

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

ПІРКО ЯРОСЛАВ ВАСИЛЬОВИЧ



УДК 575.2:577.2

**ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ БІЛКІВ ЦИТОСКЕЛЕТУ
ЯК ЕФЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ ГЕНОТИПУВАННЯ РОСЛИН**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у відділах геноміки та молекулярної біотехнології і популяційної генетики Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович,
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», директор,
завідувач відділу молекулярної геноміки та біотехнології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Терновська Тамара Костянтинівна,
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
МОН України, завідувач кафедри біології

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Волкова Наталія Едуардівна,
Товариство з обмеженою відповідальністю «Котекна
Україна Лімітед», заступник начальника відділу
молекулярної генетики та фітосанітарної експертизи

доктор біологічних наук, професор
Дробик Надія Михайлівна,
Тернопільський національний педагогічний університет
імені Володимира Гнатюка, декан хіміко-біологічного
факультету

Захист дисертації відбудеться 12 травня 2021 року о 15.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.254.01 ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а.
Тел/факс: (044) 463 05 32, e-mail: d26.254.01@ukr.net

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

Автореферат розіслано «12» квітня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., доц.



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Для генотипування рослин досить широко використовують молекулярно-генетичні маркери, зокрема, ДНК-маркери, яких на сьогодні існує значна кількість. Кожен з маркерів має свої переваги та недоліки, деякі застосовуються тільки з певною метою. В той же час, по мірі накопичення інформації щодо структури геномів рослин постійно продовжуються пошуки нових, більш ефективних, зручних і дешевих маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу.

До нової генерації маркерів, що базуються на знанні структури генів, а саме, їх екзон-інтронної структури, відносяться ILP-маркери (Intron Length Polymorphism, або поліморфізм довжини інтронів) (Braglia et al., 2010). Система, яка ґрунтується на такого роду поліморфізмі, буде тоді ефективною, коли ділянки екзонів генів мають високий рівень гомології. До таких можна віднести гени, що кодують білки цитоскелету клітини, наприклад, тубуліни, актин тощо. Варто зазначити, що тубуліни є ключовими білками апарату клітинного поділу (входять до складу мікротрубочок), а також відіграють дуже важливу роль у життєдіяльності клітини (наприклад, транспорт везикул, підтримання форми клітин, відкладення клітинної стінки та інше) (Liaud et al., 1992, Nogales et al., 2000, McKean et al., 2001, Blume et al., 2008). На цей час вже розроблено систему, яка застосовується для генетичного профілювання генотипів рослин і ґрунтується на вивченні поліморфізму інтронів генів β -тубуліну (TBP-аналіз, Tubulin Base Polymorphism) (Bardini et al., 2004).

Враховуючи еволюційну універсальність білків цитоскелету, можна передбачити певну їхню консервативність у рослин різних систематичних груп (гомологію за амінокислотними послідовностями), і, відповідно, нуклеотидних послідовностей генів, що їх кодують. У більшості випадків це стосується екзонів. В той же час інтрони належать до гіперваріабельних ділянок генів і можуть мати різну довжину. Завдяки тому, що довжина інтронів у різних таксономічних одиниць (і навіть рослин в межах однієї групи) може бути різною, спостерігається їх поліморфізм. Таким чином, аналіз поліморфізму довжини інтронів генів таких білків цитоскелету, як α -, β -, γ -тубуліни та актин, є новим підходом, який може бути застосований для генотипування рослин.

Варто зазначити, що поліморфізм довжини інтронів генів цитоскелетних білків взагалі не досліджений у багатьох голо- та покритонасінних видів рослин. Також не виключено, що поліморфізм довжини інтронів генів цитоскелету може виявитися пов'язаним зі ступенем вираження деяких фенотипових ознак, в тому числі, цінних для сільського господарства, або бути пов'язаним з адаптацією як окремих особин, так і видів в цілому до умов навколишнього середовища. Таким чином, оцінка поліморфізму довжини інтронів, зокрема генів, що кодують α -, β -, γ -тубуліни та актин, може стати швидким, простим, надійним та універсальним методом генотипування рослин, який не вимагає наявності значної попередньої інформації про геноми рослин, і дозволяє диференціювати різні таксономічні одиниці між собою. Розширення лінійки маркерів за рахунок залучення у дослідження інтронів генів нових білків цитоскелету може виявитися корисним у

подальших молекулярно-генетичних та генетико-селекційних дослідженнях різних видів рослин, чим і пояснюється актуальність обраної теми досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології та у відділі популяційної генетики Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» в рамках бюджетних науково-дослідних робіт «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (ДР № 0112U001597, 2012–2016 рр.), «Популяційна біологія і генетика видів деревних рослин на антропогенно трансформованих ландшафтах» (ДР № 0112U007760, 2014–2017 рр.), «Створення молекулярно-генетичних маркерів для диференціації різних генотипів рослин на основі вивчення поліморфізму інтронів генів їх цитоскелетних білків» (ДР № 0115U005025, 2015–2019 рр.).

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було на основі аналізу екзон-інтронної структури генів, що кодують цитоскелетні білки (α -, β -, γ -тубулін та актин) у рослин, розробити та впровадити молекулярно-генетичні маркери для вивчення поліморфізму інтронів та їх подальшого застосування у молекулярно-генетичних дослідженнях. За допомогою розроблених маркерів здійснити генетичне профілювання (генотипування) окремих генотипів, сортів, популяцій та видів рослин різних таксономічних груп.

Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити наступні завдання:

1. За допомогою біоінформатичних підходів здійснити пошук гомологічних послідовностей генів, що кодують α -, β -, γ -тубуліни та актин у різних видів рослин, встановити їх екзон-інтронну структуру.

2. Провести окремо пошук консенсусних послідовностей для кожної групи генів цитоскелетних білків (α -, β -, γ -тубулінів та актину), що об'єднують консервативні ділянки генів – екзони, та здійснити дизайн олігонуклеотидних праймерів для ампліфікації інтронних ділянок.

3. Проаналізувати специфічність і чутливість методів, що базуються на вивченні поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину у різних видів рослин, провівши за допомогою розроблених маркерів генотипування окремих генотипів, сортів, популяцій, видів вищих рослин та мікрородостей.

4. Здійснити генотипування однодольних рослин шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину, зокрема кримських популяцій егілопсу двохдьюмового (*Aegilops biuncialis* Vis.), вибірки сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) та ячменю (*Hordeum vulgare* L.).

5. Здійснити генотипування щучнику антарктичного (*Deschampsia antarctica* E. Desv.) за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та сортів рису (*Oryza sativa* L.) за допомогою поліморфізму інтронів генів актину.

6. Здійснити генетичне профілювання дводольних рослин за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину, зокрема, рижію посівного (*Camelina sativa* L. Cranz.) та за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну – видів роду Деревій (*Achillea glaberrima* Klok. та *Achillea leptophylla* Vieb.).

7. Співставити ефективність генотипування різних видів льону (*Linum L.*), а також сортів льону української селекції за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну, актину та мікросателітних маркерів.

8. Генотипувати представників родини *Solanaceae* – картоплі (*Solanum tuberosum L.*) та томату (*Solanum lycopersicum L.*) шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.

9. Дослідити можливість застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для вивчення генетичної мінливості деревних рослин.

10. Встановити генетичну структуру деревостанів *Quercus robur L.* на антропогенно змінених територіях, а також за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів встановити генетичні особливості фенологічних форм дубу звичайного *Quercus robur L.*

11. Встановити генетичну структуру деревостанів в'язу карликового (*U. pumila*) та в'язу коркового (*U. suberosa*) у Степовому Придніпров'ї за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів.

12. З'ясувати ефективність використання поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну для генотипування та генетичної диференціації різних видів рослин рослин.

13. Перевірити ефективність генотипування рослин за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну.

14. Визначити ефективність застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР-метод) та комбінаторного (сТВР-метод) для генотипування зразків мікрводоростей.

15. Порівняти ефективність застосування ДНК-маркерних систем, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів цитоскелетних білків, з іншими генетичними маркерами, зокрема мікросателітними, на прикладі різних видів рослин.

Об'єкт дослідження – поліморфізм довжини інтронів генів основних цитоскелетних білків (α -, β -, γ -тубуліни та актин) у рослин.

Предмет дослідження – нуклеотидні послідовності генів цитоскелетних білків (α -, β -, γ -тубуліну та актину), закодовані в геномах різних видів рослин; використання поліморфізму інтронів цих генів в молекулярно-генетичних дослідженнях рослин.

Методи дослідження. Аналіз екзон-інтронної структури генів білків рослин, що кодують α -, β -, γ -тубулін, актин та їх гомологів за допомогою геномних баз даних, зокрема Phytozome. Аналіз генів, встановлення розміру інтронів, пошук консенсусних послідовностей та дизайн праймерів за допомогою біоінформатичних підходів. Молекулярно-генетичні методи (виділення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофорез продуктів ампліфікації в агарозному та поліакриламідному (ПААГ) гелях. Статистичні методи (визначення індексу поліморфності PIS, побудова дендрограм, розрахунок коефіцієнтів подібності Нея та Лі, стандартної генетичної дистанції Нея) застосовували для оцінки статистичної значимості отриманих даних і для визначення ступеня подібності різних генотипів рослин.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено нові ІЛР-маркерні системи, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів цитоскелетних білків у різних видів рослин. Вперше оцінено поліморфізм інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину на видовому, популяційному, сортовому та внутрішньосортівому рівнях у різних видів рослин. Вперше на підставі результатів аналізу поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину проведено генетичне профілювання таких господарсько цінних видів рослин, як льон-довгунець, рис посівний, пшениця, ячмінь, томат та картопля. Також завдяки оцінці поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину вперше досліджено генетичну мінливість та диференційовано природні популяції егілопсів *Aegilops biuncialis* з Кримського півострову. Використовуючи аналіз поліморфізму інтронів генів актину та α -тубуліну генотиповано сорти томату (*S. lycopersicum*) та картоплі (*S. tuberosum*), отримано специфічні ДНК-профілі досліджених сортів. Вперше оцінений міжсортівий та внутрішньосортівий поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну та актину у різних сортів льону-довгунця. Вперше показана висока ефективність використання ІЛР-маркерів, що базуються на оцінці поліморфізму інтронів генів цитоскелетних білків у порівнянні з SSR-маркерами на прикладі аналізу родів *Linum* L., *Quercus* L., *Ulmus* L. Продемонстровано зручність та надійність застосування методу ТВР-аналізу для молекулярно-генетичного маркування трав'янистих та деревних рослин, а також для вивчення окремих аспектів внутрішньовидового поліморфізму господарчо цінних, садово-паркових та лісоутворюючих порід. Вперше за допомогою ТВР-методу ідентифіковано унікальні патерни для 20 деревних видів рослин та створено молекулярні профілі кожного з цих видів. Також вперше отримано специфічні ТВР-профілі мікроводоростей, які дозволили чітко диференціювати генотипи на різних таксономічних рівнях та підтвердити однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблені ІЛР-маркерні системи, що базуються на аналізі поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубуліну, а також актину, можуть бути застосовані для генотипування (ДНК-профілювання) різних генотипів, сортів, популяцій, видів рослин під час філогенетичних, популяційно-генетичних та селекційно-генетичних досліджень. Зокрема, продемонстровано високу диференціюючу здатність методу ТВР-аналізу на генотипах та видах роду елевсина (*Eleusine*). ТВР-метод та аналіз поліморфізму інтронів генів актину (АВР-аналіз, Actin Base Polymorphism) дозволили генотипувати кримські популяції егілопсу (*Aegilops biuncialis*) та виявити їх гетерогенність, що може бути використано у селекційно-генетичних програмах з покращення пшениці. ТВР-метод виявився ефективним для оцінки генетичної різноманітності ряду ендемічних рослин, зокрема, *Deschampsia antarctica*, *Achillea glaberrima* Klok. та *Achillea leptophylla* Vieb., що може бути використано для розроблення програм генетичного моніторингу та комплексної охорони видів. Завдяки ТВР/сТВР-аналізу та АВР-аналізу перспективних олійних сортів та сортозразків рижю (*C. sativa*) української селекції, встановлено їх міжсортівий поліморфізм. Практично цінним виявилось застосування ТВР, АВР-аналізу в комбінації з аналізом мікросателітних маркерів для генотипування та генетичної диференціації сортів льону української селекції. Було показано, що більшість

досліджених сортів льону української селекції є генетично гетерогенними. Продемонстрована досить висока ефективність використання ІЛР-аналізу для диференціації генотипів льону в порівнянні з SSR-маркерами. Також продемонстровано застосованість ІЛР-маркерних систем для генотипування деревних рослин. Отримано ІЛР-профілі вікових дерев дубу звичайного *Quercus robur*. Також за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину здійснено генетичне профілювання ранньої та пізньої фенологічних форм *Q. robur*, що може бути використано у практиці зеленого будівництва. Ефективність диференціювання генотипів мікрородостей на різних таксономічних рівнях за допомогою ТВР та сТВР-аналізу свідчить про доцільність використання цих методів у молекулярно-філогенетичних дослідженнях нижчих рослин.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є завершеною самостійною науковою працею, виконаною на підставі власних теоретичних і практичних напрацювань. Автором дисертаційної роботи особисто розроблено її концепцію та структуру, здійснено аналіз літературних джерел, визначено експериментальні завдання, проведено аналіз отриманих результатів, зроблено рисунки і таблиці, сформульовано висновки та положення, викладені у дисертації. Основна частина результатів експериментальних досліджень, представлених у дисертації, отримана автором особисто. До дисертації включено дані експериментів, проведених разом з науковими співробітниками відділу популяційної генетики. В обговоренні результатів та написанні статей брали участь співавтори відповідних публікацій. Права співавторів не порушено. Під час обговорення мети та завдань дослідження, отриманих даних і всієї роботи здобувач користувався консультаціями академіка НАН України, д.б.н., професора Я.Б. Блюма. В цілому, у проведенні досліджень, їх аналізі та узагальненні частка автора складає близько 85%.

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи викладено та обговорено на наукових конференціях: міжнародних конференціях «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Умань, 22–26 вересня 2014 р., 2–6 жовтня 2017 р.; Чернівці, 14–18 вересня 2015 р.; Одеса, 12–16 вересня 2016 р.; Яремче, 17–21 вересня 2018 р., Київ, 15–20 вересня 2019 р.), II-й конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 24–25 грудня 2013 р.), III-й міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 24–27 лютого 2014 р.), Annual Meeting ASCB (San Francisco, California, USA, 3–7 грудня 2016 р.), III-й Міжнар. науковій конф-ції «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Минск, Беларусь, 23–25 листопада 2016 р.), Міжн. наук. конф-ції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (Одеса, 12 вересня 2017 р.), Третій конф-ції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 16–18 травня 2017 р.), 5-й Міжн. конф-ції-наradі «Сохранение лесных генетических ресурсов» (Гомель, 02–07 жовтня 2017 р.), Міжн. науковій конф-ції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (Одеса, 12 вересня 2017 р.), Третій конф-ції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 16–18 травня 2017 р.), The 7th Baltic Genetics Congress (Riga, Latvia, 24–27 жовтня 2018 р.), Міжнародній науково-практичній конф-ції «Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин» (Харків, 4–5 липня 2018 р.), 4th Int. Sci. Conference “Agrobiodiversity for

Improve the Nutrition, Health And Quality of Human and Bees Life” (Nitra, Slovakia, 11–13 вересня 2019 р.), Міжн. наук. конф-ції «Проблеми уникнення втрат біорізноманіття українських Карпат» (Львів, 14–15 травня 2020 р.).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 37 наукових праць, з них 23 статті в українських та зарубіжних наукових виданнях та 13 тез у збірниках матеріалів всеукраїнських та міжнародних конференцій, 1 патент.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 385 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 7 розділів, висновків, списку використаних джерел, додатку. Обсяг основного тексту дисертації складає 289 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 42 таблицями, 124 рисунками. Список використаних джерел містить 475 найменувань, з них 398 латиницею та 77 кирилицею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Огляд літератури присвячений використанню молекулярно-генетичних маркерів у дослідженні генетичного поліморфізму рослин. В ньому описано основні типи ДНК-маркерів, розглядаються питання поліморфізму довжини інтронів генів як основи для розроблення молекулярно-генетичних маркерів. На прикладі генів β -тубуліну розглянуто можливість застосування ІЛР-маркерів для генотипування різних організмів, оцінки їх таксономічної спорідненості та вимірювання генетичних дистанцій. Відзначено, що ТВР-метод має певний набір переваг в порівнянні з іншими методами, котрі базуються на вивченні поліморфізму довжини інтронів, зокрема завдяки високій міжвидовій універсальності. Це пов'язано з високим консерватизмом фланкуючих інтрони ділянок екзонів генів β -тубуліну, до яких підібрані праймери. Така особливість робить ТВР-метод більш ефективним для прискореної оцінки генетичної різноманітності у порівнянні з популярними AFLP або SSR маркерами, для яких необхідна попередня інформація про структуру геному. ТВР-маркери показали себе як універсальна маркерна система, що дозволяє отримати видоспецифічні ДНК-профілі різних видів рослин. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну може бути використана як джерело інформації для генотипування та генетичної диференціації різних генотипів, сортів, популяцій та видів рослин. Наведено інформацію стосовно потенціалу застосування генів α -, γ -тубуліну та актину для створення молекулярно-генетичних маркерів, що базуються на вивченні поліморфізму довжини інтронів їх генів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Рослинний матеріал. Поліморфізм довжини інтронів генів α -, β -, γ -тубуліну та актину вивчали на різних генотипах, сортах (сортозразках) та видах як однодольних, так і дводольних рослин. В дослідженні були використані різні види покритонасінних рослин, а також водоростей.

Серед однодольних рослин:

1) ячмінь звичайний (*Hordeum vulgare* L.) – етіольовані проростки або зелена маса 30 сортів; 2) пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) - 12 сортів м'якої ярої

пшениці вітчизняної селекції; 3) рис посівний (*Oryza sativa* L.) - 6 сортів, наданих Інститутом рису НААН України; 4) *Aegilops biuncialis* Vis. - насіння з 15 різних популяцій Криму; 5) *Deschampsia antarctica* E. Desv. - 37 зразків рослин, які походять із двох географічно віддалених регіонів морської Антарктики (матеріал зібраний учасниками IX-XII-ї та XV-ї (2010/11) Українських антарктичних експедицій і І.А. Козерецькою на станції «Генрик Арцтовський» (2005/06)); 6) пальчасте просо (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) У роботі використано два українських сорти пальчастого проса *E. coracana* та два соматоклональних варіанти *E. coracana* (SE-1, SE-4), отримані від сорту Тропіканка (Баєр та ін., 2009), а також три генотипи гусячої трави (*E. indica* (L.) Gaertn.), один з яких є природною популяцією цього виду, а два інші (*E. indica* 4A-21, *E. indica* 4A-1) є стійкими до дії динітроанілінових гербіцидів (люб'язно надані проф. У.В. Баярдом, Мічіганський Університет, США).

Серед дводольних рослин були досліджені наступні:

1) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – дикого типу; 2) ріжій посівний (*Camelina sativa* (L.) Crantz.) – використані 10-ть сортів та сортозразків, отримані у відділі нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України та сорти 'Міраж' та 'Клондайк' селекції Інституту олійних культур НААН України; 3) Зразки деревію голого *Achillea glaberrima* Klokov та тонколистого *A. leptophylla* Vieb., зібрані у заповіднику «Кам'яні могили»; 4) 4-и сорти картоплі (*Solanum tuberosum* L.) та 12-ть сортів томатів (*S. lycopersicum* L.); 5) Різні види льону - *Linum usitatissimum* L., *L. angustifolium* Huds., *L. bienne* Mill., *L. perenne* L., *L. humile* Mill. (2-а сорти) та *L. angustifolium* Huds. Зокрема 26 сортів *L. usitatissimum* зарубіжної та вітчизняної селекції довгунцевого та олійного типів, більшість з яких була люб'язно надані Інститутом луб'яних культур (м. Глухів, Україна), а також 12 білоруських сортів та 30 білоруських ландрас льону-довгунця, люб'язно надані Інститутом генетики і цитології НАН Білорусі.

