

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

РАБОКОНЬ АНАСТАСІЯ МИКОЛАЇВНА



УДК 575.2:577.2

**ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ У РОСЛИН ЗА
ДОПОМОГОЮ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ НА
ВНУТРІШНЬО- ТА МІЖВИДОВОМУ РІВНЯХ**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертація є рукописом

Робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович,
державна установа «Інститут харчової
біотехнології та геноміки НАН
України», завідувач відділу геноміки
та молекулярної біотехнології,
директор

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Волков Роман Анатолійович,
Інститут біології, хімії та біоресурсів
Чернівецького національного
університету імені Юрія Федьковича
МОН України, завідувач кафедри
молекулярної генетики та
біотехнології

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

Захист відбудеться «22» січня 2019 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ-123, вул. Осиповського, 2а, тел./факс: (044) 434-37-77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

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

Автореферат розіслано « 21 » грудня 2018 року.

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



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Молекулярні маркери широко застосовуються як у фундаментальних, так і в прикладних дослідженнях генетичного спрямування (Poczai et al., 2013). Разом з тим, пошук нових, більш ефективних і зручних маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу продовжує бути вкрай актуальним. Розвиток таких маркерних систем має тенденцію до переходу від оцінки анонімних ділянок геномів до визначення поліморфізму цільових послідовностей генів (Poczai et al., 2010). Зокрема, інтрони – послідовності, що безпосередньо пов'язані з конкретними функціональними генами та при цьому помірно еволюціонують, є однією із найбільш привабливих мішеней для створення нових молекулярно-генетичних маркерних систем. Крім того, відомо, що послідовності інтронів є варіабельними ділянками генів, але при цьому вони фланкуються екзонами, які є достатньо консервативними у всіх еукаріотичних організмів (Morello and Breviario, 2008). Все це вже привело до спроб використати інтрони як перспективну мішень для молекулярно-генетичного поліморфізму (Bardini et al., 2004; Breviario et al., 2007; Wei et al., 2005; Yang et al., 2007).

В силу поліморфізму довжини інтрони виявились універсальним і зручним інструментом молекулярно-генетичних досліджень у широкого спектру організмів (Bardini et al., 2004; Breviario et al., 2007; Pirko, 2011). На сьогодні маркери поліморфізму довжини інтронів успішно використовуються для побудови генетичних карт (Zhao and Wu, 2008), ідентифікації видів (Kita et al., 2016) і аналізів з генотипування (Badoni et al., 2016). Це особливо характерно для послідовностей тих ділянок геному, які містять гени, що кодують структурні білки, такі, як, наприклад, білки цитоскелету (Perumal et al., 2005; Peter, 1998). Зокрема, метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (tubulin base polymorphism, ТВР) є достатньо новим і перспективним прикладом використання молекулярно-генетичних маркерів, створених завдяки розумінню екзон-інтронної структури цих генів (Bardini et al., 2004). Оскільки цей метод все ще не є широко застосовуваним, існує потреба у перевірці його ефективності для генотипування рослин як на міжвидовому (окремі види), так і на внутрішньовидовому (популяції, сорти та генотипи) рівнях. Також важливим питанням є верифікація ефективності ТВР методу для застосування на однодольних та дводольних рослинах. Саме цим і визначається актуальність даного дисертаційного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертація виконувалась 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» (2012–16 р.р., номер держреєстрації 0112U001597), «Популяційна біологія і генетика видів деревних рослин на антропогенно трансформованих ландшафтах» (2014–17 р.р., номер держреєстрації 0112U007760) та «Створення молекулярно-генетичних маркерів для диференціації різних генотипів рослин на основі вивчення поліморфізму інтронів генів їх цитоскелетних білків» (2015–19 р.р., номер держреєстрації 0115U005025).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – розробити теоретичні та експериментальні засади використання ТВР методу для молекулярно-генетичного диференціювання рослин на між- та внутрішньовидовому рівнях.

