**, **tubb3_b**) і 2-3 інтронів (**tubb2/3**).

Також запропоновано додатковий маркер (*tubb2-6*), що включає інтрони з 2 по 6 для наступних видів: гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*), гливи саджор-каю (*Pleurotus sajor-caju*), гнойовика звичайного (*Coprinus cinereus*), козляка (*Suillus bovinus*), *Phlebia* sp. mg60, розщепки звичайної (*Schizophyllum commune*), кандоломіцесу широкоспорного (*Candolleomyces eurysporus*), енокітаке (*Flammulina filiformis*), лаковиці двоколірної (*Laccaria bicolor*), грибів роду герицій

(*Hericium alpestre*, *H. erinaceum*, *H. coralloides*, *H. abietis*, *H. americanum*), а також мікроміцету *Trichosporon dermatis* (рис. 4).

Дані щодо послідовностей праймерів для запропонованих маркерів зведені у таблицю. У випадках, коли наявні дані про довжину інтронів – наведені очікувані довжини продуктів ампліфікації.

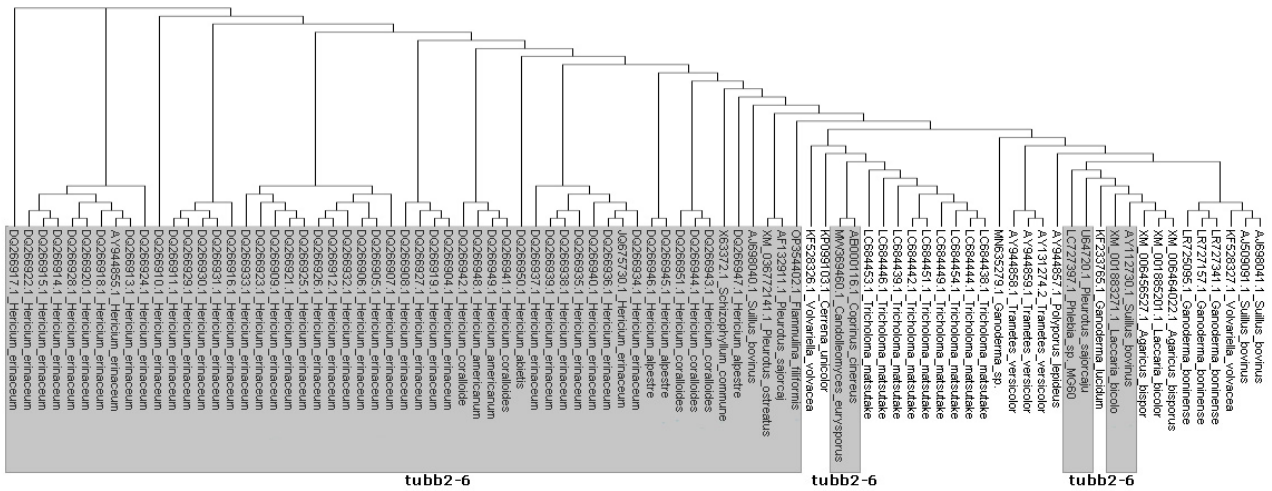


Рис. 4. Кладистичне дерево, що відображає подібність послідовностей вибірки фрагментів (екзони 1-7) CDS β-тубулінів базидієвих грибів. Прямокутники позначені послідовності, для яких створений потенційний маркер (*tubb2-6*).

Таблиця. Розроблені ILP-маркери для базидієвих грибів

Маркер	Праймери	Очікувані довжини ампліконів
1	2	3
tubb5/6	F: GTCCTTGATGTTGTTTCGCAA R: RAGCGCCTCGTTATCAATGCAG	<i>Volvariella volvacea</i> – 382 п.о., <i>Hericium erinaceum</i> – 413 п.о., <i>Hericium coralloides</i> - 424 п.о., <i>Candolleomyces eurysporus</i> - 717 п.о.,
tubb4/5	F: GTKCBAAGTTCTGGGARGT R: ACRGARTABGTGCACATCAT	<i>Suillus bovinus</i> - 566 п.о., <i>Volvariella volvacea</i> - 641 п.о., <i>Laccaria bicolor</i> - 657 п.о., <i>Tricholoma matsutake</i> – 657 п.о. <i>Agaricus bisporus</i> – 657 і 705 п.о.,
tubb3_a	F: AGTGCGGTAACCARATYGGT R: TCTCRTYGTAGTAGACRGAG	<i>Hericium alpestre</i> – 182 п.о., <i>Hericium erinaceum</i> - 182 п.о., <i>Hericium Coralloides</i> – 182 п.о. <i>Agaricus bisporus</i> – 187 п.о., <i>Coprinus cinereus</i> – 194 п.о.,