Для виділення ДНК та подальшої оцінки поліморфізму інтронів генів тубуліну у деревних рослин використовували вегетативний матеріал, а саме термінальні бруньки із фрагментами пагонів та листові пластинки. В цілому проаналізовано 27 видів деревних рослин: *Quercus robur* L., *Populus tremula* L., *Fagus sylvatica* f. *salicifolia*, *Robinia pseudoacacia* L., *Morus alba* L., *Ulmus glabra* Huds., *Betula pendula* Roth, *Acer platanoides* L., *Acer negundo* L., *Acer saccharinum* Marshall, *Fagus sylvatica* L., *Catalpa bignonioides* Walter, *Tilia cordata* Mill., *Tilia platyphyllos* Scop., *Aesculus hippocastanum* L., *Populus nigra* L., *Juglans regia* L., *Fraxinus excelsior* L., *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Ginkgo biloba* L., *Picea abies* L. Karst., *Pinus mugo* Turra, *Pinus sylvestris* L., *Abies alba* Mill., *Picea pungens* Engelm., *Ulmus pumila* L., *Ulmus suberosa* Moench; 6) *U. pumila* – в'яз приземкуватий та *U. suberosa* Moench. – в'яз корковий. Для популяційно-генетичних досліджень матеріал *U. pumila* відібрано на трьох ділянках Дніпропетровської області та однієї ділянки *U. suberosa*. Всього було відібрано матеріал з 60 дерев (деревостани П1-П3) *U. pumila* по 20 дерев на кожній ділянці та 20 дерев (деревостан П4) *U. suberosa*.

Для оцінки ефективності застосування молекулярно-генетичних маркерів, що базуються на дослідженні поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у нижчих рослин, було використано вісім видів (10 штамів) мікроводоростей з

колекції IBASU-A Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного, що належать до п'яти родів трьох таксономічних відділів водоростей - зелених (Chlorophyta), жовто-зелених (Ochrophyta) та еугленофітових (Euglenophyta): *Acutodesmus acuminatus* (Lagerh.) P. Tsarenko, штам IBASU-A 245, *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P. Tsarenko, штам IBASU-A 251, *Acutodesmus dimorphus*, штам IBASU-A 344, *Desmodesmus armatus* (Chodat) E. Hegew., штам IBASU-A 338, *Desmodesmus armatus*, штам IBASU-A 263, *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E. Hegew. et A. Schmidt, штам IBASU-A 408, *Dunaliella salina* (Dunal) Teodor., штам IBASU-A 4, *Dunaliella minuta* W. Lerche, штам IBASU-A 40 (Chlorophyta), *Tribonema ulotrichoides* Pascher, штам IBASU-A 520 (Ochrophyta) та *Euglena* sp., штам IBASU-A 498 (Euglenophyta). Усі зразки водоростей були люб'язно надані чл.-кор. НАН України П.М. Царенком.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Біоінформаційний пошук та аналіз генів, що кодують цитоскелет клітини, в геномах досліджуваних рослин. Повні анотовані послідовності генів α -, β -, γ -тубулінів та актину *A. thaliana* було взято з бази даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Біоінформаційний пошук потенційних генів актину рису, льону, картоплі та томату здійснювали в базі даних Phytozome v 9.1 (www.phytozome.net) (Goodstein et al., 2012) з використанням он-лайн інструменту BLASTN версії 2.2.26+. Матрицею для пошуку таких генів слугували повні анотовані послідовності генів *A. thaliana*.

Для множинного вирівнювання екзонів генів досліджуваних білків використовували програму Clustal X 2.0 (Larkin et al., 2007) було. Візуалізацію екзон-інтронної структури генів проводили за допомогою Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). Підбір вироджених та специфічних праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів здійснювали за допомогою онлайн-інструменту Oligo Analyzer V. 3.1. 1. (www.idtdna.com/calc/Analyzer/) та програм PrimerBlast (Ye et al., 2012), FastPCR (Kalendar et al., 2017).

Тотальну ДНК з рослинних зразків виділяли за допомогою ЦТАБ-методу (Doyle and Doyle, 1987; Rogers and Bendich, 1985). Концентрацію та чистоту отриманого генетичного матеріалу перевіряли спектрофотометрично за допомогою біофотометру «Eppendorf» (США), а також з використанням електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі. Отримані зразки ДНК зберігали при -20°C .

ТВР-аналіз у різних модифікаціях (сТВР/hТВР) проводили згідно методик (Bardini et al., 2004; Breviario et al., 2007; Braglia et al., 2010; Galasso et al., 2011). Реакційна суміш для ПЛР містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl_2 , 50 нг ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мМ кожного дНТФ, 0,5 од. Taq полімерази («Fermentas», Литва). Послідовності вироджених праймерів були запропоновані раніше (Bardini et al., 2004; Breviario et al., 2007; Braglia et al., 2010; Galasso et al., 2011). Для SSR-аналізу льону використовували праймери до чотирьох локусів (Lu 1, Lu 21, Lu 25) з високим значенням індексу поліморфізму (Pali et al., 2014). Для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів α - та γ -тубуліну, актину у різних видів вищих рослин було розроблено та синтезовано універсальні виродженні праймери (Табл. 1).

Для аналізу поліморфізму інтронів генів цитоскелетних білків використовували наступний протокол ампліфікації: початкова денатурація (95 °C) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 95 °C – 45 с, відпал праймерів (температура залежить від природи праймеру) – 45с, елонгація 72 °C – 1 хв), кінцеве подовження 72 °C – 7 хв, 10 °C – утримання. Для SSR-аналізу ампліфікацію проводили за наступного протоколу: початкова денатурація (95 °C) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 95 °C – 1 хв, відпал праймерів 58 °C – 1хв, подовження 72 °C – 1 хв), фінальна елонгація 72 °C – 7 хв, 10 °C – утримання (Pali et al., 2014). Кожну ПЛР здійснювали щонайменше в триразовій повторності.

Поліморфізм ядерних мікросателітних локусів (*quru-GA-1C08*, *quru -GA-0C19*, *MSQ13*, *QPZAG9*) у *Q. robur* досліджували за допомогою праймерів, наведених в роботах (Dow et al. , 1995; Steinkellner et al., 1997; Aldrich et al., 2003). ПЛР-аналіз SSR локусів у *U. pumila* та *U. suberosa* проведено із застосуванням локусів UR101, UR138, UR153, UR158, UR173b (Zalapa et al, 2008).

Продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі (Sambrook and David, 2001). Фрагменти ДНК візуалізували шляхом їх фарбування нітратом срібла (Benbouza et al., 2006). Довжину фрагментів визначали за допомогою наборів маркерів молекулярної маси з кроком 50 п. н. (O'GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder) і 100 п. н. (O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder) виробництва «Thermo Scientific» (США). Пофарбовані гелі фотографували з використанням цифрової фотокамери Olympus XZ-1. Для аналізу зображень використовували програму GelAnalyzer (www.gelanalyzer.com/). Смуги реєстрували, використовуючи бінарну систему: наявним фрагментам присвоювали значення одиниці, а відсутнім – нуля. Стандартну генетичну дистанцію Нея (Nei, 1972) та коефіцієнт подібності Нея та Лі (Nei and Li, 1979) між генотипами визначали за наявністю/відсутністю ампліфікованих фрагментів у проаналізованих зразках за допомогою програми FreeTree (Pavlicek et al., 1999). Значення подібності були використані для кластерного аналізу, який проводили за допомогою методу UPGMA з використанням тієї ж програми. Для оцінки достовірності побудованих дерев проводили бутстреп (bootstrap) аналіз (Hillis and Bull, 1993) для 1000 повторностей. Отримані дендрограми візуалізували за допомогою програми FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2007).

Для оцінки поліморфізму мікросателітних локусів використовували індекс поліморфного інформаційного змісту – PIC (Polymorphism Information Content), який розраховували за формулою:

$$PIC = \frac{\sum_{i=1}^n (1 - f_{ai}^2 - f_{bi}^2)}{n}, \quad (1)$$

де n - загальна кількість отриманих поліморфних маркерів, f_a - частота фрагментів, в яких відсутній i -й фрагмент, а f_b - частота фрагментів, в яких присутній i -й фрагмент (Breviario et al. 2007; Hongtrakul 1997). Під час обрахунку даних, отриманих в результаті оцінки поліморфізму довжини інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину, при розрахунку PIC використовували показник частоти алельних фенотипів (унікальний розподіл та кількість фрагментів в ДНК-профілі).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \quad (2)$$

де p_i – частота i -го алельного фенотипу у вибірці, n – загальна кількість різних алельних фенотипів у вибірці (Kondratyuk et al., 2005).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

БІОІНФОРМАЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ЕКЗОН-ІНТРОННОЇ СТРУКТУРИ ГЕНІВ, ЩО КОДУЮТЬ БІЛКИ ЦИТОСКЕЛЕТУ, ТА РОЗРОБЛЕННЯ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ЇХ ІНТРОНІВ

Для пошуку гомологічних послідовностей генів білків цитоскелету (α -, β -, γ -тубулінів та актину) було відібрано декілька видів вищих рослин, геноми яких повністю сіквензовані, але до кінця не анотовані. Об'єктами досліджень насамперед були геном арабідопсису (*A.thaliana*), оскільки він є розшифрованим та найбільш вивченим, а також геноми рису посівного (*O. sativa*), льону-довгунця (*L. usitatissimum*), картоплі (*S. tuberosum*) та томату (*S. lycopersicum*). За результатами проведеного аналізу екзон-інтронної структури анотованих послідовностей генів актину, α -, β - та γ -тубуліну *A. thaliana* та відібраних гомологів цих генів в геномах інших видів вищих рослин (база даних Phytozome) було встановлено, що послідовності мають схожу екзон-інтронну структуру. Кількість інтронів для генів актину складає переважно 3-4, для генів β -тубуліну - переважно 2 інтрони, α -тубуліну – 3-4, а для γ -тубуліну – 9-10. Окрім того, дані, представлені в геномних базах даних, свідчать про те, що інтрони мають різну кількість нуклеотидів і варіюють в доволі широких межах. Отже, це дозволяє стверджувати, що в геномах рослин саме за рахунок складу та довжини інтронів підвищується варіабельність нуклеотидних послідовностей генів як в межах одного виду, так і між видами.

Для пошуку консенсусних послідовностей гомологів генів β -тубуліну у досліджуваних рослин було використано сіквенси з бази даних GeneBank та Phytozome. В подальшому здійснено вирівнювання і пошук консенсусних послідовностей за допомогою програм CLUSTAL X 2.0 та UGENE. За результатами аналізу послідовностей, були виявлені найбільш консервативні ділянки 1-го, 2-го та 3-го екзонів генів β -тубуліну, які були зручними для дизайну 2 пар універсальних вироджених праймерів з метою оцінки поліморфізму довжини 1-го та 2-го інтронів генів β -тубуліну у різних видів рослин (Табл. 1). Також з метою більш однозначно дати відповідь щодо поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну саме у *D. antarctica*, на підставі аналізу частини кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (HM208297), були розроблені та синтезовані специфічні праймери для дослідження поліморфізму довжини другого інтрона β -тубуліну у цього виду: сTBPdesch F: 5'-GAGAATGCTGATGAGTGCATG-3' та сTBPdesch R: 5'-CAAAGCCAACCATGAAGAAATG-3'.

З метою встановлення консенсусної послідовності для гомологів генів α -тубуліну у *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* було проведено множинне вирівнювання всіх наявних послідовностей генів α -тубуліну для вищезгаданих видів рослин. В результаті виявлено найбільш консервативні

ділянки екзонів, які в подальшому були використані для дизайну універсальних вироджених праймерів для оцінки поліморфізму довжин I-го інтрону генів α -тубуліну (Табл. 1).

Для пошуку консенсусних послідовностей генів γ -тубуліну з метою подальшого підбору праймерів, що дозволять оцінити поліморфізм довжини інтронів у різних видів рослин, було використано 7 послідовностей, що кодують γ -тубулін таких видів рослин: *Z. mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *A. thaliana* (AT3G61650), *L. usitatissimum* (Lus10010986.g, Lus10007851.g), для яких екзон-інтронна структура генів є доступною в базі даних Phytozome. В результаті множинного вирівнювання було встановлено ділянки послідовностей, підбравши до яких праймери, під час ампліфікації з якими можна оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону γ -тубуліну *A. thaliana*; II-го інтрону, III-го екзону та III-го інтрону – для *Z. mays*; а також I-го інтрону, II-го екзону та II-го інтрону – для *L. usitatissimum*.

Таблиця 1

Універсальні праймери для дослідження поліморфізму інтронів різних генів, що кодують білки цитоскелету клітини

Назва праймеру	Послідовність прямого та зворотнього праймерів (5'-->3')	Інтрон, (примітка)
α-тубулін		
TUA_1in	F: TGG GAR CTN TAY TGY CTY GA R: TCR CTR AAR AAN GTR TTR AAN GMA TC	I, (власний дизайн)
β-тубулін		
All_tub_1in	F: TGG GCB AAR GGN CAY TAY GAR GG R: CCC ATN CCV GAN CCH GTN CC	I, (власний дизайн)
All_tub_2in	F: ATG GTK CTN AAY GAR GCN CT R: CAC ATT CAT BGM RTC CCA CAT	II, (власний дизайн)
Актин		
Act_in	F:TGG CAT CAY ACN TTY TAC AAY GA R:CCM CCA CTT DAG VAC RAT GTT	II, окрім PGSC0003DMG 400000439 (<i>S. tuberosum</i>), (власний дизайн)
γ-тубулін		
TUG-in	F: GAY GTV TTY TTT TAC CAR GCK GA R: GAG TTG TAR GGY TGG ACR AC	II (<i>A. thaliana</i>) II+III (<i>Z. mays</i>) I+II (<i>L. usitatissimum</i>), (власний дизайн)

Для розроблення універсальної пари вироджених праймерів з метою оцінки поліморфізму інтронів генів актину у різних видів рослин було проведене множинне вирівнювання всіх відібраних послідовностей генів актину у геномах *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* за допомогою

програми CLUSTAL X 2.0. Виявлені найбільш консервативні ділянки II-го та III-го екзонів в подальшому були використані для дизайну універсальних праймерів. Було запропоновано праймери для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в межах кожного модельного виду, а також розроблені та синтезовані універсальні ABP праймери для оцінки поліморфізму II-го інтрону генів актину.

В цілому, за результатами проведеного біоінформатичного аналізу було здійснено дизайн та синтезовано 29 пар праймерів для дослідження поліморфізму інтронів α -, β - та γ -тубуліну, а також актину, з них 5 були універсальними, тобто такими, що можуть бути застосовані у молекулярно-генетичних дослідженнях різних видів рослин (Табл. 1).

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ ТА АКТИНУ

Генотипування однодольних рослин за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Генетична диференціація видів роду *Eleusine L.* з використанням поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Було продемонстровано диференціюючу здатність TBP-методу на сортах української селекції роду *Eleusine*. Проаналізовано 2 сорти ('Тропіканка' та 'Євгенія'), два соматоклональні варіанти (SE-1, SE-4), а також 2 генотипи (CAL 4A-21, CAL 4A-1) *E. coracana* та 1 дику (природну) популяцію *E. indica*. Результати електрофоретичного аналізу (Рис. 2) свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються фрагменти довжиною від 370 до 4440 п.н. Відмінність між двома видами полягає в тому, що у *E. coracana* спостерігаються смуги 855 п.н., 1190 п.н., 1440 п.н, а у *E. indica* – 830 п.н., 980 п.н., 1410 п.н. Крім того, смуга 450 п.н. є у всіх зразків *E. indica*, а у *E. coracana* тільки у сортів 'Євгенія', 'Тропіканка' і соматоклонального варіанту SE-1. Найбільші відмінності від інших рослин має зразок *E. indica* (природна популяція) – у нього відсутній цілий ряд ампліконів, характерних для виду *E. indica*: 610 п.н., 830 п.н., 980 п.н., 1575 п.н., 2130 п.н., 2370 п.н., 3640 п.н.; та є унікальні фрагменти – 370 п.н., 560 п.н., 735 п.н. Виявлено, що частина ампліконів з інтронами β -тубуліну є однаковою для всіх зразків, імовірно через те, що вони виявилися специфічними для роду *Eleusine*. Відмінності були легко помітні як між різними видами, так і між сортами в межах одного виду. Встановлено, що для диференціації видів роду *Eleusine* достатньо використовувати лише I-й інтрон гена β -тубуліну.

Використання поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для генотипування *Ae. biuncialis Vis.* В результаті проведеного TBP-, сTBP- та hTBP-аналізів було чітко диференційовано всі кримські популяції *Ae. biuncialis*. Під час стандартного TBP-аналізу виявлено 27 смуг, 6 з яких були мономорфними для всіх 15 зразків *Ae. biuncialis* (396 п.н., 408 п.н., 427 п.н., 860 п.н., 1766 п.н., 1885 п.н.). За допомогою hTBP-методу встановлено 24 відтворювані чіткі смуги в діапазоні від 466 п.н. до 3400 п.н., 21 з яких – поліморфні. За сTBP- та hTBP-профілями для кожного дослідженого зразку отримано свій специфічний набір смуг. Це означає, що за набором поліморфних фрагментів ДНК кожен зразок виявився унікальним і

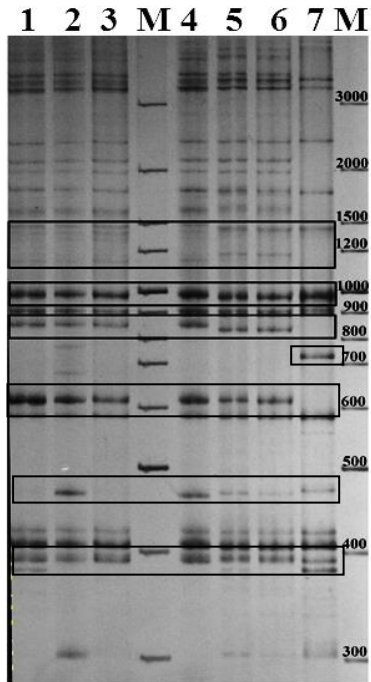


Рис. 2. Електрофореграма з ампліконами інтронів гена β -тубуліну *Eleusine*. Прямокутниками позначені поліморфні зони; 1–7 (у верхній частині малюнка) – номери зразків. 1–4: *E. sorasana* (‘Тропіканка’, ‘Євгенія’, соматоклональні варіанти SE-4 та SE-1), 5–7: *E. indica* (CAL 4A-21, CAL 4A-1, природна (дика) популяція); М – ДНК-маркер.

відрізнявся хоча б однією смугою від інших зразків. Загалом всі зразки *Ae. biuncialis* за сТВР- та hТВР-профілями вдалося диференціювати на три великі групи (Рис. 3).

Першу з них утворюють три зразки NK_4N2, NK_V-1 та NK_6-2. Другу групу формують зразки NK_02, NK_1-I та NK_MMB-1. В третю групу увійшли всі інші зразки, проте вони добре диференціювалися один від одного. В цілому характер кластеризації досліджених зразків *Ae. biuncialis* з використанням різних типів ТВР-маркерів дещо відрізняється, хоча групи зразків, що мають найбільшу бутстреп-підтримку, зберігаються.

Оцінка генетичної різноманітності природних популяцій *Aegilops biuncialis* за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів актину. Аналіз популяцій *Ae. biuncialis* показав стабільне утворення фрагментів з інтронами генів актину, які розподілялися в межах від 600 до 2000 п. н., утворюючи специфічні ДНК-профілі. Найбільша кількість ампліконів з інтронами представлена в діапазоні від 600 п. н. до 1000 п. н. Було встановлено, що кожен з проаналізованих зразків *Ae. biuncialis* має унікальний алельний фенотип. Загалом виявлено 14 алельних фенотипів, що характеризує дану популяційну вибірку *Ae. biuncialis* як високогетерогенну та генетично неоднорідну. В той же час кластеризація зразків за поліморфізмом інтронів генів актину не показала однозначної диференціації на групи (Рис. 4). Більше того, характер кластеризації відрізняється від того, що було отримано під час ТВР-аналізу. Чітка диференціація за інтронами актину простежується для зразків NK_14-12, NK_0Z-2, NK_1-1 (високий рівень бутстреп – підтримки).