Для досягнення поставленої мети було необхідно вирішити такі завдання:

- Диференціювати за допомогою ТВР методу на молекулярно-генетичному рівні види пальчастого проса (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) та гусячої трави (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.), їх сорти та різні генотипи.
- Диференціювати природні популяції виду *Aegilops biuncialis* L. за допомогою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну.
- Дослідити за допомогою ТВР методу молекулярно-генетичні відмінності між островними популяціями *Deschampsia antarctica* E. Desv. в Антарктиці.
- З'ясувати ефективність методу оцінки поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну для виявлення молекулярно-генетичних відмінностей у сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.) та ячменю (*Hordeum vulgare* L.).
- Проаналізувати поліморфізм довжини I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну нових українських сортів та сортозразків рижю (*Camelina sativa* (L.) Crantz.) для подальшого використання в молекулярній селекції цієї олійної культури.
- Оцінити можливість використання методу аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в генетичних дослідженнях різних видів льону.
- Дослідити ефективність застосування ТВР методу для генотипування сортів льону різного селекційного та географічного походження.
- Дослідити внутрішньосортову гетерогенність сучасних сортів льону української селекції за допомогою ТВР методу та оцінити ефективність його використання у порівнянні з SSR-методом.
- Оцінити можливість використання ТВР методу у молекулярно-генетичних дослідженнях білоруських ландрас льону.

Об'єкт дослідження: поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у різних видів рослин.

Предмет дослідження: застосування поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в молекулярно-генетичних дослідженнях рослин.

Методи дослідження. Біоінформаційні методи використовували для пошуку послідовностей генів, які кодують β -тубулін, та їх гомологів в геномних базах даних, аналізу екзон-інтронної структури генів, встановлення довжини інтронів та дизайну праймерів. Молекулярно-генетичні методи (екстракція та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофорез продуктів ампліфікації) використовували для дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Статистичні методи (визначення індексу поліморфності, побудова дендрограм, коефіцієнт подібності Нея та Лі, стандартна генетична дистанція Нея) використовували для оцінки статистичної значимості отриманих даних і для визначення ступеню подібності різних генотипів рослин.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше було оцінено можливість використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для диференціації та генотипування однодольних та дводольних рослин різних

таксономічних рівнів, а саме: видів, популяцій, сортів, сортозразків та генотипів. Встановлено, що цей метод може бути успішно використаний для генотипування як на між-, так і на внутрішньовидовому рівнях різних видів вищих рослин. Вперше за допомогою ТВР-аналізу було диференційовано сорти вітчизняної селекції таких сільськогосподарських культур як пальчасте просо (*E. coracana*), пшениця (*T. aestivum*), ячмінь (*H. vulgare*), рижій (*C. sativa*) та льон (*Linum*). Проведено дослідження диких родичів злакових сільськогосподарських рослин: виявлено молекулярно-генетичні відмінності між кримськими популяціями *Aegilops biuncialis* та відсутність поліморфізму між острівними популяціями *Deschampsia antarctica* в Антарктиці. Вперше за допомогою ТВР методу здійснено молекулярно-філогенетичний аналіз різних видів роду *Linum*.

Практичне значення отриманих результатів. Результати проведеного молекулярно-генетичного аналізу таких видів рослин, як *E. coracana*, *Ae. biuncialis*, *C. sativa*, *T. aestivum*, *H. vulgare* та *L. usitatissimum* можуть бути використані в селекційному процесі. Так, зокрема, виявлена за допомогою ТВР методу внутрішньосортова гетерогенність значної частини сортів льону української селекції може знайти подальше застосування у нових селекційних програмах цієї культури. Вже сьогодні цей метод може бути рекомендований для використання при оцінці генетичної чистоти та однорідності сортів пшениці, ячменю, рижію та льону. Розроблені методичні підходи можуть також бути застосовані в дослідженнях генетичних відмінностей між популяціями різних екогеографічних зон.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником було обрано тему наукового дослідження, сформульовано мету та основні завдання роботи, а також проведено обговорення отриманих результатів. Планування експериментів та аналіз також здійснювалось разом з науковим керівником. Технічну допомогу при виконанні експериментальної частини роботи надавали співробітники відділу популяційної генетики, які є співавторами опублікованих наукових праць. Написання огляду літератури та експериментальної частини, викладення основних положень та узагальнення дисертаційної роботи було здійснено особисто здобувачем.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації викладено та обговорено на науково-практичних конференціях: X-й Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції» (Чернівці, Україна, 2015), II-й Міжнародній науковій конференції «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» (Мінськ, Білорусь, 2015), XI-й Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції» (Одеса, Україна, 2016), XII-й Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції» (Умань, Україна, 2017), Річних зборах Американського товариства клітинної біології (Сан-Франциско, США, 2016), III-й конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (Київ, Україна, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 13 наукових робіт, з них 8 статей у наукових журналах та 4 тез у збірниках матеріалів міжнародних і всеукраїнських конференцій, отримано 1 патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, експериментальної частини,

узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який включає 162 джерела, та додатків. Дисертація викладена на 146 сторінках машинописного тексту, вона містить 35 рисунки та 15 таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **першому розділі (огляді літератури)** наведено короткий огляд сучасних методів аналізу поліморфізму ДНК. Представлені приклади молекулярних маркерів, розроблених завдяки наявності інтрон-специфічного поліморфізму ДНК. Описана одна з сучасних перспективних систем молекулярних маркерів, яка базується на поліморфізмі довжини інтронів генів родини β -тубуліну. Окремо розглянуто принцип роботи та приклади використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР метод – оцінка поліморфізму довжини I-го інтрону) та його модифікацій (сТВР метод – оцінка поліморфізму довжини II-го інтрону і hТВР метод – оцінка поліморфізму довжини I-го та II-го інтрону). Зазначається необхідність верифікації ТВР методу на рослинах, що належать до різних таксономічних одиниць, для його розширеного використання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досліджень були обрані представники однодольних з родини *Poaceae* та дводольних (з родин *Brassicaceae* та *Linaceae*), а саме сорти та соматональні варіанти пальчастого проса (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) та природні генотипи гусячої трави (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); кримські популяції егілопсу (*Aegilops biuncialis* Vis.); острівні популяції щучника антарктичного (*Deschampsia antarctica* E. Desv.); сорти пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) та ячменю (*Hordeum vulgare* L.); сорти та сортозразки рижю посівного (*Camelina sativa* (L.) Crantz.); різні види льону – льон-довгунець (*L. usitatissimum*), льон багаторічний (*L. perenne* L.), льон-кудряш (*L. humile* Mill.), льон вузьколистий (*L. angustifolium* Huds.), льон дворічний (*L. bienne* Mill.); різні сорти льону-довгунцю та білоруські ландраси льону.

Біоінформаційний аналіз екзон-інтронної структури генів β -тубуліну. Пошук передбачуваних генів β -тубуліну пшениці, ячменю та льону у базі даних Phytozome v12.1 (www.phytozome.net) було проведено за допомогою інструменту BLASTN. Відібрані послідовності використовували для візуалізації екзон-інтронної структури за допомогою програми Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). Для дизайну специфічних праймерів для оцінки поліморфізму II-го інтрону генів β -тубуліну (сТВР) *D. antarctica* спочатку за допомогою подвійного вирівнювання у програмі ClustalX 2.0.11 (Larkin et al., 2007) визначили ділянки екзонів, які належить кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (NM208297). Надалі підбирали пару специфічних праймерів для сТВР-аналізу за допомогою програми PrimerBlast (Ye et al., 2012).

ДНК виділяли з проростків досліджуваних рослин за допомогою модифікованого ЦТАБ-методу (Rogers and Bendich, 1985; Doyle JJ and Doyle JL, 1987). Якість ДНК перевіряли шляхом електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі, а її кількість спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf». ТВР-аналіз у різних модифікаціях проводили згідно методики (Bardini et al., 2004). Реакційна

суміш для ПЛР містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль $MgCl_2$, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мм кожного дНТФ, 0,5 од. Taq полімерази («Fermentas», Литва). Послідовності вироджених праймерів були запропоновані раніше (Vardini et al., 2004; Breviario et al., 2007; Braglia et al., 2010). Ампліфікацію фрагментів інтронів генів β -тубуліну проводили мінімум два рази. Для SSR-аналізу льону використовували дві пари праймерів до двох локусів, які характеризуються високим значенням індексу поліморфізму (Pali et al., 2014).