Продовження таблиці

1	2	3
tubb3_b	F: AGTGCGGTAACCARATYGGT R: TARTAVACGTTGATRCGCTCG	<i>Ganoderma boninense</i> – 192 п.о., <i>Phlebia tremellosa</i> – 121 п.о., <i>Trichosporon asahii</i> – 121 п.о., <i>Trichosporon coremiiforme</i> – 121 п.о., <i>Trichosporon faecale</i> – 121 п.о., <i>Trichosporon gracile</i> – 121 п.о., <i>Trichosporon inkin</i> – 121 п.о., <i>Trichosporon ovoides</i> – 121 п.о., <i>Trichosporon laibachii</i> – 155 п.о., <i>Trichosporon dermatitis</i> – 158 п.о., <i>Trichosporon brassicae</i> – 162 п.о., <i>Trichosporon porosum</i> – 175 п.о., <i>Trichosporon gamsii</i> – 210 п.о., <i>Trichosporon cutaneum</i> – 228 п.о., <i>Bullera koratensis</i> – 198 п.о., <i>Cryptococcus curvatus</i> – 162 п.о., <i>Cryptococcus tepidarius</i> – 214 п.о., <i>Vanrija humicola</i> – 121 п.о.
tubb2/3	F: ATGCGTGAAATCGTCCACATCC R: TCTCRTYGTAGTAGACRGAG	<i>Schizophyllum commune</i> – 271 п.о., <i>Candolleomyces eurysporus</i> – 288 п.о., <i>Coprinus cinereus</i> – 301 п.о.
tubb2-6	F: ATGCGTGAAATCGTCCACATCC R: RAGCGCCTCGTTATCAATGCAG	<i>Suillus bovinus</i> – 906 п.о., <i>Pleurotus ostreatus</i> – 914 п.о., <i>Schizophyllum commune</i> – 939 п.о., <i>Coprinus cinereus</i> – 1057 п.о., <i>Candolleomyces eurysporus</i> – 1068 п.о.

Висновки

В ході аналізу послідовностей та екзон-інтронної структури генів β-тубулінів базидіоміцетів була доведена неможливість створення універсальних ILP маркерів. Створено ряд маркерів (tubb3_a, tubb3_b, tubb2/3, tubb5/6, tubb4/5, tubb2-6) для визначення поліморфізму довжини

інтронів, що охоплюють 2, 3, 5, 6 інтрони генів β-тубулінів базидіоміцетів та їх комбінації, але їх використання обмежено певними групами грибів. Ці маркери можуть бути використані як допоміжний інструмент та частково вирішити проблему ДНК-баркодингу базидієвих грибів.

References

- Xu J. Fungal DNA barcoding. *Genome*. 2016. Vol. 59 (11). P. 913–932. doi: 10.1139/gen-2016-0046.
- O'Brien H. E., Miadlikowska J., Lutzoni F. Assessing reproductive isolation in highly diverse communities of the lichen-forming fungal genus peltigera. *Evolution*. 2009. Vol. 63. P. 2076–2086. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00685.x.
- Park Y-J. Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of a specific marker for identification of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012. Vol. 6 (25). P. 5417–5425. doi: 10.5897/AJMR12.846.
- Sayers E. W., Cavanaugh M., Clark K., Pruitt K. D., Schoch C. L., Sherry S. T., Karsch-Mizrachi I. GenBank. *Nucl. Acids Res.* 2021. Vol. 49 (D1). P. D92–D96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1023>.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23. P. 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30 (22). P. 3276–3278. doi: 10.1093/bioinformatics/btu531.
- Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y., Samuilova O., Ivanov K. I. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*. 2017. Vol. 109 (3–4). P. 312–319. doi: 10.1016/j.ygeno.2017.05.005.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012. Vol. 13. P. 134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

NOVOZHYLOV D. O.¹, RABOKON A. M.¹, BLUME R. Y.¹, DEMKOVYCH A. Y.¹, PRYVALIKHIN S. M.¹, MYKHAILOVA D. M.², PIRKO Ya. V.¹, BLUME Ya. B.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevetskoho str., 2a

² Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv, Akademika Hlushkova Ave., 2

DESIGN OF ILP MARKERS FOR β -TUBULIN GENES ANALYSIS IN BASIDIOMYCETE FUNGI

Aim. Creation of markers for determining intron length polymorphism (Intron Length Polymorphism – ILP) of β -tubulin genes in different groups of basidiomycetes. **Methods.** Use of classical bioinformatics methods to searching for loci encoding β -tubulin genes of basidiomycete fungi, cladistic analysis, analysis of the exon-intron structure of genes, design of potential ILP markers, verification of the designed primers using *in silico* PCR. **Results.** The exon-intron structure of β -tubulin genes in basidiomycetes was analyzed. Six markers were designed to determine intron length polymorphism, covering introns 2, 3, 5, and 6 of β -tubulin genes in basidiomycetes, along with their combinations, which can be used for molecular phylogeny of specific fungal species groups. **Conclusions.** A significant exon-intron structure variability has been shown for the analysed fungi species, which significantly complicates the creation of universal ILP markers for basidiomycetes. A number of potential markers have been designed that can be used to study intron length polymorphism of different groups of basidiomycetes, potentially expanding the possibilities for genotyping fungi.

Keywords: genotyping, exon-intron structure, β -tubulin, ILP markers, *Basidiomycota*.