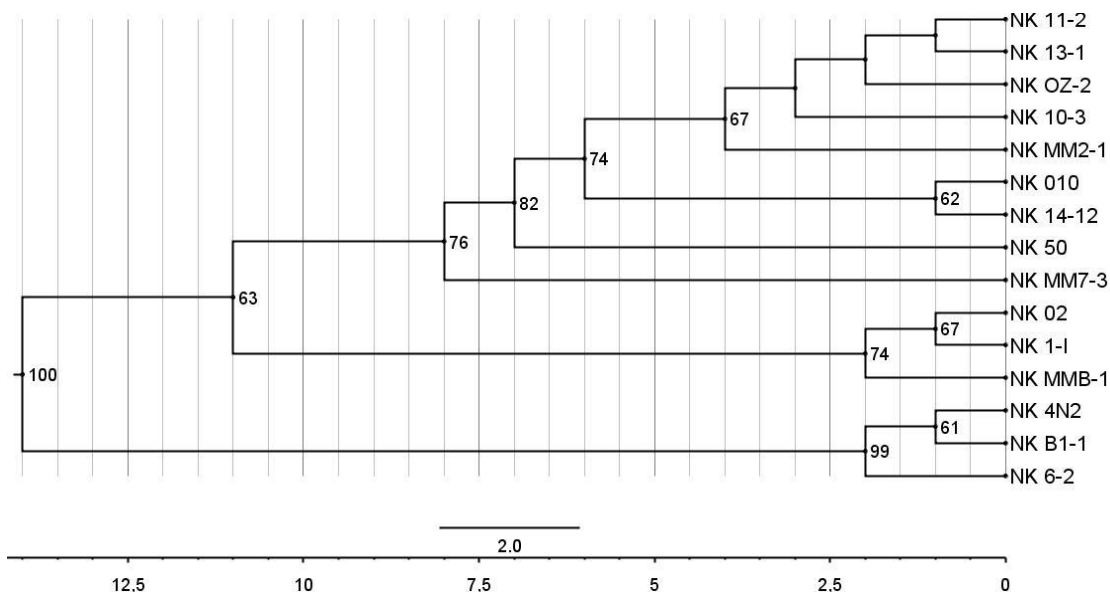


Рис. 3. Дендрограма UPGMA за результатами аналізу сТВР-фрагментів зразків *Ae. biuncialis*. Цифри в основі вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Також з високим рівнем бутстреп-підтримки диференціюються зразки NK_02 та NK_B1-1, хоча певних закономірностей в характері їх кластеризації встановити не вдалося. В цілому за допомогою АВР-методу вдалось ідентифікувати велику кількість поліморфних зон, що дозволило оцінити ДНК-профілі кожної з популяцій *A. biuncialis*. Отже ДНК-маркери, що оцінюють поліморфізм довжини інтронів генів актину, виявилися придатними для генотипування природних популяцій *A. biuncialis* і можуть бути використані у подальшому молекулярно-генетичному аналізі й інших злакових культур. В той же час оцінка поліморфізму інтронів генів актину виявилась менш ефективним інструментом у порівнянні з ТВР-аналізом егілопсів, тому може розглядатись як додатковий метод аналізу.

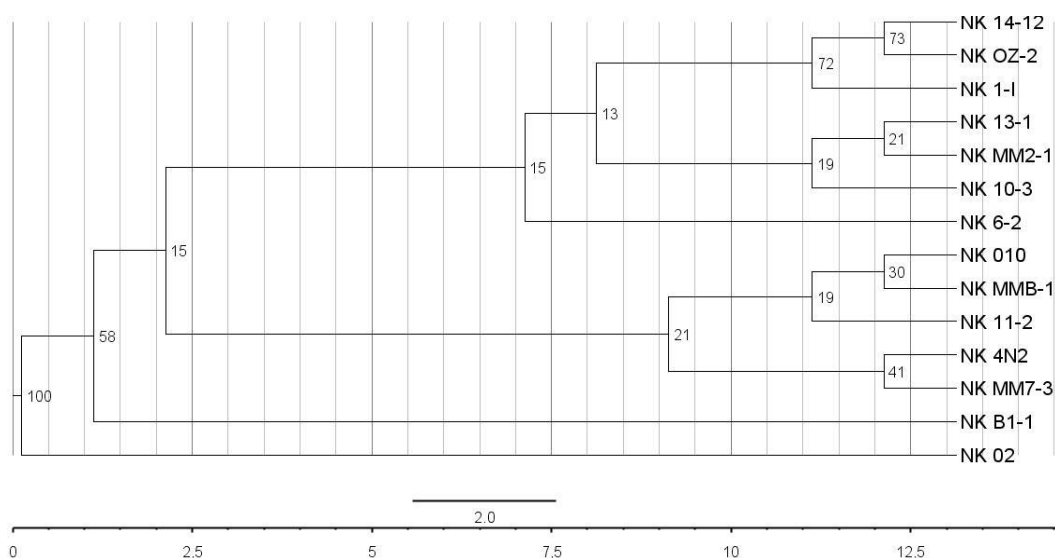


Рис. 4. Дендрограма UPGMA за результатами аналізу поліморфізму інтронів генів актину зразків *Ae. biuncialis*. Цифри в основі вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Генетичне профілювання островних популяцій *Deschampsia antarctica* E. Desv. за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. *Deschampsia antarctica* E. Desv. є одним з двох видів судинних рослин Антарктики. Ця рослина зростає в екстремальних умовах довкілля і змушена адаптуватися як до локальної мозаїки мікрокліматів, так і до глобальних екологічних змін. Зростання за таких умов здатне зумовити появу змін у геномі, які можуть проявлятися на молекулярно-генетичному рівні.

Оцінка поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну 37 разків з усіх восьми досліджуваних популяцій виявила 12 чітких та відтворюваних фрагментів, що варіювали в межах 295–1300 п.н. Фрагмент розміром 295 п.н. був наявний практично у всіх відібраних зразках, хоча в деяких з них він не завжди проявлявся, наприклад, з оазису Томас і півострова Філдес (острів Кінг Джордж), а також острова Роберта. Фрагмент 295 п.н. відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона гена β -тубуліну (Breviaro et al., 2007). Фрагмент 310 п.н. чітко візуалізувався в зразках № 6 (острів Леоні), №12 (острів Плено), №13, №17 (оазис Расмуссен), №23 (оазис Томас) і № 36 (острів Роберт). А фрагмент довжиною 300 п.н. виявлений у 3 з 5 зразків з точки Гамаж і в 1 з 4 зразків з острова Плено (Рис. 5).

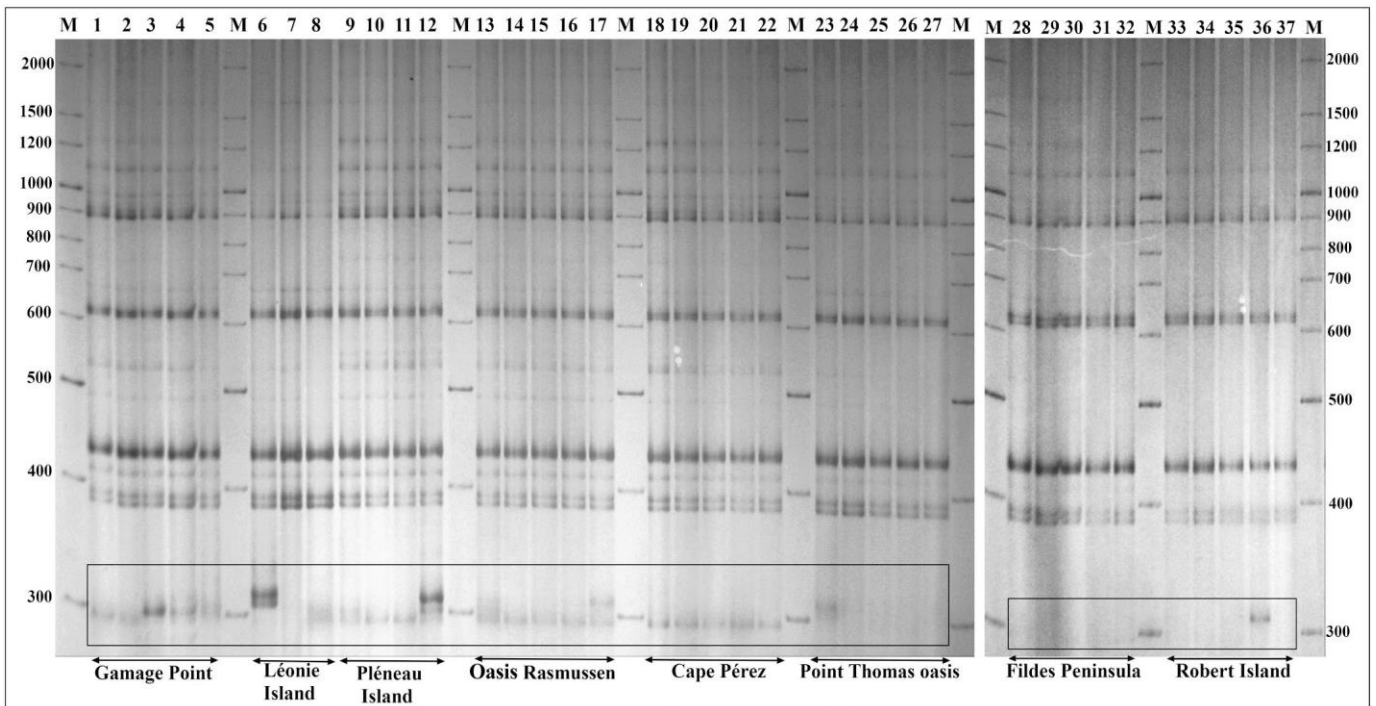


Рис. 5. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, що містять інтрони генів β -тубуліну *D. antarctica* з ізольованих популяцій. 1–37 (верхня частина рисунка) - досліджені зразки: 1–5 - Гамаж; 6–8 - острів Леоні; 9–12 - острів Плено; 13–17 - оазис Расмуссен; 18–22 - мис Перез; 23–27 - оазис Томас; 28–32 - півострів Філдес; 33–37 - острів Роберт; М – ДНК-маркер.

В результаті проведених досліджень не вдалося встановити відмінності у зразках з 8 різних місцезростань *D. antarctica* за використання hTBP, cTBP та sTBP із специфічними власно розробленими праймерами. У всіх досліджених зразків спостерігаються однакові (в межах методу) набори ампліконів. В той же час,

застосувавши лише ТВР-аналіз, було виявлено внутрішньопопуляційний поліморфізм за I-им інтроном генів β -тубуліну. В цілому отримані результати свідчать, що ТВР-аналіз може бути корисний для фінгерпринтінгу різних популяцій *D. antarctica*, водночас, вони вказують на низький рівень генетичного поліморфізму цього виду в дослідженому регіоні.

Генотипування сортів пшениці, ячменю та рису за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину. За допомогою ТВР-методу було проаналізовано 7 сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) вітчизняної селекції та 30 сортів ячменю (*Hordeum vulgare* L.). Під час ампліфікації утворюються фрагменти розміром від 94 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. (рис.6). Отримані результати свідчать про досить високу диференціюючу спроможність ТВР-методу для оцінки генетичного поліморфізму рослин та можливість використання його для фінгерпринт-аналізу сортів пшениці та ячменю.

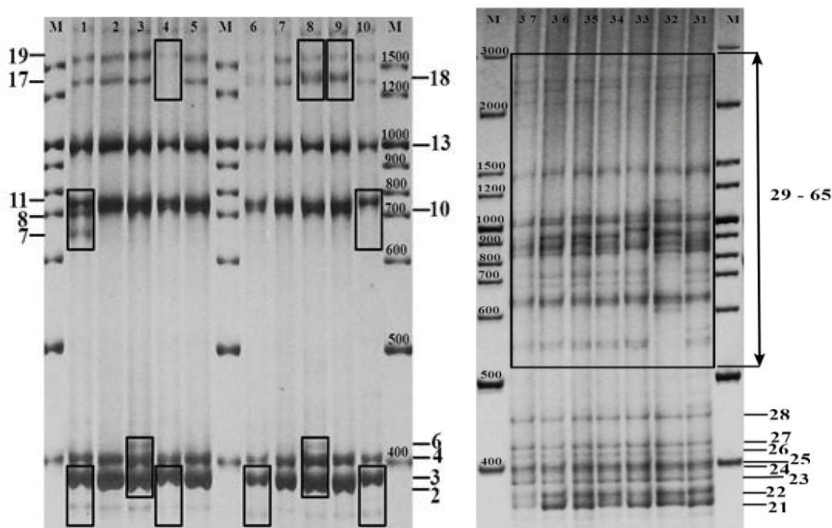


Рис. 6 Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну сортів ячменю (ліворуч) та пшениці (праворуч), отриманими за допомогою ТВР-методу (інтервал 300–3000п. н.). М – ДНК-маркер; цифри у верхній частині рисунку: 1-10 – сорти ячменю, 31-37 – сорти пшениці; 21- 65 (з боків рисунку) - номери смуг.

Генотипування сортів пшениці, ячменю та рису шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволило отримати відносно чіткі ДНК-профілі кожного з проаналізованих видів (Рис. 7). Кількість алельних фенотипів у вибірках сортів пшениці, ячменю та рису становила чотири, два та один відповідно. Загалом поліморфізм довжини інтронів генів актину був виявлений у сортах пшениці та ячменю, які були охарактеризовані як генетично гетерогенні. Одночасно, сорти рису виявилися генетично однорідними за даним видом ДНК-маркерів. Таким чином, оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину може бути використана як додатковий інструмент для генетичної диференціації сортів злакових культур.

Якщо порівнювати два підходи у генотипуванні злаків, а саме оцінку поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину, то інтрони генів β -тубуліну є більш пріоритетною системою для диференціювання злаків, оскільки сама кількість утворених поліморфних зон під час аналізу виявилася значно більшою, у порівнянні з інтронами генів актину. Це можна пояснити хоча б тим, що в

залежності від обраного підходу можна аналізувати I-ий, II-ий інтрон генів β -тубуліну, а також їх комбінацію, коли мова йде про hTBR. В той же час в арсеналі генів актину тільки один інтрон, який може забезпечити диференціацію досліджуваних генотипів. Також варто зважати на плоїдність досліджуваних організмів. Чим більше плоїдність, тим більшу кількість фрагментів можна очікувати під час проведення аналізу. В цілому поліморфізм інтронів комплексу цитоскелетних генів, зокрема генів β -тубуліну та актину, може бути використаний для генотипування та диференціації злакових культур.

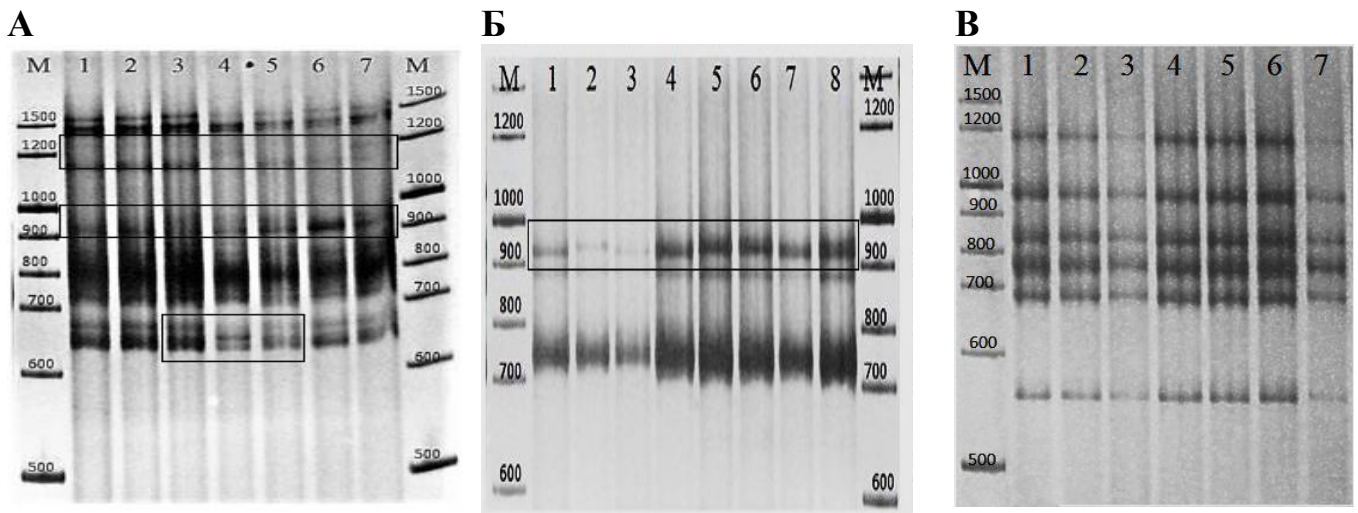


Рис. 7 Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у різних сортів: **А** - пшениці (*T. aestivum* L.) (прямокутниками позначені зони, що містять поліморфні фрагменти), 1–7 – сорти пшениці: 1 – ‘Черемшина’, 2 – ‘Елегія’, 3 – ‘Етюд’, 4 – ‘Х 12’, 5 – ‘Retown’, 6 – ‘Недра’, 7 – ‘Selkirk’; **Б** - ячменю (*H. vulgare* L.) 1–8 – досліджувані сорти: 1 – ‘Паллідум 32’, 2 – ‘Медікум 46’, 3 – ‘Одеський 9’, 4 – ‘Одеський 14’, 5 – ‘Одеський 18’, 6 – ‘Южний’, 7 – ‘Степовий’, 8 – ‘Нутанс 106’; **В** - рису посівного (*Oryza sativa*) 1 – *O. sativa japonica*; 2 – ‘YIP-4970’, 3 – ‘YIP-4558’, 4 – ‘Лазурит’, 5 – ‘Віконт’, 6 – ‘Преміум’, 7 – ‘Консул’; М – ДНК-маркер.

Поліморфізм довжини інтронів β -тубуліну та актину як ефективний інструмент генотипування рижію. Серед олійних рослин рижій посівний або *Camelina sativa* L. Cranz є однією з найбільш перспективних культур, оскільки останнім часом цей вид привернув увагу дослідників як джерело для виробництва біопалива (Frohlich et al., 2005; IATA 2010; Patie et al., 2009). Хоча генетичний поліморфізм сортів *C. sativa* на основі аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну на даний момент вже досліджувався, вітчизняні сорти та сортозразки рижію, які можуть стати важливими для створення генотипів, більш придатних для отримання біодизеля, залишаються мало дослідженими.

В результаті аналізу поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну *C. sativa* встановлено, що смуги знаходились в діапазоні 295–3200 п.н (Рис. 8). При цьому лише 7 смуг виявилися поліморфними і спостерігались у частини зразків. Тобто всі зразки не могли бути диференційовані за допомогою цього виду маркеру. Результати аналізу поліморфізму довжини I-го інтрону гена актину показали, що смуги утворюються в діапазоні 370-1000 п.н., до того ж 8 смуг виявилися

поліморфними. Таким чином стало можливим диференціювати частину зразків (ФЕОРЖЯФ-3, Євро-12, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-Д), яка не відрізнялася за аналізом I-го інтрону генів β -тубуліну. Також для більш точного профілювання зразків був задіяний аналіз довжини II-го інтрона генів β -тубуліну (сТВР-метод). Виявлено смуги в межах 350–1990 п.н. Шість смуг були поліморфними. В цьому випадку більшість генотипів *C. sativa* були чітко диференційовані між собою, маючи свій власний унікальний ДНК-профіль. Таким чином було встановлено, що аналіз поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, а також актину можуть бути ефективними для генетичного профілювання *C. sativa*.