Продукти ампліфікації розділяли шляхом вертикального неденатуруючого електрофорезу в 6 %-ному ПААГ в 1xTBE-буфері. Візуалізацію фрагментів проводили шляхом фарбування нітратом срібла (Benbouza et al., 2006). Зображення аналізували за допомогою програми GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і найбільш чітких фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder). Смуги реєстрували згідно бінарної системи: присутнім фрагментам присвоювали значення одиниці, відсутнім – нуля. Коефіцієнт подібності Нея та Лі (Nei and Li, 1979) та стандартну генетичну дистанцію Нея (Nei, 1972) між генотипами визначали за допомогою програми FreeTree (Pavlicek et al., 1999) на основі наявності/відсутності ампліфікованих фрагментів у проаналізованих зразках. 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 використовували індекс поліморфного інформаційного змісту – PIC (Polymorphism Information Content), який розраховували за двома формулами:

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

де n – загальна кількість отриманих поліморфних маркерів ТВР, f_a – частота фрагментів, в яких відсутній i -й фрагмент, а f_b – частота фрагментів, в яких присутній i -й фрагмент (Hongtrakul et al., 1997; Breviario et al., 2007).

Для SSR аналізу та для ТВР аналізу у випадках, коли необхідно було порівняти ці два методи, використовували іншу формулу:

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

де p_i – частота присутності i -го алельного фенотипу у вибірці, n – загальна кількість різних алельних фенотипів (Anderson et al., 1993). Зважаючи на складність визначення частот алелей конкретного ТВР-локусу, при розрахунку PIC замість частот алелей використовували показник частоти алельних фенотипів (Kondratyuk et al., 2005).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у видів роду *Eleusine L.* Використання ТВР методу продемонструвало значну диференціюючу здатність на сортах (Тропіканка, Євгенія) та самоклональних варіантах (SE-1, SE-4, отримані від сорту Тропіканка) пальчастого проса, а також генотипах (4А-21 та 4А-1, які виникли

як результат набуття стійкості до динітроанілінових гербіцидів, та природній популяції гусячої трави). При цьому, відмінності легко помітні як між різними видами, так і між різними генотипами в межах одного виду (рис. 1А). Результати електрофоретичного аналізу свідчать про те, що під час ампліфікації інтронів генів β -тубуліну утворюються продукти довжиною від 100 до 4440 п.н. Однак більш чіткі смуги розташовуються в діапазоні від 370 до 4440 п.н. Відмінність між двома видами полягає в тому, що у *E. coracana* спостерігаються смуги 1440 п.н, 855 п.н. і 1190 п.н., а у *E. indica* – 1410 п.н., 830 п.н. і 980 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 природної популяції *E. indica* – 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. і 3640 п.н.; та є унікальні фрагменти – 370 п.н., 540 п.н. і 735 п.н.