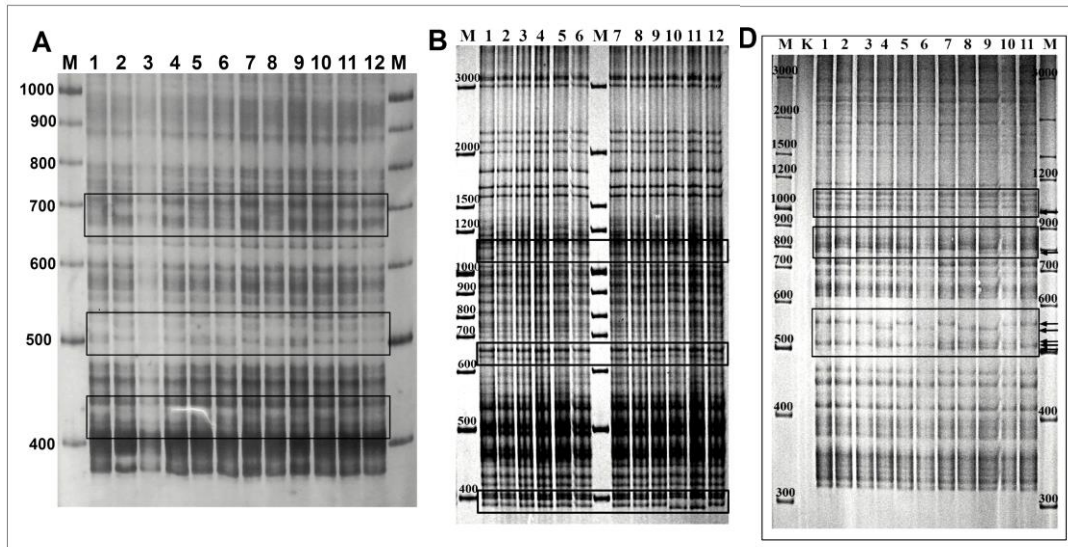


Рис. 8. Електрофореграми з ампліконами, що містять інтрони β -тубуліну та актину у *C. sativa*. **А** – поліморфізм довжини I-го інтрону генів актину; **В** – поліморфізм довжини I-го інтрону генів β -тубуліну; **Д** - поліморфізм довжини II-го інтрону генів β -тубуліну (1-11: ‘Перемога’, ФЕОРЖЯФ-ЧП, ФЕОРЖЯФ -Д, ФЕОРЖЯФ-1, ‘Клондайк’, ФЕОРЖЯФ -2, ‘Євро-12’, ‘Міраж’, ФЕОРЖЯФ -3, ФЕОРЖЯФ -5, ФЕОРЖЯФ -4). М – ДНК-маркер.

Генетичне профілювання *Achillea glaberrima* Клок. та *A. leptophilla* Vieb. за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну. Вдалим виявилось застосування ТВР-аналізу для дослідження генетичного різноманіття таких перехреснозапильних покритонасінних рослин, як представників роду *Achillea* L.: *A. glaberrima* Клок. – деревій голий та *A. leptophilla* Vieb. – деревій тонколистий. На електрофореграмі (Рис.9) спостерігається доволі значна кількість ампліконів задовільної якості (120 п.н., 160 п.н., 210 п.н., 230 п.н., 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н.), які можна використовувати для аналізу. До речі, у обох видів вдалося виявити внутрішньовидовий поліморфізм за деякими з них, а саме, 230 п.н. – у *A. leptophilla*, 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н. - у *A. glaberrima* та *A. leptophilla*. В цілому можна з впевненістю зазначити, що ТВР-метод може бути успішно застосований для молекулярно-генетичних досліджень представників багатьох родів трав’янистих рослин, в тому числі для маркування генотипів і розроблення довгострокових програм із збереження та відновлення популяцій ендемічних рослин.

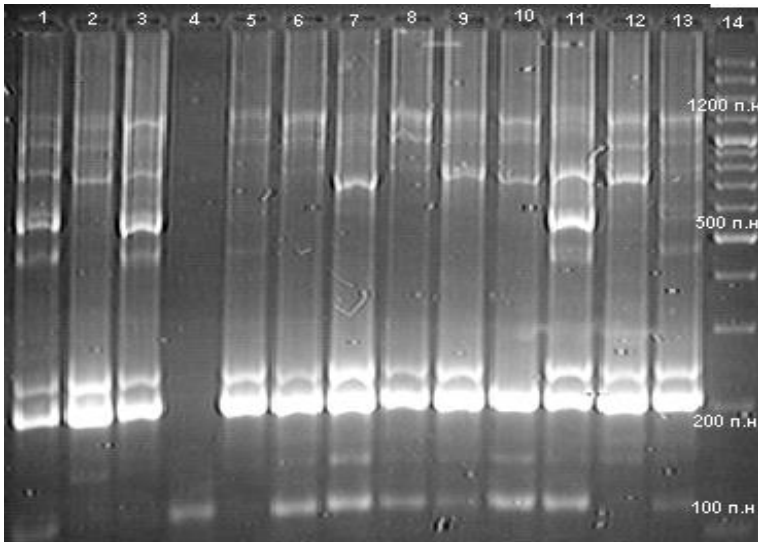


Рис. 9. Зразки 1-3 – *Achillea glaberrima* Клок.; 4 – зразок без додавання ДНК (контроль); зразки 5-13 – *Achillea leptophylla* Vieb.; 14 – ДНК маркер.

Генотипування різних видів льону шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину. Генетичне профілювання різних видів роду *Linum* L. за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну. Диференціюючу здатність ТВР-аналізу перевіряли на п'яти видах льону, а саме: *L. usitatissimum*, *L. angustifolium*, *L. bienne*, *L. humile* та *L. perenne*. Слід зазначити, що ряд авторів вважають деякі з наведених вище видів підвидами *L. usitatissimum* або розглядають *L. angustifolium* та *L. bienne* як один вид. Результати аналізу різних зразків льону за допомогою ТВР (Рис. 10) свідчать про те, що основна зона розподілу фрагментів ДНК знаходиться в діапазоні від 400 до 1900 п.н. Всього було зафіксовано 46 ампліфікованих фрагментів різного розміру, 17 з них є унікальними, що зустрічаються виключно у виду *L. perenne*.

Дані генетичного аналізу зразків було використано для відображення диференціації досліджених видів на основі кластерного аналізу методом UPGMA (Рис. 11). З отриманої дендрограми видно, що всі досліджені зразки льону чітко відрізняються за їх ТВР-профілем. *L. angustifolium* та *L. perenne* виділяються в окремі гілки зі 100% бутстреп-підтримкою. До них приєднується *L. humile* cv. Орфей з бутстреп-підтримкою 52%, далі *L. humile* cv. Еврика (57% бутстреп-підтримка), а *L. usitatissimum* та *L. bienne* утворюють одну групу з 75% бутстреп-підтримкою. В цілому, результати дослідження із застосуванням ТВР-аналізу, дають можливість диференціювати та ідентифікувати вивчені види роду *Linum* L.

За результатами сТВР-аналізу в цілому виявлено 28 фрагментів, 9 з яких (330 п.н., 345 п.н., 350 п.н., 605 п.н., 675 п.н., 755 п.н., 895 п.н., 955 п.н.) властиві лише *L. perenne*. Один фрагмент (320 п.н.) був виявлений у всіх досліджених видів. В цілому сТВР-аналіз підтвердив отримані раніше результати ТВР - аналізу. Побудовані дендрограми вказують на схожу картину кластеризації досліджених видів, що дає підстави зробити висновок про те, що *L. angustifolium* та *L. bienne* є різними видами, до того ж, можливо, *L. bienne* є підвидом *L. usitatissimum*. В цілому результати ТВР/сТВР-методів дають можливість ідентифікувати та диференціювати вивчені види роду *Linum*, що характеризуються унікальними патернами ампліконів на

електрофореграмах. Тому ці підходи можуть бути застосовані в молекулярно-генетичному та філогенетичному аналізі видів роду *Linum* L.

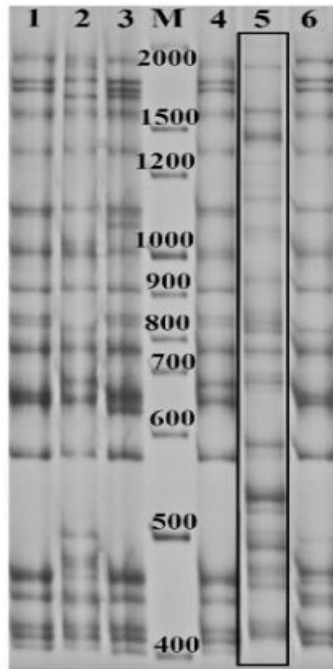


Рис. 10. Електрофореграма з ампліконами, що містять I-й інтрон генів β -тубуліну представників роду *Linum*; 1–6 (зверху) – номери зразків: 1 - *L. bienne*, 2 - *L. angustifolium*, 3 - *L. usitatissimum*, 4 - *L. humile* cv. Эврика, 5 - *L. perenne*, 6 - *L. humile* cv. Орфей; М – ДНК-маркер.

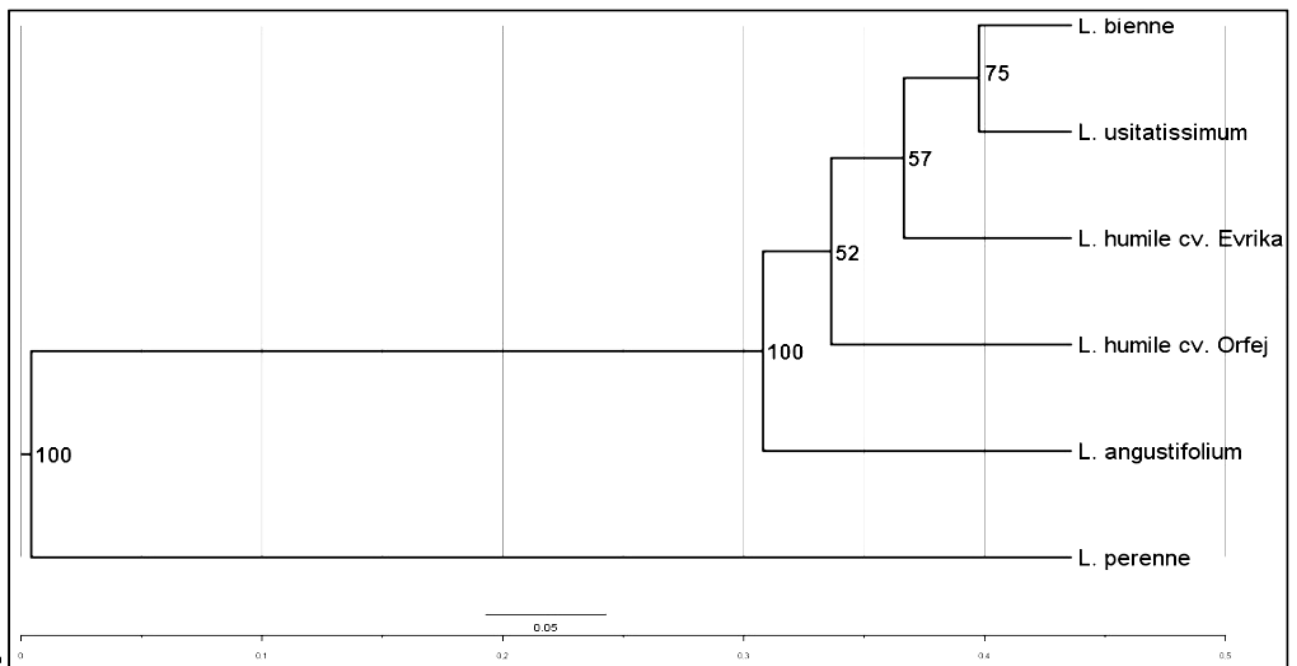


Рис. 11. UPGMA-дендрограма, побудована на підставі аналізу ТВР-профілів різних представників роду *Linum* L.

Порівняльний аналіз використання поліморфізму інтронів генів β -тубуліну, актину та мікросателітних локусів для генетичного профілювання сортів льону української селекції. Узагальнені дані щодо оцінки внутрішньосортowego та міжсортowego поліморфізму льону-довгунцю із застосуванням ТВР-, АВР- та SSR-аналізу наведено в Табл. 2. Згідно цих даних

тільки два сорти ('Сіверський' та 'Глазур') селекції ДСЛК (Ін-т луб'яних культур НААН України) виявилися гомогенними. Всі інші сорти мали поліморфізм хоча б за одним видом маркерів. У сорту 'Есмань' поліморфізм був встановлений тільки за одним з SSR-маркерів – Lu-1. Сорт 'Глухівський ювілейний' виявився поліморфним за мікросателітними маркерами та інтронами генів актину, в той же час ТВР-аналіз не виявив гетерогенності цього сорту. Сорт 'Глобус' мав поліморфізм за інтронами генів актину, хоча за мікросателітними локусами та інтронами генів β -тубуліну виявити поліморфізм не вдалося. В той же час у сорту 'Чарівний' було встановлено гетерогенність за допомогою мікросателітних локусів та поліморфізм інтронів генів β -тубуліну, а за інтронами генів актину гетерогенності не спостерігалось. У більшості випадків (10 сортів з 16) результати аналізу за всіма видами маркерів давали однакові результати. Тобто як за мікросателітними маркерами, так і за ТВР-, АВР-маркерами було встановлено гетерогенність сортів. В цілому, в результаті проведених досліджень з використанням ТВР-, АВР- та SSR-методів встановлено, що більшість з досліджених сортів є генетично гетерогенними. Показано, що ТВР-, АВР- методи є швидкими та надійними молекулярно-генетичними інструментами, які можуть бути використані як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами, зокрема SSR-маркерами, для молекулярно-генетичного аналізу льону.

Генотипування білоруських ландрас льону за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину. Було досліджено внутрішньосортний поліморфізм 30 ландрас *L. usitatissimum* за ТВР- та АВР-маркерами. Більшість візуалізованих ДНК-фрагментів за умов ТВР-аналізу знаходилась в діапазоні 400-1900 п. н., що є характерним для роду *Linum*. Гомогенними за наявністю фрагментів виявилися лише 5 з 30 проаналізованих ландрас. Виявлено, що ландраси льону суттєво розрізняються за поліморфізмом довжини інтронів генів β -тубуліну. Так, загальна кількість фенотипів у ландрас складає 7, а значення PIC в цілому становить 0,78, варіюючи в межах кожного сорту від 0,32 до 0,72. У порівнянні з сучасними сортами української селекції білоруські ландраси є більш гетерогенними за довжиною інтронів генів β -тубуліну, що пояснюється тим, що ландраси – це стародавні сорти, які формувались в різних еколого-географічних умовах.

В результаті аналізу поліморфізму інтронів генів актину (АВР-метод) за допомогою власнорозроблених універсальних праймерів (ActIn) продемонстровано утворення видоспецифічних ДНК-профілів, що містили амплікони інтронів генів актину. ДНК-профіль кожного зразка льону-довгунця білоруської селекції був представлений як мінімум 10 фрагментами, довжини яких варіювали в межах від 700 п. н. до 1200 п. н. Загалом проаналізовані генотипи льону-довгунця містили поліморфні смуги в діапазоні довжин від 800 п. н. до 900 п. н., що дало можливість диференціювати їх між собою. Встановлено, що для сортів льону-довгунця білоруської селекції за умов аналізу за допомогою АВР-методу характерна поява трьох різних алейних фенотипів, а PIC дорівнює 0,57. В цілому, в результаті проведених досліджень встановлено високий внутрішньосортний поліморфізм стародавніх сортів льону білоруської селекції, виявлено високу їх генетичну варіабельність. Отримані дані можуть бути використані разом з іншими результатами молекулярно-генетичного аналізу для дослідження філогенезу сортів та у селекційно-генетичних програмах з покращення генофонду льону.

Таблиця 2

Ефективність застосування генетичних маркерів, заснованих на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину, в порівнянні з SSR-маркерами на прикладі аналізу гетерогенності сортів льону-довгунця

Назва сорту	Поліморфізм довжини інтронів генів актину		Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (TBP)		SSR (LU1 / LU7 / LU21 / LU25)	
	Поліморфізм (+/-)	PIC	Поліморфізм (+/-)	PIC	Поліморфізм (+/-)	PIC
‘Есмань’	–	0,00	–	0,00	+ / – / – / –	0,44 / 0,00 / 0,00 / 0,00
‘Сіверський’	–	0,00	–	0,00	– / – / – / –	0,00 / 0,00 / 0,00 / 0,00
‘Глухівський ювілейний’	+	0,48	–	0,00	+ / + / + / +	0,61 / 0,56 / 0,48 / 0,65
‘Глобус’	+	0,48	–	0,00	– / – / – / –	0,00 / 0,00 / 0,00 / 0,00
‘Глазур’	–	0,00	–	0,00	– / – / – / –	0,00 / 0,00 / 0,00 / 0,00
‘Гладіатор’	+	0,72	+	0,32	+ / + / + / +	0,61 / 0,32 / 0,32 / 0,56
‘Чарівний’	–	0,00	+	0,32	+ / + / + / +	0,28 / 0,32 / 0,32 / 0,32
‘Глінум’	+	0,32	+	0,50	+ / + / + / –	0,72 / 0,48 / 0,48 / 0,00
‘Зоря 87’	+	0,48	+	0,48	+ / + / + / +	0,67 / 0,64 / 0,72 / 0,72
‘Каменяр’	+	0,32	+	0,56	+ / + / + / –	0,61 / 0,56 / 0,56 / 0,61
‘Міандр’	+	0,48	+	0,50	+ / + / + / +	0,50 / 0,64 / 0,32 / 0,32
‘Журавка’	+	0,48	+	0,61	+ / + / + / +	0,50 / 0,32 / 0,32 / 0,64
‘Надія’	+	0,28	+	0,32	+ / + / + / +	0,67 / 0,56 / 0,32 / 0,64
‘Рушничок’	+	0,32	–	0,00	+ / + / + / –	0,44 / 0,56 / 0,32 / 0,00
‘Іванівський’	+	0,32	+	0,32	+ / + / + / +	0,44 / 0,56 / 0,56 / 0,28
‘Вручий’	+	0,28	+	0,28	+ / + / + / –	0,72 / 0,56 / 0,56 / 0,00

+ - наявність поліморфізму; – - відсутність поліморфізму

Генотипування представників родини *Solanaceae* (*S. tuberosum* L. та *S. lycopersicum* L.) за допомогою поліморфізму інтронів генів актину. АВР-профілі *S. tuberosum* (картоплі) мають значну кількість фрагментів, що розподіляються в діапазоні від 780 п. н. до 2000 п. н. Проведений міжсортний аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину картоплі дозволив диференціювати кожний із сортів. У чотирьох сортів картоплі показана наявність унікальних алельних фенотипів, а сама вибірка сортів є генетично гетерогенною. В результаті АВР-аналізу 12 сортів томату на електрофореграмі спостерігаються чіткі смуги, що мають довжину в діапазоні від 700 п. н. до 1500 п. н. Кожен із досліджуваних зразків (сортів) містив не менше ніж 7 ампліконів. Генетичне профілювання сортів томату з використанням АВР-методу показало, що досліджувана вибірка сортів виявилася низько поліморфною. Виявлено ряд спільних ампліконів, наявних як у сортів томату, так і картоплі. Ці фрагменти мають розмір близько 753 п.н., 743 п.н., 846 п.н. та 870 п. н. Наявність однакових ампліконів є передбачуваним явищем та засвідчує про приналежність томату та картоплі до одного роду *Solanum* та родини *Solanaceae*.

Застосування поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для дослідження генетичної мінливості деревних рослин. Результати ТВР-аналізу двадцяти видів деревних рослин свідчать про те, що основна область розподілення ампліконів знаходиться в межах 275-1500 п.н. (Рис. 12). У досліджених видів рослин всього зафіксовано 275 ампліфікованих фрагменти різної довжини. Найменшу кількість ампліконів мали *Robinia pseudoacacia* (306-871 п.н., вісім ампліконів), а найбільшу - *Tilia cordata* (55 ампліконів), довжина яких варіювала в межах від 366 п.н до 1352 п.н. Загальна організація фрагментів, виявлених в результаті електрофорезу ампліконів у межах одного роду, має ознаки, притаманні тільки цьому роду. Проаналізовані представники п'яти родів (*Betula pendula*, *Alnus glutinosa*, *Quercus robur*, *Fagus sylvatica*, *F. sylvatica* f. *salicifolia* та *Juglans regia*) мали різну кількість ампліфікованих фрагментів. Зокрема, у *B. pendula* з 15 проаналізованих фрагментів різної довжини спостерігалися спільні для всіх зразків в межах виду фрагменти з приблизною довжиною 300 п.н., 425 п.н. та 465 п.н., у *A. glutinosa* - з 19 виявлених ампліконів спільні фрагменти були з приблизною довжиною ампліконів 300 п.н. та 460 п.н. Оцінка рівня поліморфізму PIS у даних видів склала 0,319 та 0,380, що є досить високим значенням для деревних рослин (Hongtrakul, 1997).

У *Quercus robur* виявлено 19 фрагментів, з яких спільними для рослин виду були фрагменти з приблизним розміром ампліконів 500 п.н., 880 п.н., 1100 п.н. Значення PIS у даного виду дорівнювало 0,295. При порівнянні дерев різних форм роду *Fagus* L. (*F. sylvatica* та *F. sylvatica* f. *salicifolia*) з 16 ампліфікованих фрагментів було виявлено спільні для представників роду фрагменти з приблизним розміром 300 п.н., 535 п.н., 1150 п.н. та 1435 п.н. Значення PIS у даного роду склало 0,375. Рослини *J. regia* мали дев'ять ампліфікованих фрагментів, з яких усі були мономорфними, що може бути пов'язане як із малими об'ємами вибірок, так і клональною природою рослин. Слід зауважити, що при порівнянні електрофоретичних профілів представників порядку Fagales між собою, зокрема, *B. pendula*, *F. sylvatica*, *A. glutinosa* та *Q. robur*, можна спостерігати спільний мажорний фрагмент, розмір якого, варіював в межах 290 – 305 п.н. Результати проведеного

пізніше аналізу чотирьох представників родини *Pinaceae* (*Pinus sylvestris* L., *Abies alba* Mill., *Picea abies* (L.) H. Karst., *Picea pungens* Engelm) вказують не те, що основна область розподілу ампліконів варіює в межах від 301-2705 п.н.

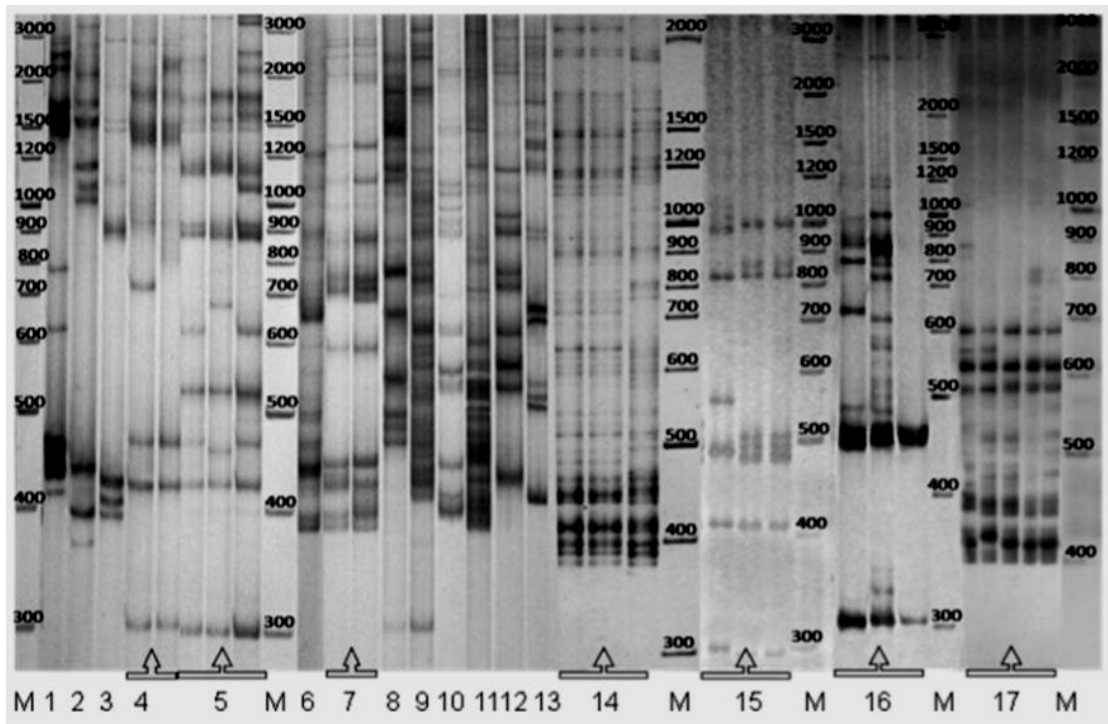


Рис. 12. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну у окремих видів рослин: 1 - робінія звичайна (*R. pseudoacacia*), 2 - шовковиця біла (*Morus alba*), 3 - в'яз шорсткий (*U. glabra*), 4 - береза повисла (*B. pendula*), 5 - бук звичайний (*F. sylvatica*), 6 - клен сріблястий (*Acer saccharinum*), 7 - клен гостролистий (*A. platanoides*), 8 - катальпа бігнієподібна (*Catalpa bignonioides*), 9 - липа серцелиста (*T. cordata*), 10 - гіркокаштан звичайний (*Aesculus hippocastanum*), 11 - тополя чорна (*Populus nigra*), 12 - горіх волоський (*J. regia*), 13 - ясен звичайний (*Fraxinus excelsior*), 14 - осика звичайна (*Populus tremula*), 15 - дуб черешчатий (*Q. robur*), 16 - вільха чорна (*Alnus glutinosa*), 17 - клен ясенелистий (*A. negundo*), М - ДНК-маркер

В цілому було виявлено 57 фрагментів різної довжини. Зокрема, аналіз фрагментів *P. pungens* виявив сім ампліконів, довжина яких склала 416-1113 п.н., 10 ампліконів виявлено у *P. abies* - 420-1126 п.н., відповідно. Дослідження *P. sylvestris* виявило 18 смуг, довжина яких варіювала від 307 п.н. до 580 п.н. Найбільша кількість ампліконів (25) виявлена у *Abies alba* L. з різним розміром фрагментів від 301 до 1116 п.н. При порівнянні досліджених видів хвойних не було виявлено загальних для всіх фрагментів. Однак три поширені мономорфні смуги з приблизною довжиною 453 п.н., 840 п.н. та 863 п.н. були виявлені у *P. abies* та *P. pungens*. Ймовірно, це пов'язано з тим, що ці представники належать до того самого роду – *Picea*. В цілому, аналіз поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну дозволяє чітко диференціювати види одного роду між собою. Це має велике значення для екологічних досліджень, при аналізі популяційної динаміки деревостанів, швидкій діагностиці випадків гібридного походження рослин.

Дослідження генетичної структури деревостанів *Quercus robur* L. на антропогенно змінених територіях за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну. Дуб звичайний (*Q. robur* L.) – аборигений вид української флори, одна з головних лісоутворювальних порід, насадження якої займають близько 24 % від усієї площі лісів України, відзначається високою екологічною пластичністю та має велике господарське значення. Довговічність рослин дуба звичайного роблять його зручним модельним об'єктом для різнопланової оцінки генетичних процесів, при лісовідновленні на антропогенно порушених територіях чи збереженні існуючих деревостанів в умовах підвищеного антропогенного навантаження (Frouz et al., 2015; Petit et al., 2002; Neophytou et al., 2010). В результаті проведених досліджень *Q. robur* НПП «Голосіївський» було здійснено генотипування 55 вікових дерев. Виявлено 40 поліморфних і один мономорфний (біля 880 п.н.) ТВР-фрагмент. Частота фрагментів з приблизним розміром 275 п.н., 490 п.н., 500 п.н. та 1110 п. н. складає від 70% до 90%. Генетичний поліморфізм вікових дерев *Q. robur* НПП «Голосіївський» є досить високим, PI_C (0,22 – 0,39), ефективна кількість алелей на локус N_e (1,174 – 1,268), інформаційний індекс Шенона (0,204 – 0,269). У вікових дерев *Q. robur* НПП «Голосіївський» не виявлено географічну диференціацію генетичної структури вибірок. На частку міжвибіркової генетичної варіабельності припадає біля 6% генетичної мінливості. Близько 93% генетичної мінливості зосереджено на індивідуальному рівні. При використанні ТВР-методу вставлено, що досліджені деревостани дуба звичайного не мають стабілізованої генетичної структури, але водночас володіють досить великим генетичним різноманіттям.

Генетичні особливості фенологічних форм *Q. robur* L. за даними аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів. В деревостанах *Q. robur* природного походження зустрічаються рослини, диверсифіковані за часом виникнення фенологічних фаз. В максимальному своєму проявленні вони розрізняються як дві чітко виділені форми (вперше, описані Черняєвим в 1858 р.): *Q. robur* var. *praecox* – рання фенологічна форма і *Q. robur* var. *tardiflora* Czern. – пізня фенологічна форма, відмінні як за часом виникнення фенологічних фаз, так і за фенотипом взагалі. Визначено, що ці різновиди мають значні відмінності у стійкості до оточуючого середовища, зростанні та розвитку (Milenin, 1997; Rubtsov et al., 2007, 2017; Molchanov, 2011, 2012; Silchenko, 2012; Utkina, Varna et al., 2017). Рослини ранньої форми *Q. robur* краще переносять нестачу вологи у ґрунті в порівнянні з пізньою формою, що дозволяє їм зростати у сухих місцях, однак вони пошкоджуються весняними заморозками і листогризучими комахами. Пізні форми *Q. robur* більш стійкі до низьких температур весною, однак пошкоджуються літньою посухою (Molchanov, 2012; Dantec et al., 2015; Puchalka et al., 2017). Вони є перспективними для широкого використання при штучному формуванні зелених зон у європейських країнах (Coutinho et al., 2015). Молекулярно-генетичний аналіз може допомогти виявити найбільш цінні зразки для розмноження їх посадкового матеріалу через культуру *in vitro*. Найбільш ефективно це завдання можна виконати за допомогою молекулярних методів, що базуються на використанні ДНК-маркерів, а саме SSR та ТВР.

В результаті аналізу мікросателітних локусів quru-GA-1C08, quru-GA-0C19, QPZAG9 було виявлено 30 алелів, 9 з яких (quru-GA-1C08: 266, 282, 284, 286; quru-

GA-0C19: 219, 228; QPZAG9: 180, 194, 212) були унікальними для ранньої форми, а 5 – для пізньої форми (quru-GA-1C08: 262, 268; quru-GA-0C19: 323, 258; QPZAG9: 206). Встановлено відмінності між алельним складом вибірок ранніх та пізніх форм *Q. robur* виявилися значимими на рівні $p \leq 0,01$ для локусу QPZAG9, та на рівні $p \leq 0,001$ для локусів quru-GA-1C08, quru-GA-0C19. Виявлено пару алельних варіантів за локусом quru-GA-0C19, за частотами яких існує значна різниця між ранніми та пізніми фенологічними формами *Q. robur*. Алель quru-GA-0C19-222 практично не представлений у пізньої форми *Q. robur*, натомість у цієї форми переважає quru-GA-0C19-226. Аналогічно алель quru-GA-1C08-266 представлений виключно у ранньої фенологічної форми *Q. robur* і відсутній у пізньої. В подальшому наявність чи відсутність цих алелів може бути використана для діагностичних потреб (фінгерпринтингу).

ТВР-аналіз 40 дерев *Q. robur* обох форм загалом виявив 46 фрагментів, що варіюють за розміром в діапазоні від 298 п. н. до 1430 п.н. (Рис. 13). З виявлених фрагментів унікальними для ранньої фенологічної форми *Q. robur* були чотири (з приблизним розміром 310 п.н., 400 п.н., 405 п.н., 480 п.н.) та для пізньої форми – п'ять фрагментів (з приблизним розміром 425 п.н., 440 п.н., 445 п.н., 515 п.н. та 1330 п.н.). Рідкісних алелів (частота яких складає менше 10 %) виявлено у ранньої форми – 13, у пізньої – 9. Найчастіше у обох форм зустрічаються фрагменти з приблизним розміром 850 п.н. (частота 100 %) та 1170 п.н. (частота складає від 70% до 75 %).

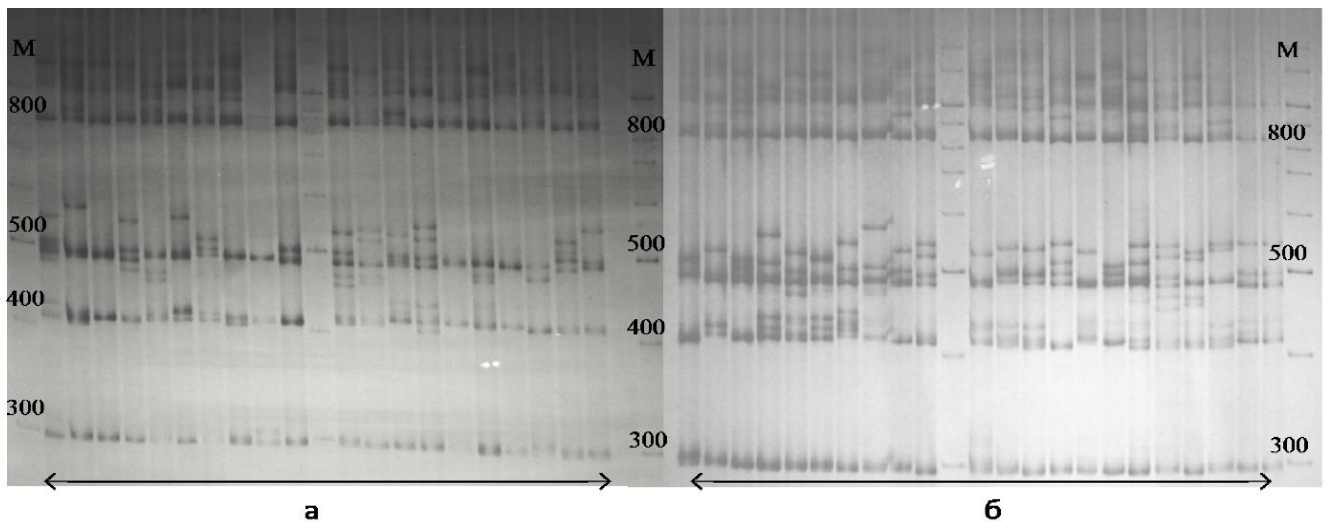


Рис. 13. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну у досліджених дерев *Q. robur* L.: а – рання фенологічна форма (*Q. robur* var. *Praeox*); б – пізня фенологічна форма (*Q. robur* var. *Tardiflora*); М – ДНК-маркер

В цілому в результаті проведеного аналізу з'ясовано генетичні відмінності між ранньою та пізньою фенологічними формами *Quercus robur*. У дерев *Q. robur* var. *praesox* виявлено 9 унікальних алелей за мікросателітними локусами та 4 фрагменти за ТВР-маркерами, а у *Q. robur* var. *tardiflora* – 5 унікальних алелей за мікросателітними локусами та 5 фрагментів за ТВР-маркерами. Виявлено відмінності за частотою предомінантних алелів quru-GA-0C19-222 (практично відсутній у вибірці пізньої фенологічної форми) та quru-GA-0C19-226 (частота сягає

більше 80% у ранньої фенологічної форми і лише біля 50% у пізньої). Виявлений поліморфізм фенологічних форм *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* вказує на те, що відмінності можуть бути генетично обумовлені, а різні види ДНК-маркерів використані для генетичного профілювання та паспортизації *Q. robur*.

Дослідження генетичної структури *Ulmus pumila* L. та *Ulmus suberosa* Moench в Степовому Придніпров'ї за допомогою аналізу поліморфізма інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів. Вивчення впливу інвазивних неаборигенних видів рослин на стан природної флори й рослинності тісно пов'язано зі збереженням біорізноманіття, екологічної рівноваги в природі та розв'язанням проблем біобезпеки. Проблема фітоінвазій (фітозабруднення) нині є однією з глобальних проблем, яка все більше привертає увагу ботаніків, екологів, спеціалістів сільського господарства, ресурсознавців, медиків та ін., оскільки фітозабруднення спричиняє багато негативних наслідків для суспільства.

В'яз карликовий – *Ulmus pumila* L. (*U. pinnato-ramosa* Dieck. ex Koehne) – ксенофіт східно-азійського походження; на території України культивується у садах і парках на півдні Степу, на Сиваші та в Криму, вирощується як цінна декоративна рослина та для полезахисних смуг у посушливих районах. Останнім часом вид дичавіє, активно поширюється та зростає вздовж доріг і залізничних колій в містах Чернігівської, Харківської, Закарпатської областей, в Буковинському Передкарпатті, Середньому Придніпров'ї, Причорномор'ї тощо. Досить агресивно він проявив себе і на території інших країн (Китай, Італія, США, Росія) (Zalara et al., 2009; Hirsch et al., 2017; Bertolasi et al., 2015; Стародубцева и др, 2014). *Ulmus suberosa* Moench, або *Ulmus campestris* var. *suberosa* Wahl – в'яз корковий, також інвазивний вид, розповсюджений майже по всій території України (крім Карпат і крайнього півдня), Західній Європі, Малій Азії, північному Ірану, півдні європейської частині Росії та Кавказі.

На успішне поширення цих видів впливає рівень генетичного поліморфізму, який залежить як від кількості особин, що утворюють інвазивні популяції та перезапильються в її межах, так і від походження інвазивних/інтродукованих екземплярів (Sakai et al., 2001). Генетичне різноманіття інвазивних видів залежить також від гібридизаційних процесів зі спорідненими нативними видами місцевої флори (Zalara et al., 2010).

Поліморфізм ядерних мікросателітних локусів у *U. pumila* та *U. suberosa*.

В ході аналізу п'яти ядерних мікросателітних локусів рослин *U. pumila* та *U. suberosa* виявлено 28 алелей. В кожній досліджуваній вибірці виявлено унікальні алелі: найбільше для П1 – 5 (UR138: 240 п.н.; UR153: 200 п.н., 208 п.н.; UR101: 122 п.н., 131 п.н.); для П2 – 3 (UR158: null, 183 п.н.; UR101: null); для П3 – 1 (UR153: 189 п.н.), для П4 – 2 (UR153: 191 п.н.; UR158: 177 п.н.). У *U. suberosa* всі досліджені мікросателітні локуси виявилися мономорфними. У всіх вибірках спостерігали помірний рівень очікуваної гетерозиготності. Найбільший її рівень був властивий деревам *U. pumila* на ділянці П1 ($H_e = 0,455$), яка характеризувалась моновидовим угрупованням з високою щільністю дерев. На ділянках, де були присутні інші деревні рослини, значення H_e були нижчими: на ділянках П2 та П3 ($H_e = 0,402$ та $0,354$, відповідно). Наявна гетерозиготність за мікросателітними локусами на всіх ділянках була нижчою очікуваної за рахунок надлишку гомозиготних генотипів (Но

= 0,350; 0,330; 0,260, відповідно). Це свідчить про певний рівень інбредності аналізованих вибірок, що, вірогідно, пов'язано як з умовами середовища, так і залежить від вихідної генетичної структури висаджених материнських рослин під час формування деревостанів.

Поліморфізм інтронів β -тубуліна у рослин *U. pumila* та *U. suberosa*. ТВР-аналіз у дерев *Ulmus pumila* загалом виявив 17 фрагментів (Рис. 14). При цьому 9 з 10 фрагментів двох досліджених ділянок виявилися поліморфними. Мономорфними були фрагменти з приблизним розміром 380 п.н. для ділянки П2 та 1030 п.н. для ділянки П1. Зона розподілу всіх чітких та відтворюваних фрагментів знаходилася в діапазоні від 380 п.н. до 450 п.н. та від 820 п.н. до 1100 п.н. Вище цієї зони також спостерігаються фрагменти, проте вони є досить розмиті та не детектуються кожного разу. Зона від 500 п.н. до 800 п.н. проявлялася нестабільно, тому у розрахунках не враховувалась. Однак у цій зоні спостерігаються фрагменти, характерні для кожної ділянки. При порівнянні електрофоретичних профілів, отриманих на основі ТВР-аналізу, для *U. pumila* можна відмітити, що ділянки рослин незначно відрізняються за кількістю ампліконів та їх розподілом за розмірами. ТВР-аналіз у дерев *U. suberosa* загалом виявив 10 фрагментів. При цьому всі вони були мономорфними, як і за умов аналізу мікросателітних маркерів. Найчастіше зустрічаються фрагменти з приблизним розміром 435 п. н. (частота складає від 50% до 65%), 400 п. н. (частота складає від 50% до 70%), 890 п. н. (частота складає від 80% до 95%), 380 п. н. (частота складає від 85% до 100%) та 1030 п. н. (частота складає від 90% до 100%). У рослин *U. suberosa* виявлено фрагменти, які відсутні у рослин *U. pumila*.