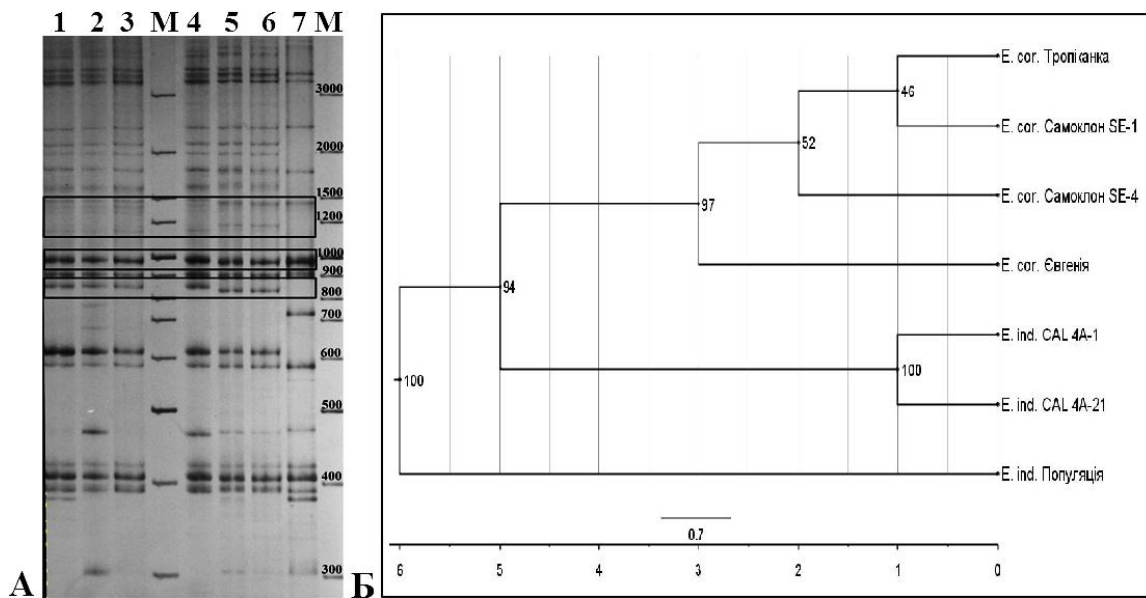


Рис. 1. А – Електрофореграма з ампліконами інтронів гена β -тубуліну *Eleusine*. Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; к – контроль; 1–7 (зверху) – номери зразків. 1–4: *E. coracana* (Тропіканка, Євгенія, соматоклональні варіанти SE-4 та SE-1), 5–7: *E. indica* (4A-21, 4A-1, природна популяція); Б – Дендрограма, побудована на основі поліморфних ТВР-фрагментів *Eleusine*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Коефіцієнт подібності Нея та Лі варіює від 0,591 (між *E. coracana* (сорт Євгенія) та природною популяцією *E. indica*) до 1 (між двома генотипами *E. indica* 4A-21, 4A-1). Стандартна генетична дистанція Нея мінімальна (0) між двома генотипами *E. indica* (4A-21 та 4A-1), а максимальна між *E. coracana* (сорт Євгенія) та природною популяцією *E. indica* – 0,487.

Дані фінгерпринтингу за першим інтроном були використані для кластерного аналізу за допомогою методу UPGMA (рис. 1Б). З побудованої дендрограми видно, що всі зразки відокремлюються один від одного, групуючись при цьому в два кластери: один кластер містить зразки пальчастого проса, а другий – гусячої трави.

До того ж, у межах кожного кластера спостерігається розподіл зразків у відповідності до їх генотипової приналежності. Отримані результати збігаються з аналогічними, отриманими за допомогою ISSR-аналізу та підтверджуються роботами з фізіолого-біохімічної характеристики досліджених зразків (Баер и др., 2007; Баер и др., 2009; Рахметов та ін., 2008).

Таким чином, отримані дані свідчать на користь того, що ТВР метод може бути успішно застосований для молекулярно-генетичних досліджень рослин роду *Елевсина*, в тому числі для маркування генотипів.

Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у егілопсу. Кримські популяції *Ae. biuncialis*, який є найближчим родичем пшениці і являє собою природний резервуар корисних ознак для її генетичного поліпшення, були використані для перевірки можливості використання ТВР методу та його модифікацій (сТВР та hТВР) для генотипування на внутрішньовидовому рівні.

Результати проведеного ТВР-аналізу у *Ae. biuncialis* дозволили виявити амплікони довжиною приблизно від 395 п.н. до 3900 п.н. (рис. 2А). При цьому більш чіткі, відтворювані смуги візуалізуються в 4 діапазонах 395–433 п.н., 673–706 п.н., 843–907 п.н. та 1764–3900 п.н. У діапазоні 1000–1700 п.н. спостерігаються досить нечіткі смуги, характерні для ПЛР-продуктів неповної ампліфікації, тому вони були виключені з аналізу. Всього було виявлено 27 смуг, 6 з яких виявились мономорфними для всіх 15 зразків *Ae. biuncialis*. Отже, всього було виявлено 21 поліморфний фрагмент ДНК. Середнє значення РС (за формулою 1) складає 0,320. Коефіцієнт Нея і Лі коливається від мінімуму 0,2 у зразках НК_010 та НК_V1-1 до максимуму 1.

За результатами аналізу поліморфізму довжини II-го інтрону генів β -тубуліну (сТВР-аналіз) досліджуваних зразків *Ae. biuncialis* було виявлено 42 відтворюваних чітких фрагменти в діапазоні 395–2880 п.н., 29 з яких виявились поліморфними (рис. 2Б). Середнє значення РС становить 0,231, що є дещо нижчим від значень РС, отриманих за допомогою ТВР-аналізу. Це пояснюється тим, що при сТВР-аналізі утворюється значно більше фрагментів (42), як поліморфних так і мономорфних. Коефіцієнт подібності Нея та Лі має максимальне значення – 1 (між зразками НК_11-2, НК_13-1, НК_OZ-2 та НК_10-3). Мінімальне значення коефіцієнта – 0,6 – спостерігається між двома зразками НК_V1-1 та НК_02.