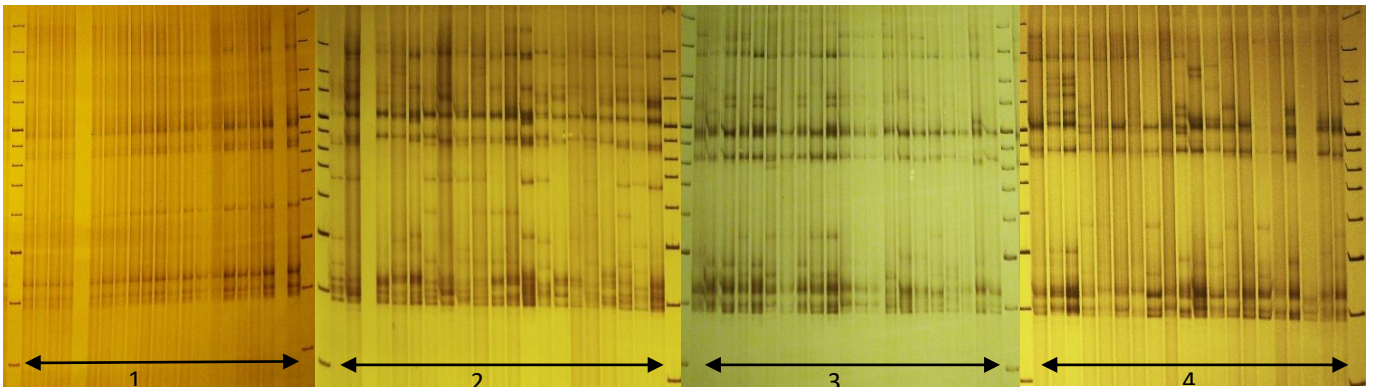


Рис. 14. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну дерев: **1** – ділянка П4 *U. suberosa*, **2** – П1, **3** – П2, **4** – П3 *U. pumila*, М – ДНК-маркер

Оцінка показників поліморфізму за ТВР-маркерами, проведена для досліджених територій, виявила зниження, як і за мікросателітними маркерами, кількості фрагментів на локус на ділянці П3 ($N_e = 1,239$), порівняно з ділянками П1 та П2 ($N_e = 1,525$ та $1,402$ відповідно) (Рис. 29). За інформаційним індексом Шенона також спостерігаються відмінності між ділянкою П3 ($I = 0,252$) та іншими ділянками П1 та П2 ($I = 0,460$ та $0,395$ відповідно). Саме низьке значення РС у рослин було зафіксовано на ділянці П3 (0,155), а найвище у рослин ділянок П1 (0,307) та П2 (0,253). Значимі відмінності генетичного поліморфізму досліджених дерев *U. pumila* виявлено між ділянкою П3 та П1, П2. Тобто дерева на ділянці П3 виявилися за ТВР-

маркерами менш генетично різноманітними. В цілому проведений аналіз мінливості мікросателітних локусів та ТВР-аналіз свідчать, що *U. pumila* та *U. suberosa* у Степовому Придніпров'ї за дослідженими маркерами характеризується відносно низьким рівнем генетичної мінливості.

Генетичне профілювання мікрводоростей за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Представники відділів *Chlorophyta*, *Ochrophyta* та *Euglenophyta* є невід'ємною складовою біорізноманіття різних екосистем. Морфологічні методи не завжди дають змогу відрізнити зовнішньо ідентичних представників не лише різних видів, а й родів мікрводоростей. Тому для з'ясування питань філогенетики та видоідентифікації застосовують різноманітні молекулярно-генетичні маркери (Матвеева и др, 2011, Wongsawad, Peerapornpisal 2014).

Проведений аналіз 10 штамів мікрводоростей з використанням ТВР-маркерів показав, що переважна більшість чітких та поліморфних смуг (ампліконів інтронів генів β -тубуліну) візуалізувалася в діапазоні 290–1200 п. н. (Рис. 15). Окрім того, на електрофореграмі спостерігається поява нечітких смуг, характерних для ПЛР-продуктів неповної ампліфікації. В подальшому ці амплікони не аналізувалися. Діапазон розмірів утворюваних фрагментів з інтронами генів β -тубуліну в цілому відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона з невеликими ділянками першого та другого екзонів (Bardini et al., 2004).

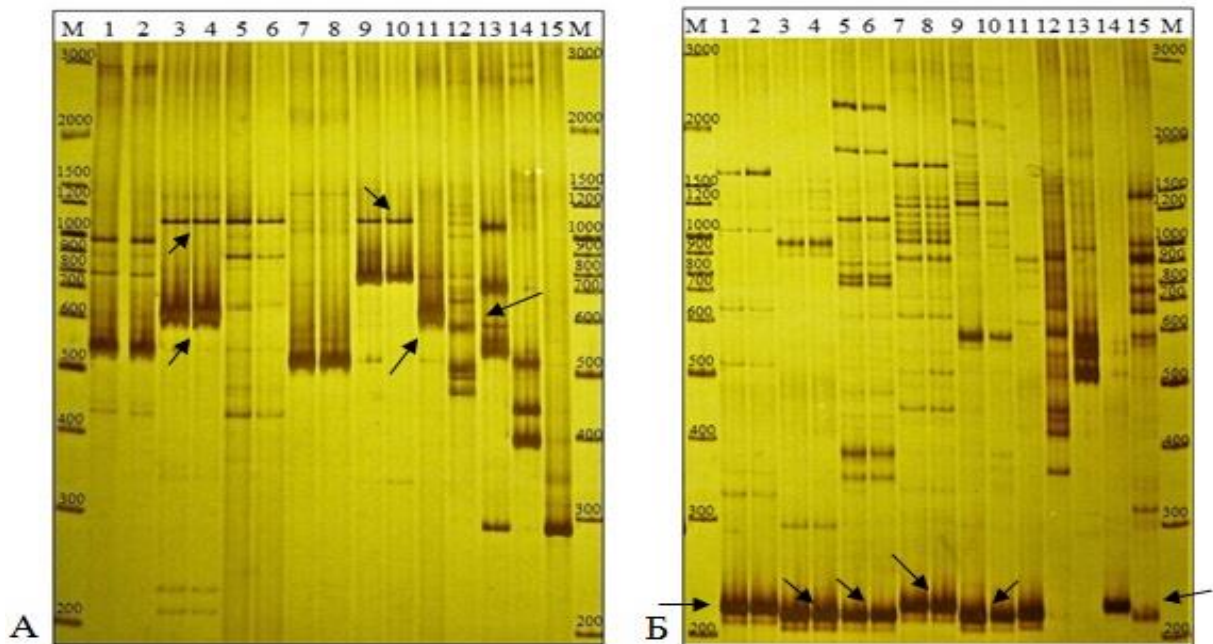


Рис. 15. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну водоростей (інтервал 200–3300 п. н.), отримана за допомогою (А) ТВР- та (Б) сТВР-методів: 1 – 15 (зверху) - номери зразків 1 – *Acutodesmus dimorphus*, штам IBASU-A 251, 2 – *A. dimorphus*, штам IBASU-A 251, 3 – *Desmodesmus armatus*, штам IBASU-A 263, 4 – *D. armatus*, штам IBASU-A 263, 5 – *A. dimorphus*, штам IBASU-A 344, 6 – *A. dimorphus*, штам IBASU-A 344, 7 – *A. acuminatus*, штам IBASU-A 245, 8 – *A. acuminatus*, штам IBASU-A 245, 9 – *D. armatus*, штам IBASU-A 338, 10 – *D. armatus*, штам IBASU-A 338, 11 – *D. subspicatus*, штам IBASU-A 408, 12 – *Dunaliella minuta*, штам IBASU-A 40, 13 – *D. salina*, штам IBASU-A 4, 14 – *Tribonema ulotrichoides*, штам IBASU-A 520, 15 – *Euglena* sp., штам IBASU-A 498, М – ДНК-маркер.

Для кожного зразку спостерігається утворення ДНК-профілю зі специфічним набором та розподілом ампліконів інтронів генів β -тубуліну з певними відмінностями. При цьому ТВР-профілі відрізнялися на різних таксономічних рівнях (міжродовому, міжвидовому та між окремими штамми). Зокрема, спостерігалось утворення ДНК-специфічних профілів, що містили фрагменти інтронів генів β -тубуліну для кожного з п'яти родів мікроводоростей, а саме родів: *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Dunaliella*, родів *Tribonema* та *Euglena*. На міжвидовому рівні виявлений поліморфізм інтронів генів β -тубуліну у видів *A. acuminatus*, штам IBASU-A 245 та *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251 та штам IBASU-A 344). Також були проаналізовані різні види роду *Desmodesmus*. Встановлено, що *D. armatus*, штам IBASU-A 263 та *D. subspicatus*, штам IBASU-A 408 містили спільний амплікон розміром близько 620 п. н., хоча у *D. armatus*, (штам IBASU-A 338 - цей фрагмент відсутній). Для *D. salina*, штам IBASU-A 4 та *D. minuta* штам IBASU-A 40 показано утворення відмінних ТВР-профілів з лише одним спільним фрагментом довжиною близько 595 п. н.

З метою генетичного профілювання та диференціації мікроводоростей на рівні окремих штамів в межах одного виду проаналізовано по два штами *A. dimorphus* (штам IBASU-A 251 - і штам IBASU-A 344) та *D. armatus* (штам IBASU-A 338). Поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в межах досліджених штамів не було виявлено. Для кожної пари зразків одного штаму утворювалися ідентичні амплікони інтронів. Дані фінгерпринтингу за першим інтроном були використані для кластерного аналізу методом UPGMA. З отриманої дендрограми (Рис. 16) видно, що з одного боку, всі зразки з високою бутстреп підтримкою диференціюються один від одного, а з іншого – розподілилися на три кластери згідно їх таксономічної класифікації, при цьому в межах кожного кластеру зберігається генотипова приналежність.

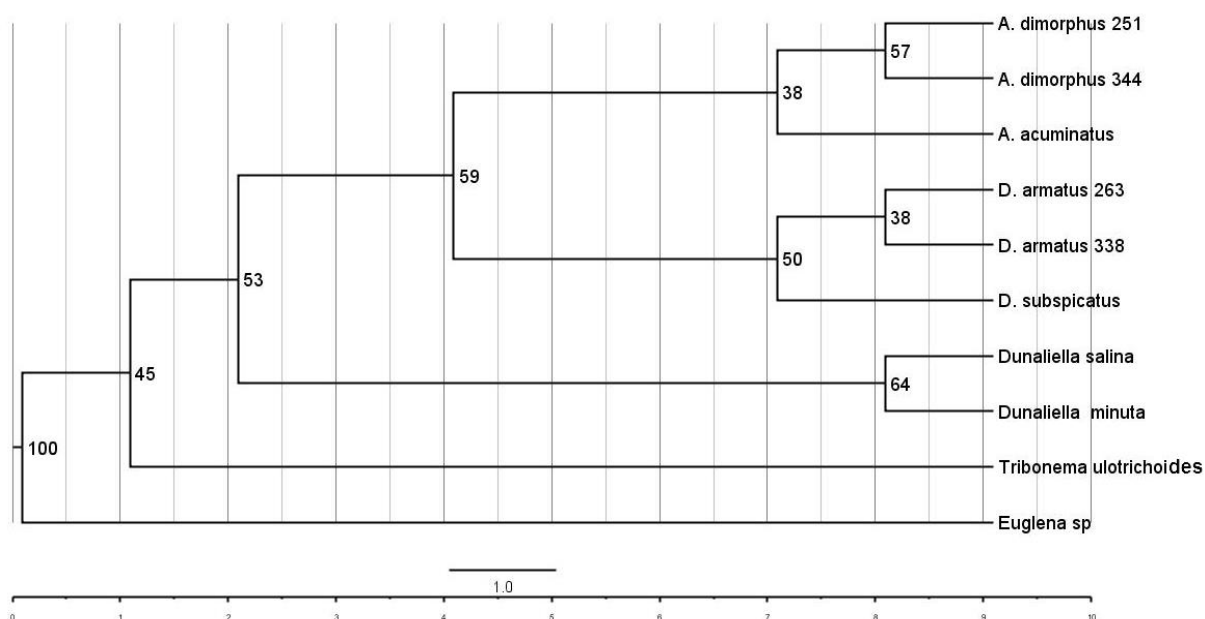


Рис. 16. UPGMA дендрограма, що базується на поліморфізмі довжини інтронів генів β -тубуліну у досліджених зразків мікроводоростей.

В подальшому для цих же 10 штамів була здійснена варіація ТВР-аналізу, яка передбачає оцінку поліморфізму довжини другого інтрону генів β -тубуліну – сТВР метод (Braglia, 2010). Раніше сТВР підхід використовувався виключно для генотипування вищих рослин. Тож в цьому дослідженні вперше показані результати сТВР-аналізу у мікроводоростей. У кожному з проаналізованих з використанням сТВР-маркерів зразків утворювалися чіткі і відтворені фрагменти другого інтрону генів β -тубуліну, які розташовувалися в діапазоні від 200 до 3000 п. н. (Рис. 30 Б). На міжродовому рівні для кожного з п'яти досліджуваних родів мікроводоростей показано утворення ДНК-профілів, які значно відрізнялися один від одного. Варто зазначити, що смуга поліморфних ампліконів, розташованих вище 200 п. н. є характерною для представників всіх проаналізованих родів. Виключенням є штами роду *Dunaliella*: *D. salina*, штам IBASU-A 4 та *D. minuta* штам IBASU-A 40, у яких ці фрагменти повністю відсутні.

В цілому, порівнюючи отримані результати з використанням двох споріднених підходів – ТВР та сТВР – можна зробити висновок, що обидві маркерні системи дозволяють якісно генотипувати різні зразки мікроводоростей. Кожна з використаних ДНК-маркерних систем дозволила отримати ряд чітких та відтворених фрагментів, що містили перший (для ТВР) та другий (для сТВР) інтрони генів β -тубуліну. Специфічні ТВР- та сТВР-профілі значно відрізнялися між собою за кількістю та розташуванням цільових ампліконів, однак дозволили чітко диференціювати генотипи мікроводоростей на різних таксономічних рівнях. Окрім того, обидві маркерні системи однозначно підтвердили однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму. Отримані результати в цілому свідчать про доцільність подальшого використання даних ДНК-маркерів для генотипування та аналізу різних таксонів водоростей.

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ α -ТУБУЛІНУ

Гени α -тубуліну також належать до мультигенної родини генів тубулінів. Добре дослідженими є гени α -тубуліну *A. thaliana* (L.) Heynh. Їх 6, і вони кодуєть 4 ізотипи білка (Korczak et al., 1992; Favery et al., 2001). α -тубулін разом з β -тубуліном є дуже консервативним білком, які разом формують мікротрубочки (Findeisen et al., 2014). Консервативність амінокислотної послідовності α -тубуліну відображена в послідовностях кодуєчих ділянок генів (екзонах). Цей факт дозволяє припустити, що гени α -тубуліну можуть бути використані для створення універсальної ІЛР-маркерної системи, придатної для проведення молекулярно-генетичного аналізу різних генотипів вищих рослин. Для розроблення такої системи було здійснено аналіз екзон-інтронної структури генів α -тубуліну геномів різних видів вищих рослин.

Результати аналізу екзон-інтронної структури генів α -тубуліну, закодованих в геномах *A. thaliana*, *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, показали, що більшість генів мають у своєму складі по 4–5 екзонів та 3–4 інтрони. Однак є декілька винятків, зокрема ген α -тубуліну *A. thaliana* (TUBA6), який містить лише 2 екзони та 1 інтрон, а ген TUBA4 – 3 екзони та 2 інтрони. З метою створення

ДНК-маркерної системи, яка б дозволила оцінити поліморфізм довжини інтронів генів α -тубуліну, на підставі попередньо здійсненого вирівнювання, була розроблена пара вироджених праймерів для проведення ПЛР. Зважаючи на той факт, що ген TUBA6 *A. thaliana* містить лише I інтрон, вироджені праймери підібрані таким чином, щоб оцінити поліморфізм довжини I інтрону всіх відомих генів α -тубуліну. Прямий та зворотний праймери (TUA_1in_F: 5' – TGG GAR CTN TAY TGY CTYGA – 3'; TUA_1in_R: 5' – TCR CTR AAR AAN GTR TTR AAN GMA TC – 3') відпалюються на консервативних ділянках I та II екзонів і дозволяють проводити ампліфікацію ділянки гена α -тубуліну, що розташована між відповідними праймерами та містить I-ий інтрон (Рис. 17).

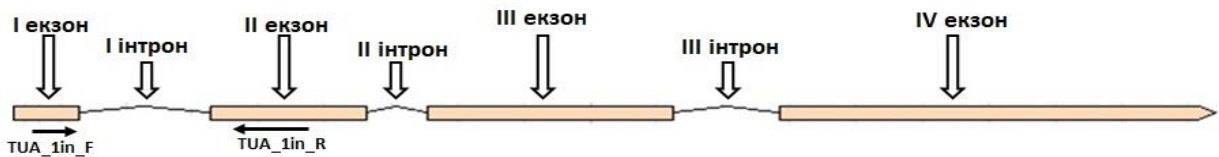


Рис. 17. Схема гена α -тубуліну

На зразку 1 Рис. 18 показано специфічний ДНК-профіль *A. thaliana* дикого типу, в якому фрагменти з інтронами α -тубуліну мають розміри близько 340 та 607 п. н. Також спостерігається утворення низки фрагментів з розміром близько 1371 та 1666 п. н. Результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну у сортів *L. usitatissimum* представлено на Рис. 18 (зразки 2–6). Утворені фрагменти з інтронами розподіляються в діапазоні 400–2000 п. н. Для всіх проаналізованих сортів *L. usitatissimum* показана наявність спільних ампліконів інтронів α -тубуліну, що свідчить про утворення видоспецифічних ДНК-профілів. Більшість фрагментів інтронів *L. usitatissimum* є мономорфними, однак сорт 'Чарівний' (Рис. 18, зразок 2) містить амплікони розміром 754 та 1764 п. н. (помічені стрілками), які відрізняють ДНК-профіль цього сорту від інших. Також сорт 'Сіверський' (Рис. 18, зразок 3) містить унікальний амплікон довжиною близько 336 п. н. (помічений стрілкою). Найімовірніше, якщо розширити вибірку сортів *L. usitatissimum*, можна буде виявити більшу кількість поліморфних фрагментів з інтронами генів α -тубуліну.

Результати аналізу поліморфізму довжини I інтрону генів α -тубуліну в різних сортах *O. sativa* показані на Рис. 18, зразки 7–11. У результаті проведення ПЛР-аналізу амплікони інтронів генів α -тубуліну *O. sativa* розподілились у широкому діапазоні від 340 до 1800 п. н. Характерним для проаналізованих зразків *O. sativa* є те, що всі утворені ДНК-профілі є унікальними за рахунок розподілу та кількості візуалізованих фрагментів інтронів. Мономорфними є зони з довжиною фрагментів близько 590, 1177, 1539 та 1704 п. н. Інша частина утворених фрагментів виявилася різнорідною. Зокрема у сорту 'Преміум' (Рис. 18, зразок 7) наявні унікальні амплікони з розміром фрагментів близько 423, 425, 487 і 814 п. н., проте відсутній фрагмент 343 п. н. Такий ДНК-профіль сорту 'Преміум' відрізняє його від інших зразків у вибірці. Загалом ДНК-маркери, засновані на виявленні поліморфізму довжини I інтрону генів α -тубуліну, вдало генотипували сорти *O. sativa* та продемонстрували значну кількість поліморфних смуг.

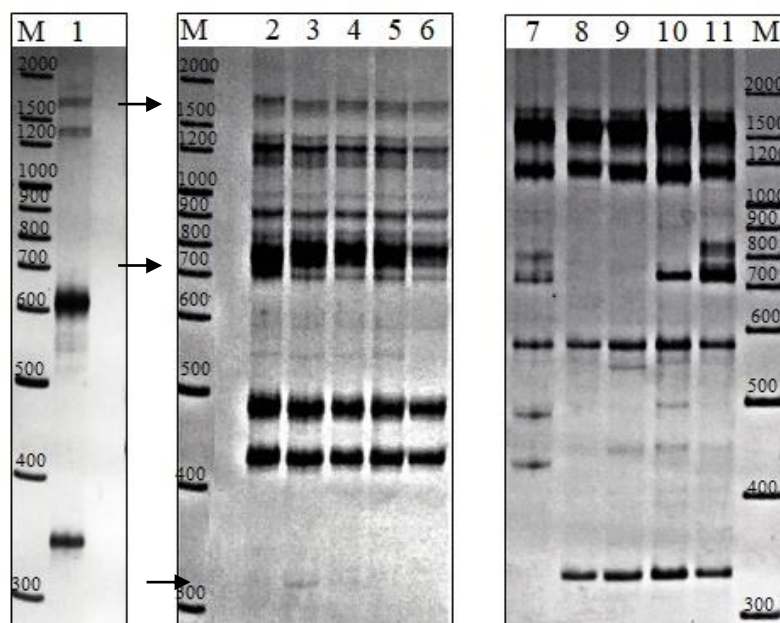


Рис. 18. Електрофореграма з продуктами ПЛР, що утворюються під час ампліфікації ДНК з праймерами до I-го інтрону генів α -тубуліну у *A. thaliana*, *L. usitatissimum* та *O. sativa*. 1 – *A. thaliana* – дикийтип, 2–6 – сорти *L.usitatissimum*, 2 – 'Чарівний', 3 – 'Сіверський', 4 – 'Каменяр', 5 – 'Журавка', 6 – 'Іванівський', 7–11 – сорти *O. sativa*, 7 – 'Преміум', 8 – 'Консул', 9 – 'Віконт', 10 – 'УР-4970', 11 – 'УР-4558'. М – ДНК-маркер

На Рис. 19 представлені результати аналізу поліморфізму довжини I інтрону генів α -тубуліну у сортів томатів та картоплі. ДНК-профілі п'яти сортів *S. lycopersicum* представлені на зразках 1–5 (Рис. 19). Утворені фрагменти інтронів генів α -тубуліну розподілені в широкому діапазоні довжин – 200-2000 п. н. Більшість зон розподілу ампліконів є мономорфними, однак спостерігається поява поліморфних фрагментів, переважно у верхній частині електрофореграми від 1000 до 2000 п. н. Слід зазначити, що сорт 'Американський синій' (Рис. 19, зразок 5) містить декілька унікальних ампліконів з довжинами близько 205, 268 та 396 п. н., що значно відрізняє його від інших. Загалом кожен з проаналізованих сортів відрізняється один від одного за рахунок кількості та розподілу ампліконів інтронів генів α -тубуліну. Також на Рис. 34 продемонстровані ДНК-профілі інтронів 4 сортів (зразки 4–9) *S. tuberosum*, проаналізовані з використанням ДНК-маркерів, які виявляють поліморфізм довжини I-го інтрону генів α -тубуліну. Утворені амплікони інтронів візуалізувалися в діапазоні 150–2000 п. н.

Більшість фрагментів є мономорфними, хоча були присутні й поліморфні фрагменти. У зразка 9 сорту 'Вернісаж' наявний фрагмент 410 п. н., що відрізняє ДНК-профіль цього сорту від інших. Характерною ознакою сорту 'Світанок' є відсутність декількох ампліконів у ДНК-профілі. Загалом, за допомогою ДНК-маркерів, що оцінюють поліморфізм довжин інтронів генів α -тубуліну, вдалося диференціювати генотипи різних сортів *S. tuberosum*. Отже, результати проведеного аналізу свідчать про те, що розроблений підхід дозволяє генотипувати різні рослини та ідентифікувати поліморфізм довжини інтронів генів α -тубуліну на міжсортівому та міжвидовому рівнях.

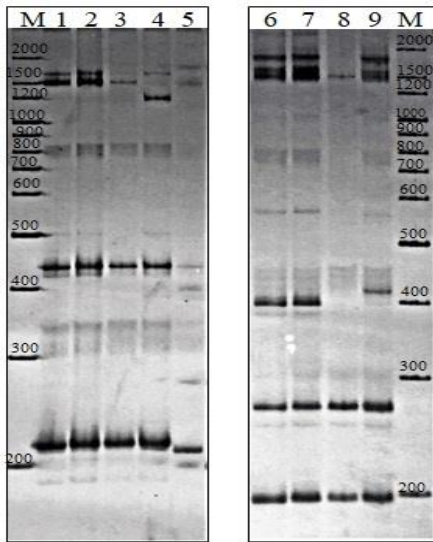


Рис. 19. Електрофореграма продуктів ПЛР ДНК рослин з праймерами до I інтрону генів α -тубуліну у *S. lycopersicum* та *S. tuberosum*. 1–5 – сорти *S. lycopersicum*, 1 – 'Money Maker', 2 – 'Перлина', 3 – 'Волгоградський', 4 – 'Балконне чудо золоте', 5 – 'Американський синій', 6–9 – сорти *S. tuberosum*, 6 – 'Зарево', 7 – 'Левада', 8 – 'Світанок', 9 – 'Вернісаж'. М – ДНК-маркер.

В цілому запропонована ПЛР-маркерна система, яка дозволяє оцінити поліморфізм довжини I інтрону генів α -тубуліну у різних видів рослин, є універсальною й дає можливість проводити генотипування та диференціацію різних видів (сортів) вищих рослин, поєднуючи в собі надійність, швидкість отримання вихідних даних і простоту їхнього аналізу. Вона може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу вищих рослин як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами.

ГЕНЕТИЧНЕ ПРОФІЛЮВАННЯ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ АНАЛІЗУ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ γ -ТУБУЛІНУ

Крім α - та β -тубуліну до складу мікротрубочок входить γ -тубулін, який є критично необхідним для їх енуклеації, а його амінокислотна послідовність є високонсервативною (Ovechkina, 2001). Тому розроблення нового варіанта ПЛР-методу, що базувався б на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну, представляє неабиякий інтерес для молекулярних біологів. Для цього було проведено пошук консервативних ділянок екзонів генів γ -тубуліну, що оточують інтрони, для подальшого підбору до них праймерів таким чином, щоб під час ПЛР можна було отримати копії послідовностей інтронів. Праймери підібрано з використанням послідовностей генів γ -тубулінів таких видів рослин, як *Z. mays* (GRMZM2G085970, GRMZM2G073888, Zm00008a025310, Zm00008a030940), *A. thaliana* (AT3G61650), *L. usitatissimum* (Lus10010986.g, Lus10007851.g), для яких екзон-інтронна структура гена γ -тубуліну є доступною в базі даних Phytozome. Після вирівнювання послідовностей генів з використанням алгоритму MUSCLE та програмного забезпечення UniproUGENE (Okonechnikov, 2012) було обрано найбільш консервативні ділянки екзонів, до яких було підібрано пару вироджених праймерів TUG-in (табл.1). Місця відпалу праймерів зазначено на схематичному зображенні (Рис.20).

Згідно наведеної схеми у складі ампліконів з інтронами γ -тубуліну *A. thaliana* продукти ампліфікації містять повну послідовність II-го інтрону, продукт *Z. mays* – II-го інтрону, III-го екзону та III-го інтрону, продукт *L. usitatissimum* – I-го інтрону, II-го екзону та II-го інтрону. Середня очікувана довжина продуктів ПЛР (інтронів)

для вказаних видів рослин складає 500 п.н. та вище. Як видно з наведених даних, для *A. thaliana* характерні два фрагменти ДНК завдовжки приблизно 520 та 560 п.н. Їх розміри цілком узгоджуються з даними біоінформатичного аналізу. На сьогодні в базі даних Uniprot розміщені дві достовірно анотовані послідовності γ -тубулінів з геному *A. thaliana* (TUBG1, TUBG2). Для *L. usitatissimum* наразі немає достовірно анотованих послідовностей γ -тубуліну (згідно з Uniprot).

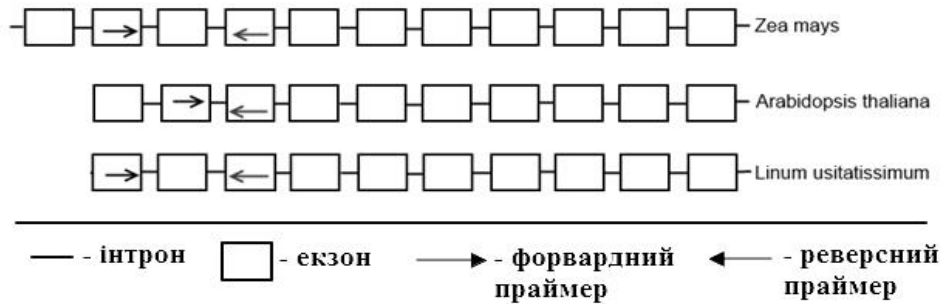


Рис. 20. Схематичне зображення місць відпалу вироджених праймерів до ділянок генів γ -тубуліну.

Проте, як видно з Рис. 21(а) для нього характерна значно більша кількість фрагментів у діапазоні довжин від 500 до 900 п.н. Тому можна припустити, що в геномі льону може міститися більша кількість генів γ -тубуліну, ніж у арабідопсису. Важливо, що у випадку *L. usitatissimum* найбільше за профілем інтронів виокремлюється серед інших сорт Глобус (має чіткий амплікон 500 п.н.). Слід зазначити, що даний сорт льону слабо диференціюється від інших зразків у процесі ТВР- та SSR-аналізу, що було показано нами раніше (Rabokonet al., 2018). Що стосується сортів Міандр та Каменяр, то вони також значно різняться за спектрами фрагментів ДНК, як і у випадку використання ТВР та SSR-маркерів. Оскільки розроблені праймери є виродженими та універсальними, то, не виключено, що вони працюватимуть і на інших видах рослин.

У зв'язку з цим розроблену пару праймерів було застосовано для дослідження поліморфізму інтронів генів γ -тубуліну в організмів, для яких ще невідома екзон-інтронна структура цих генів (див. Рис. 21(б)). Для прикладу досліджено три сільськогосподарські культури — картоплю, рис та пшеницю. Для *S. tuberosum* характерне утворення одного та двох фрагментів ДНК: приблизно 800 і 910 п.н. (сорт Левада) та лише 910 п.н. (сорт Світанок). У всіх досліджених сортів *O. sativa* виявлено чіткий фрагмент ДНК завдовжки приблизно 895 п.н. та два менш яскравих — 505 п.н. (сорт Преміум) і 560 п.н. (сорт Консул). Результати електрофоретичного аналізу зразків *T. aestivum* свідчать про наявність фрагментів ДНК у діапазоні від 500 до 1000 п.н. Отже, запропонований метод, що базується на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну, дає змогу однозначно розрізняти різні види рослин і навіть досліджувати їх генетичний поліморфізм на рівні генотипів (сортів) на основі отриманих електрофоретичних профілів. Розроблена пара вироджених праймерів може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу рослин без наявності попередньої інформації про екзон-інтронну структуру їх генів γ -тубуліну.

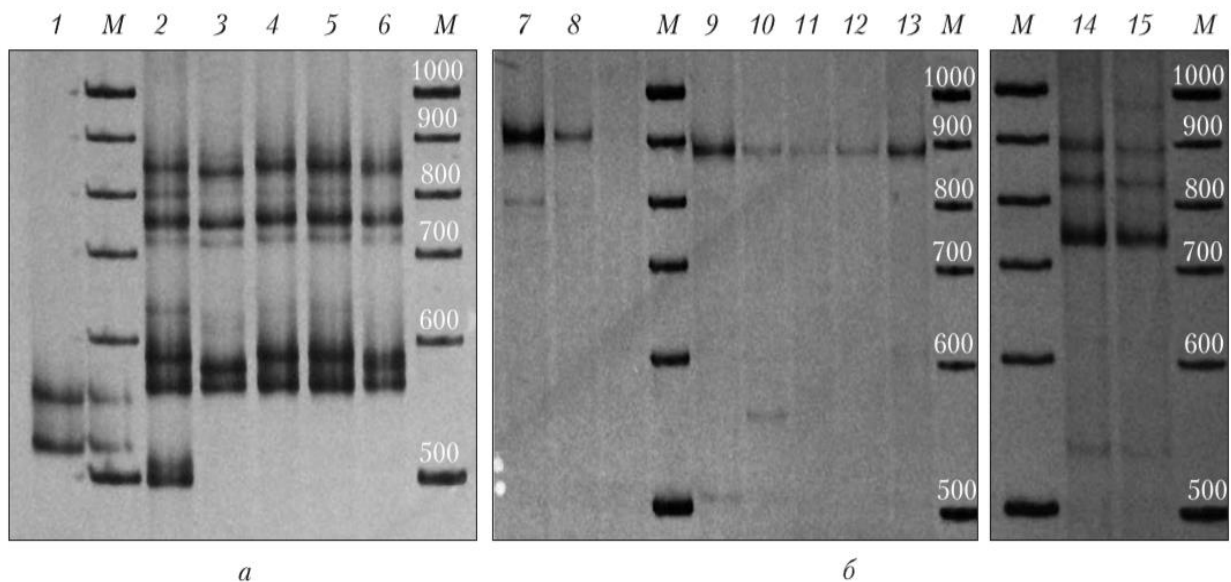


Рис. 21. Електрофореграма з ампліконами, що містять інтрони генів γ -тубуліну: а – рослини, на основі нуклеотидної послідовності генів γ -тубуліну яких були розроблені вироджені праймери: 1 - *A. thaliana*, 2-6 - *L. usitatissimum* (сортів 'Глобус', 'Міандр', 'Вручий', 'Журавка', 'Каменярь'); б - рослини, нуклеотидна послідовність генів γ -тубуліну яких невідома: 7, 8 - *S. tuberosum* (сортів 'Левада', 'Світанок'), 9-13 - *O. sativa* (сортів 'Преміум', 'Консул', 'Віконт', 'УІР-4970', 'УІР-4558'), 14, 15 - *T. aestivum* (сортів 'Елегія', 'Миронівська 808'); М - ДНК - маркер "100bp Ladder"

Крім того, надалі можна додатково доповнити метод новими варіаціями, наприклад, підвищити виродженість праймерів, залучивши до біоінформатичного аналізу більшу кількість послідовностей гена γ -тубуліну, або, навпаки, розробити специфічні праймери для конкретного виду рослин, підвищивши за рахунок цього чутливість методу. Таким чином, запропонований метод є простим, надійним молекулярно-генетичним інструментом, який може бути ефективно застосований для фінгерпринтингу та молекулярно-генетичного аналізу різних видів та сортів рослин як у поєднанні з іншими маркерними системами, так і самостійно.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень доведено, що ДНК-маркерні системи, засновані на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів α -, β -, γ -тубуліну та актину, є ефективним та добре відтворюваним інструментом для молекулярно-генетичного аналізу та дослідження генетичної мінливості рослин. Продемонстрована доцільність використання методу оцінки поліморфізму інтронів генів цих цитоскелетних білків для проведення генотипної диференціації, ідентифікації, а також для дослідження генетичного різноманіття рослин на внутрішньосортовому, міжсортівному, популяційному, видовому та міжвидовому рівнях.

1. За результатами аналізу екзон-інтронної структури анотованих послідовностей генів α -, β - та γ -тубуліну та актину *A. thaliana* та гомологів цих генів в геномах інших видів вищих рослин встановлено закономірності екзон-інтронної

структури генів цих білків. Кількість інтронів для генів актину складає переважно 3-4, для генів β -тубуліну - переважно 2, α -тубуліну – 3-4, а для γ -тубуліну – 9-10. Окрім того, отриманні дані вказують на те, що в геномах рослин саме за рахунок складу та довжини інтронів підвищується варіабельність нуклеотидних послідовностей генів як в межах одного виду, так і при міжвидовому порівнянні.

2. Гомологи генів α -, β -, γ -тубуліну та актину у різних видів рослин мають консенсусні послідовності консервативних ділянок екзонів, які були використані для дизайну видоспецифічних та універсальних вироджених праймерів з метою визначення поліморфізму довжини інтронів вище зазначених генів у різних видів рослин. Розміри утворюваних під час ПЛР з розробленими праймерами фрагментів співпадали з теоретично розрахованими.

3. Продемонстровано високий ступінь диференціюючої здатності ТВР-аналізу на генотипах та видах роду *Eleusine*. За результатами досліджень з використанням двох українських сортів та двох соматоклональних варіантів (SE-1, SE-4) пальчастого проса (*E. coracana*), отриманих від сорту Тропіканка, а також трьох генотипів гусячої трави (*E. indica*), один з яких є природною популяцією цього виду, а два інші (*E. indica* 4A-21, *E. indica* 4A-1) є стійкими до дії динітроанілінових гербіцидів, встановлено чіткі генетичні відмінності як між різними видами, так і між генотипами в межах одного виду.

4. За результатами ТВР-аналізу, а також аналізу поліморфізму інтронів генів актину проведено генотипування кримських популяцій егілопсу (*Ae. biuncialis*) та виявлено їх генетичну гетерогенність, що свідчить про доцільність подальшого використання цих ДНК-маркерних систем для молекулярно-генетичного аналізу диких видів родини *Poaceae*. В той же час порівняння АВР-методу з ТВР-аналізом свідчить про більш високий рівень ефективності ТВР-методу для диференціації природних популяцій егілопсів.

5. За результатами аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну (сТВР, hТВР-аналіз) не встановлено значущої різниці між популяційними вибірками *D. antarctica* в Антарктиці, що вказує на низький рівень генетичного різноманіття цього виду в досліджуваному регіоні. В той же час було виявлено внутрішньопопуляційний поліморфізм за I-им інтроном генів β -тубуліну.

6. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину дозволила отримати видоспецифічні ДНК-профілі досліджених сортів пшениці (*T. aestivum*), ячменю (*H. vulgare*) та рису (*O. sativa*). Вдалося диференціювати між собою сорти пшениці та ячміню, а їх внутрішньосортові вибірки охарактеризовано як генетично гетерогенні. В той же час сорти рису виявилися генетично однорідними за результатами аналізу поліморфізму інтронів генів актину. Таким чином, оцінка поліморфізму інтронів генів β -тубуліну та актину в цілому може бути використана як інструмент для генотипування та диференціації злакових культур.

7. ТВР/сТВР-аналіз та аналіз поліморфізму інтронів генів актину виявилися ефективними інструментами для фінгерпринтингу сортів та сортозразків *C. sativa* української селекції. Більшість генотипів *C. sativa* були чітко диференційовані між собою, маючи свій власний унікальний ДНК-профіль.

8. Результати ТВР-аналізу сортів *L. usitatissimum* свідчать про те, що всі досліджені зразки мають досить чіткі ДНК-профілі, за якими їх можна

ідентифікувати та диференціювати один від одного. На підставі аналізу ТВР- та сТВР-профілів різних видів *Linum* L. побудовано дендрограми, які демонструють схожу картину філогенії видів роду. ТВР- та АВР-аналіз дозволив диференціювати ландраси *L. usitatissimum* білоруської селекції та дослідити їх внутрішньосортову гетерогенність.

9. Аналіз 16 сортів льону (*L. usitatissimum*) української селекції виявив міжсортівий поліморфізм інтронів генів β -тубуліну та актину. Подальше дослідження українських сортів льону на внутрішньосортовому рівні за допомогою ТВР-, АВР- та SSR-маркерів виявило, що більшість сортів льону української селекції є генетично гетерогенними. Лише тільки два сорти, 'Сіверський' та 'Глазур', селекції Інституту луб'яних культур НААН України, виявилися гомогенними, всі інші сорти мали поліморфізм хоча б за одним видом маркерів. Продемонстрована досить висока ефективність використання ІЛР-аналізу для диференціації генотипів льону в порівнянні з SSR-маркерами.