За допомогою аналізу поліморфізму довжини I-го разом із II-им інтроном генів β -тубуліну (hТВР-аналіз) зразків кримських популяцій *Ae. biuncialis* було виявлено 24 відтворювані чіткі смуги в діапазонах 473–538 п.н., 657–693 п.н., 1168–1430 п.н. та 2313–3340 п.н., 21 з яких були поліморфними (рис. 2В). Характерно, що у всіх зразків наявна лише 1 мономорфна смуга в районі 1244 п.н. У зразків НК_V1-1, НК_11-2 і НК_OZ-2 спостерігається чітка смуга довжиною 486 п.н. Однак її відтворюваність складала лише 50%, тому вона була виключена з аналізу. Коефіцієнти Нея і Лі варіюють від 0,111 у зразків НК_V1-1 і НК_MM7-3, НК_50 і НК_4N2, НК_4N2 і НК_14-12 до 1 у зразків НК_11-2 та НК_OZ-2, НК_50 та НК_14-12. Значення РС (за формулою 1) складає 0,309.

Дані фінгерпринтенгу за всіма варіантами методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну були використані для кластерного аналізу за допомогою методу UPGMA. Характер кластеризації зразків *Ae. biuncialis* на

дендрограмах, що базуються на поліморфізмі I-го (ТВР-аналіз) та II-го інтронів (сТВР-аналіз), а також їх комбінації (hТВР-аналіз), відрізняється. Разом з тим групи зразків, що мають найбільшу бутстреп-підтримку, зберігаються. Відмінності дендрограм можуть бути наслідком особливостей розділення фрагментів за допомогою ПААГ, а також того, що амплікони розміром вище 1500 п.н. можуть погано розділятися. Загалом за допомогою методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну вдалось диференціювати всі зразки кримських популяцій *Ae. biuncialis*. Ті, які не розрізнялися за першим інтроном, відрізнялися за довжиною другого інтрону, або за їх комбінацією. При цьому усі варіанти методу поєднують надійність та швидкість отримання вихідних даних та простоту їх аналізу.

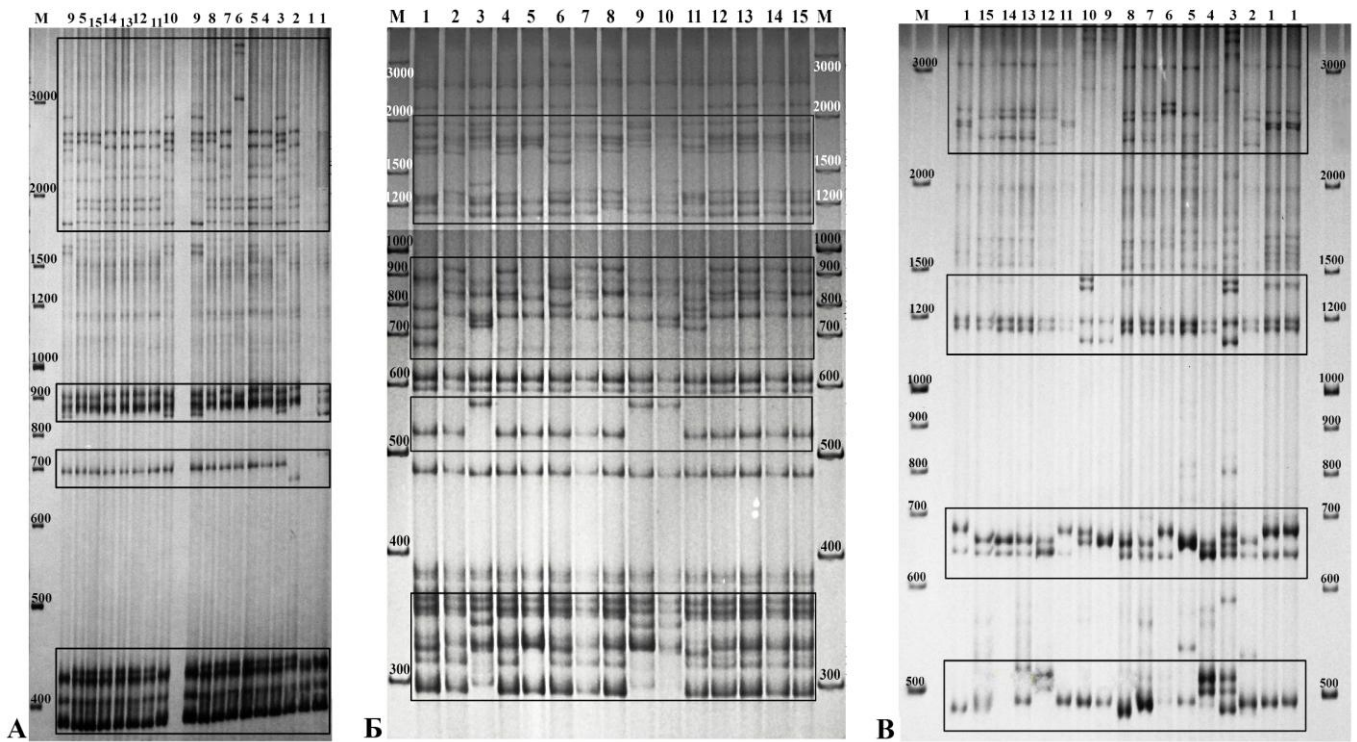


Рис. 2. Електрофореграма з ампліконами інтронів гена β -тубуліну кримських популяцій *Ae. biuncialis*. **А** – ТВР-аналіз; **Б** – сТВР-аналіз; **В** – hТВР-аналіз. Прямокутниками позначені поліморфні зони; М – маркер; 1–15 (зверху) - номери зразків – NK_02, NK_010, NK_V1-1, NK_11-2, NK_MM7-3, NK_MMB-1, NK_13-1, NK_50, NK_6-2, NK_4N2, NK_1-I, NK_OZ-2, NK_10-3, NK_MM2-1, NK_14-12.

Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у острівних популяцій *D. antarctica* з морської Антарктики. Дослідження можливого генетичного розмежування між острівними антарктичними популяціями щучника антарктичного є надзвичайно важливим з точки зору його унікального адаптаційного потенціалу до умов цього регіону. Для оцінки поліморфізму довжини II-го інтрону генів β -тубуліну у *D. antarctica* нами була розроблена пара специфічних праймерів з урахуванням інформації, яка міститься у геномних базах даних.

За результатами застосування всіх варіантів методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР, сТВР, сТВР зі специфічними праймерами і hТВР) отримано певну кількість фрагментів та різні діапазони варіювання їх

довжини. Для ТВР методу – це 12 чітких та відтворюваних фрагментів у діапазоні від 370 до 1300 п.н.; для сТВР з використанням вироджених праймерів – 17 фрагментів від 320 до 1750 п.н.; для сТВР із специфічними праймерами – 8 фрагментів довжиною 345 – 1180 п.н.; для hТВР – 6 фрагментів довжиною від 1100 до 1700 п.н. В цілому отримані результати електрофоретичного аналізу свідчать про те, що всі використані методи аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну не виявили жодної різниці між зразками острівних популяцій *D. antarctica* (рис. 3). Відсутність поліморфізму інтронів генів β -тубуліну у вибірках *D. antarctica* з двох віддалених майже на 450 км районів морської Антарктики свідчить про низький рівень їх генетичного поліморфізму. Подібні дані були отримані раніше за допомогою інших методів молекулярно-генетичного аналізу (Chwedorzewska et al., 2008; van de Wouw et al., 2008).