10. За допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину та α -тубуліну генотиповано сорти томату (*S. lycopersicum*) та картоплі (*S. tuberosum*), отримано специфічні ДНК-профілі досліджених сортів. Більш поліморфною виявилася вибірка сортів картоплі, в той час як сорти томату мали значну генетичну спорідненість.

11. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у видів деревних рослин дозволяє чітко диференціювати види одного роду між собою та отримувати інформацію про внутрішньовидовий поліморфізм цих рослин.

12. У дерев ранньої фенологічної форми (*Q. robur* var. *praecox*) виявлено 9 унікальних алелів за мікросателітними локусами (quru-GA-1C08: 266, 282, 284, 286; quru-GA-0C19: 219, 228; QPZAG9: 180, 194, 212) та 4 фрагменти за ТВР-маркерами (з приблизним розміром 310 п.н., 400 п.н., 405 п.н., 480 п.н.), а у *Q. robur* var. *tardiflora* – 5 унікальних алелей за мікросателітними локусами (quru-GA-1C08: 262, 268; quru-GA-0C19: 323, 258; QPZAG9: 206) та 5 фрагментів за ТВР-маркерами (з приблизним розміром 425 п.н., 440 п.н., 445 п.н., 515 п.н. та 1330 п.н.). Охарактеризовано відмінності за частотою преобладаючих алелів quru-GA-0C19-222 (практично відсутній у вибірці пізньої фенологічної форми) та quru-GA-0C19-226 (частота сягає більше 80% у ранньої фенологічної форми і лише біля 50% у пізньої). Виявлений поліморфізм фенологічних форм *Q. robur* var. *praecox* і *Q. robur* var. *tardiflora* вказує на те, що відмінності можуть бути генетично обумовлені, а різні види ДНК-маркерів використані для генетичного профілювання *Q. robur*.

13. Встановлено, що інвазивні види Степового Придніпров'я - в'яз карликовий (*U. pumila*) та в'яз корковий (*U. suberosa*) - мають чіткі генетичні відмінності за п'ятьма мікросателітними локусами (UR138, UR153, UR158, UR173b, UR101) та ТВР-маркерами. Зокрема, у в'язу коркового ці мікросателітні локуси виявилися мономорфними, а алелі UR153: 191 п.н.; UR158: 177 п.н. були відсутні у *U. pumila*.

14. Продемонстровано, що *U. pumila* і *U. suberosa* у Степовому Придніпров'ї як за мікросателітними локусами, так і за ТВР-маркерами характеризуються відносно низьким рівнем генетичної мінливості. Значення показників, що характеризують генетичний поліморфізм *U. pumila* за мікросателітними локусами, варіюють в межах: $N_e = 1,635 - 1,973$, $I = 0,660 - 0,791$, $H_e = 0,354 - 0,455$, $H_o = 0,260 - 0,350$.

Наявна гетерозиготність за цим видом генетичних маркерів на всіх ділянках була значно нижчою очікуваної за рахунок надлишку гомозиготних генотипів, що опосередковано говорить про певний рівень інбредності аналізованих рослин. Низький рівень генетичної мінливості також встановлено за результатами ТВР-аналізу. У *U. pumila* виявлено амплікони довжиною від 380 п.н. до 1100 п.н. ТВР-аналіз дерев *U. suberosa* загалом виявив 10 мономорфних фрагментів. Показники, що характеризують генетичний поліморфізм *U. pumila* за ТВР-маркерами варіювали в межах: $N_e = 1,239 - 1,525$, $I = 0,252 - 0,460$, $PI_C = 0,155 - 0,395$.

15. ТВР- та сТВР-методи дозволяють якісно генотипувати різні види та штами мікроводоростей, які належать до зелених (Chlorophyta), жовто-зелених (Ochrophyta) та еугленофітових (Euglenophyta) водоростей. Специфічні ТВР- та сТВР-профілі у досліджених зразків мікроводоростей значно відрізнялися між собою за кількістю та розташуванням цільових ампліконів, що дозволило чітко диференціювати різні генотипи мікроводоростей. Окрім того, обидві маркерні системи однозначно підтвердили однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму. Отримані результати в цілому свідчать про доцільність подальшого використання даних ІЛР-маркерів для генотипування та аналізу різних таксонів водоростей.

16. ІЛР-маркерна система, яка дозволяє оцінити поліморфізм довжини І інтрону генів α -тубуліну у різних видів рослин, є універсальною і дає можливість проводити генотипування та диференціацію різних видів (сортів) рослин, поєднуючи в собі надійність та швидкість отримання вихідних даних і простоту їхнього аналізу. Вона може бути використана для молекулярно-генетичного аналізу вищих рослин як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kravets OA, **Pirko YaV**, Kalafat LO, Rabokon AM, Postovoitova AS, Bilonozhko YuO, Privalikhin SN, Lykholat YuV, Blume YaB. Genetic and reproductive state assessment of *Ulmus pumila* and *U. suberosa* invasive populations in the Dnieper steppe under climate change. Cytol. Genetics. 2020; 54 (1): 1-9. doi.org/10.3103/S0095452720010090 (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
2. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний засіб генетичного профілювання злакових (Poaceae L.). Доповіді Національної академії наук України. 2019; 2: 78-83. doi.org/10.15407/dopovidi2019.02.078 (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
3. Rabokon AM, **Pirko YV**, Demkovych AYe, Andreev IO, Parnikoza IYu, Kozeretska IA, Yu Z, Kunakh VA, Blume YB. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in *Deschampsia antarctica* E. Desv. across the western coast of the Antarctic Peninsula. Polar Science. 2019; 19: 151-154. doi.org/10.1016/j.polar. 2018.11.001 (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті)

4. Rabokon A, Demkovich A, Sozinov A, Kozub N, **Pirko Ya**, Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. Cell Biol Int. 2019; 43: 1031-1039. DOI: 10.1002/cbin.10886. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
5. Pydiura N, **Pirko Ya**, Galinousky D, Postovoitova A, Yemets A, Kilchevsky A, Blume Ya. Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterisation of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*). Cell Biol. Intl. 2019; 43: 1010-1018. DOI: 10.1002/cbin.11001. (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
6. **Пірко ЯВ**, Постовойтова АС, Рабоконь АМ, Калафат ЛО, Приваліхін СМ, Білоножко ЮО, Пірко НМ, Блюм ЯБ. Вивчення поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну як метод аналізу генетичної диференціації рослин. Укр. бот. журн. 2018; 75 (6): 576-584. doi.org/10.15407/ukrbotj75.06.576 (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
7. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як інструмент генотипування представників родини *Solanaceae*. Науковий вісник НУБП України. 2018; 287: 70-78. doi.org/10.31548/biologiya2018.287.071 (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
8. Postovoitova AS, Yotka OYu, **Pirko YaV**, Blume Ya B. Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci. Cytol. Genetics. 2018; 52 (6): 448-460. doi.org/10.3103/S0095452718060099 (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
9. **Пірко ЯВ**, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабоконь АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Кравець ОА, Алексєєва АА, Хромих НО, Лихолат ЮВ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у рослин *Ulmus pumila* L. в Степовому Придніпров'ї. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2018; 16 (1): 28-34. (Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
10. Rabokon AN, **Pirko YaV**, Demkovych AYe, Blume YaB. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. Cytol. Genetics. 2018; 52 (1): 1–10. doi.org/10.3103/S0095452718010115 (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
11. Рабоконь АМ, **Пірко ЯВ**, Калафат ЛО, Гузенко ЄВ, Богданова МВ, Сакович ВІ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів β -тубуліну у білоруських ландрас *Linum usitatissimum* L. Фактори експериментальної еволюції

- організмів. 2018; 22: 180-185. doi.org/10.7124/FEEO.v22.945 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).
12. **Пірко ЯВ**, Нецветов МВ, Калафат ЛО, Пірко НМ, Рабоконь АМ, Приваліхін СМ, Демкович АЄ, Білоножко ЮО, Блюм ЯБ. Генетичні особливості фенологічних форм *Quercus robur* (Fagaceae) за даними аналізу поліморфізму нітронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів. Укр. бот. журн. 2018; 75 (5): 489-500. doi.org/10.15407/ukrbotj75.05.489 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).
 13. **Pirko YaV**, Demkovich A E, Kalafat LO, Blume YaB, Lykholat OA. Studying the genetic structure of *Quercus robur* forest stands on anthropogenically transformed territories using introns of the β -tubulin gene. Biosystems Diversity. 2018; 26 (4): 269-275. doi.org/10.15421/011841 (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).
 14. **Пірко ЯВ**, Буй ДД, Постовойтова АС, Рабоконь АМ, Калафат ЛО, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів γ -тубуліну як новий підхід до генотипування рослин. Доповіді Нац. акад. наук України. 2018; 12: 87-92. doi.org/10.15407/dopovidi2018.12.087. (*Особистий внесок здобувача: планування роботи, участь у опрацюванні отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).
 15. Калафат ЛО, Пірко НМ, Демкович АЄ, Приваліхін СМ, Рабоконь АМ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Оцінка генетичної різноманітності різних видів деревних рослин за допомогою поліморфізму інтронів генів β -тубуліну. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекц. 2017; 15 (2): 159-166. doi.org/10.7124/visnyk.utgis.15.2.874 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).
 16. Рабоконь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Андреев ІО, Парнікоза ІЮ, Козерецька ІА, Кунах ВА, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у *Deschampsia antarctica* Desv. з морської Антарктики. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017; 20: 104-108. doi.org/10.7124/FEEO.v20.743 (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).
 17. Рабоконь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2016; 19: 43-46. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті*).
 18. Pirko NN, Demkovich AYe, Kalafat LO, Privalikhin SN, Rabokon AN, **Pirko YaV**, Blume YaB. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in different representatives of Pinaceae Lindl. family. J. Botany (Revista Botanică). 2016; 8 (2): 5-9. (*Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту,*

опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).

19. Рабокoнь АН, **Пірко ЯВ**, Демкович АЕ, Блюм ЯБ. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений. Молекулярная и прикладная генетика (Минск). 2015; 19: 35-44. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
20. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2015; 17: 82–86. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
21. Постовойтова АС, Баєр ГЯ, Пидюра МО, Пастухова НЛ, **Пірко ЯВ**, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Пошук та аналіз послідовностей генів актину в геномі льону. Наукові доповіді НУБіП. 2015; 8 (57) http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/14.pdf (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
22. Рабокoнь АН, Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Анализ гомологов генов основных белков цитоскелета у различных видов высших растений. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014; 14: 76–78. (Особистий внесок здобувача: планування та проведення експерименту, опрацювання отриманих даних; разом зі співавторами – аналіз результатів, написання статті).
23. **Пірко ЯВ**. Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліна. Промышленная ботаника. 2011; 11: 152-156.
24. Рабокoнь АМ, Білоножко ЮО, Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Генетичне профілювання видів деревних рослин за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну. Мат-ли міжн. наук. конф-ції «Проблеми уникнення втрат біорізноманіття Українських Карпат». (14-15 травня 2020, Львів), 2020. с.30-33.
25. **Pirko Ya**, Buy D, Rabokon A, Postovoitova A, Kalafat L, Blume Ya. Genomic fingerprinting of *Linum usitatissimum* L. cultivars using intron length polymorphism of γ -tubulin. 4th Int. Sci. Conf. “Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health and Quality of Human and Bees Life” (11-13 Sept. 2019, Nitra, Slovakia), 2019, p.124.
26. **Pirko Ya**, Rabokon A, Postovoitova A, Kalafat L, Bilonozhko Yu, Blume Ya. Intron length polymorphism of β -tubulin and actin genes as efficient tool for *Camelina sativa* genotyping. 4th Int. Sci. Conf. “Agrobiodiversity for Improve the Nutrition, Health and Quality of Human and Bees Life” (11-13 Sept. 2019, Nitra, Slovakia), 2019. p. 125.
27. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Генотипування сортів рису посівного за допомогою оцінки поліморфізму довжини другого інтрону генів актину. Міжн. науково-практична конф-ція «Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин», (4-5 липня 2018), Харків, Україна, 2018. с. 231-232.

28. Rabokon A, **Pirko Ya**, Kalafat L, Kozub N, Sozinov I, Demkovych A, Blume Ya. The second intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis*. Abstract of the 7th Baltic Genetics Congress, 2018, October 24-27, Riga, Latvia, 2018. с. 243.
29. Рабокoнь АМ, Демкович АЄ, Йотка ОЮ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Дослідження поліморфізму довжин інтронів генів β -тубуліну у сортів льону української селекції. Третя конф-ція мол. учених «Біологія рослин та біотехнологія». 2017, 16-18 травня, Київ, Україна, 2017. с. 43.
30. Pirko NN, Kalafat LO, Demkovych AYe, Privalikhin SN, Rabokon AN, Koval OP, **Pirko YaV**, Blume YaB. Investigation of genetic variability of Fagales order by analysis of introns polymorphism of β -tubulin genes. Материали 5-ой Международной конференции-совещания «Сохранение лесных генетических ресурсов». 2017, 2-7 октября, Гомель, Беларусь, 2017. с. 172-175.
31. Постовойтова АС, Йотка ОЮ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Аналіз поліморфізму довжин інтронів генів актину у представників роду *Linum* L. Третя конф-ція мол. учених «Біологія рослин та біотехнологія». (16-18 травня 2017, Київ), 2017. с. 41.
32. Постовойтова АС, **Пірко ЯВ**, Козуб НО, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів актину як новий метод оцінки генетичної диференціації природних популяцій *Aegilops biuncialis*. Тези доп. міжн. наук. конф-ції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (12 вересня 2017, Одеса), 2017. с. 61-62.
33. Рабокoнь АН, Демкович АЄ, **Пірко ЯВ**, Богданова МВ, Сакович ВИ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у ландрас *Linum usitatissimum* L. Материали III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». 2016, 23-25 ноября, Минск, Беларусь, 2016. с. 33.
34. Blume RYa, Rabokon AN, Demkovich AYe, **Pirko YaV**, Yemets AI. Analysis of the exon-intron structure of β -tubulin genes in different plant species. Annual Meeting, 2016, Dec 3-7, San Francisco, California, USA: ASCB, 2016. P. 1177.
35. **Пірко ЯВ**, Рабокoнь АН, Постовойтова АС, Самофалова ДА, Блюм ЯБ. Аналіз гомологов генів, кодуючих актин, у різних видів вищих рослин. Матеріали III міжнар. наук. конф. студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології». 2014, 24-27 лютого, Донецьк, Україна, 2014. с. 284–285.
36. **Пірко ЯВ**, Постовойтова АС, Рабокoнь АМ, Блюм ЯБ. Аналіз екзон-интронной структури генів “домашнього господарства” у різних видів рослин. Мат-ли II-ї конф-ції мол. учених «Біологія рослин та біотехнологія» (24-25 грудня 2013, Київ), 2013. с. 34.
37. Демкович АЄ, Рабокoнь АМ, **Пірко ЯВ**, Блюм ЯБ. Прилад для вертикального гель-електрофорезу. Патент України на корисну модель № 102060. 2015, Бюл. 19.

АНОТАЦІЯ

Пірко Я.В. Поліморфізм довжини інтронів генів білків цитоскелету як ефективний інструмент генотипування рослин – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеню доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2021.

Дисертаційне дослідження присвячено розробленню та впровадженню молекулярно-генетичних маркерів, що ґрунтуються на використанні поліморфізму інтронів генів білків цитоскелету (α -, β -, γ -тубулін та актин) для генетичної диференціації та генотипування рослин. Зокрема проведено аналіз існуючих геномних баз даних рослин на наявність послідовностей генів, що кодують α -, β -, γ -тубулін та актин. Досліджено їх екзон-інтронну структуру, здійснено вирівнювання послідовностей з метою отримання консенсусних послідовностей та підбір праймерів до консервативних ділянок геномів, що оточують інтрони генів. Підбрано як видоспецифічні, так і універсальні (що можуть бути використані у дослідженні багатьох видів рослин) вироджені праймери. Оцінено поліморфізм інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину на видовому, популяційному, сортовому та внутрішньосортному рівнях у різних видів рослин. На підставі результатів аналізу поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину проведено генетичне профілювання таких господарсько цінних видів рослин, як льон-довгунець, рис посівний, пшениця, ячмінь, томат та картопля. Також завдяки оцінці поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину досліджено генетичну мінливість та диференційовано природні популяції егілопсів *Aegilops biuncialis* з Кримського півострову. Використовуючи аналіз поліморфізму інтронів генів актину та α -тубуліну генотиповано сорти томату (*Solanum lycopersicum*) та картоплі (*Solanum tuberosum*), отримано специфічні ДНК-профілі досліджених сортів. Оцінений міжсортний та внутрішньосортний поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну та актину у різних сортів льону-довгунця. Показана висока ефективність використання ІЛР-маркерів, що базуються на оцінці поліморфізму інтронів генів цитоскелетних білків у порівнянні з SSR-маркерами на прикладі аналізу родів *Linum* L., *Quercus* L., *Ulmus* L. Продемонстровано зручність та надійність застосування методу ТВР-аналізу для молекулярно-генетичного маркування трав'янистих та деревних рослин, а також для вивчення окремих аспектів внутрішньовидового поліморфізму господарчо цінних, садово-паркових та лісоутворюючих порід. За допомогою ТВР-методу ідентифіковано унікальні патерни для 20 деревних видів рослин та створено молекулярні профілі кожного з цих видів. Вперше отримано специфічні ТВР-профілі мікрородостей, які дозволили чітко диференціювати генотипи на різних таксономічних рівнях та підтвердити однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму.

Ключові слова: молекулярно-генетичні маркери, інтрон, ІЛР (intron length polymorphism), α -, β -, γ -тубулін, генетичне профілювання, генотипування

SUMMARY

Pirko Ya.V. Intron length polymorphism of cytoskeleton protein genes as an effective tool for plant genotyping – Qualification study with the rights of manuscript.

A thesis submitted to acquire the degree of Doctor of Science in Biology by speciality 03.00.22 – molecular genetics – Institute of food biotechnology and genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the development and implementation of molecular genetic markers based on the use of intron length polymorphism of genes encoding cytoskeleton proteins (α -, β -, γ -tubulin and actin) for differentiation and genotyping of plants. In particular, the analysis of existing genomic databases of plants for the presence of the gene sequences encoding α -, β -, γ -tubulin and actin was done. The exon-intron structure of the gene sequences encoding α -, β -, γ -tubulin and actin was studied, sequences alignments was performed in order to obtain consensus sequences and to do design of the primers for conserved regions of genomes surrounding gene introns. Both species-specific and universal (which can be used in the study of many plant species) degenerate primers were selected. Polymorphism of introns of α -, β -, γ -tubulin and actin genes at species, population, varietal and intra-varietal levels in different plant species was evaluated. Based on the results of the polymorphism analysis of the introns of the α -, β -, γ -tubulin and actin genes, genetic profiling of such economically valuable plant species as flax, rice, wheat, barley, tomato and potato was performed. Also, due to the evaluation of the intron length polymorphism of the β -tubulin and actin genes, genetic variability was studied and natural populations of *Aegilops biuncialis* from the Crimean Peninsula were differentiated. Using the intron length polymorphism analysis of actin and α -tubulin genes, tomato (*Solanum lycopersicum*) and potato (*Solanum tuberosum*) varieties were genotyped, and specific DNA profiles of the studied varieties were obtained. Interspecific and intravarietal of introns length polymorphism of β -tubulin and actin genes in different cultivars of flax was evaluated. The high efficiency of using ILP markers based on the assessment of intron length polymorphism of cytoskeletal protein genes in comparison with SSR markers analysis on genera *Linum* L., *Quercus* L., *Ulmus* L. was shown. The convenience and reliability of the TBP analysis for molecular genetic labeling of herbaceous and woody plants, as well as for studying certain aspects of intraspecific polymorphism of economically valuable, horticultural and forest-forming species have been demonstrated. Using the TBP method, unique patterns for 20 woody plant species were identified and molecular profiles of each of these species were created. For the first time, specific TBP profiles of microalgae were obtained, which allowed to clearly differentiate genotypes at different taxonomic levels and to confirm the homogeneity of individual samples belonging to one strain.

Key words: molecular genetic markers, intron, ILP (intron length polymorphism), α -, β -, γ -tubulin, genetic profiling, genotyping.