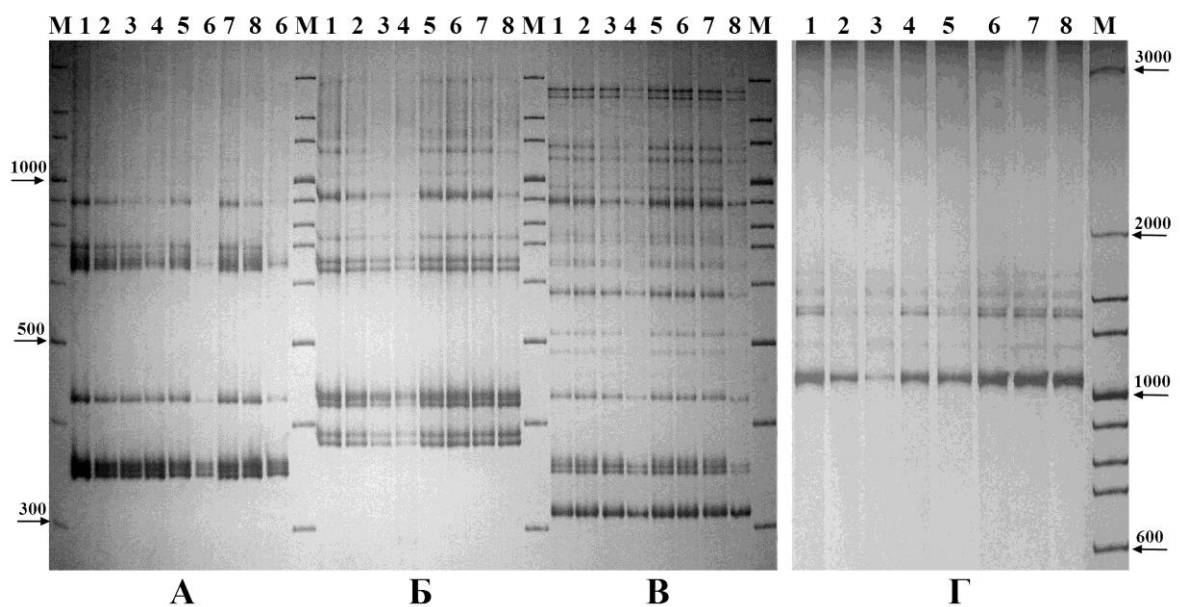


Рис. 3. Електрофореграми ампліконів інтронів генів β -тубуліну *D. antarctica* з острівних популяцій. **А** – с-ТВР зі специфічними праймерами; **Б** – ТВР з виродженими праймерами; **В** – с-ТВР з виродженими праймерами; **Г** – h-ТВР. Місця збору рослин: 1 – о. Галіндез; 2 – о. Скуа; 3 – о. Ялур; 4 – о. Расмуссен; 5 – о. Дарбо; 6-7 – о. Кінг-Джордж (окол. ст. Арцтовський), 8 – о. Кінг-Джордж, півострів Келлера (околиці ст. Ферраз), М – ДНК-маркер.

Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів пшениці та ячменю. Для повноцінної перевірки ефективності ТВР методу для диференціації сортів однодольних було проведено серію експериментів із залученням різних сортів пшениці та ячменю. З цією метою було здійснено біоінформаційний пошук послідовностей генів β -тубуліну даних злаків та аналіз їх екзон-інтронної структури. За допомогою інструменту BLASTN в базі даних Phytozome v12.1 у геномі пшениці було відібрано 13 послідовностей, які відносяться до генів β -тубуліну (рис. 4), та 7 – у геномі ячменю (рис. 5). Було встановлено, що ці ймовірні послідовності генів β -тубуліну складаються з 3 консервативних екзонів та 2 варіабельних інтронів. Довжина першого інтрону варіює від 93 п.н. до 2165 п.н. у

пшениці, та від 92 п.н. до 1699 п.н. у ячменю. Довжина другого інтрону дещо менша та варіює від 72 п.н. до 898 п.н. у пшениці, та від 74 п.н. до 928 п.н. у ячменю.

Результати проведеного електрофоретичного аналізу свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються фрагменти ДНК довжиною приблизно від 94 п.н. до 3000 п.н. у пшениці, та від 97 п.н. до 1500 п.н. у ячменю. При цьому більша частина чітких та поліморфних смуг у ячменю візуалізується в діапазоні 300–1500 п.н. (рис. 6), а у пшениці – 300–3000 п.н. (рис. 7). Діапазон отриманих фрагментів збігається з передбачуваними, адже відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона з ділянками екзонів. Однак не можна виключати ймовірності утворення високомолекулярних гомо- та/або гетеродимерів. Всім відтворюваним смугам, що відповідали ампліконам певної довжини, були присвоєні номери. Загалом у пшениці було виявлено 44 поліморфних фрагментів інтронів генів β -тубуліну, а у ячменю – 20. Велика кількість ампліконів у пшениці пояснюється тим, що вона має аллогексаплоїдний геном, тому більшість генів м'якої пшениці наявні в її геномі у вигляді гомеологічних копій (Сулкарнаева и др., 2017).

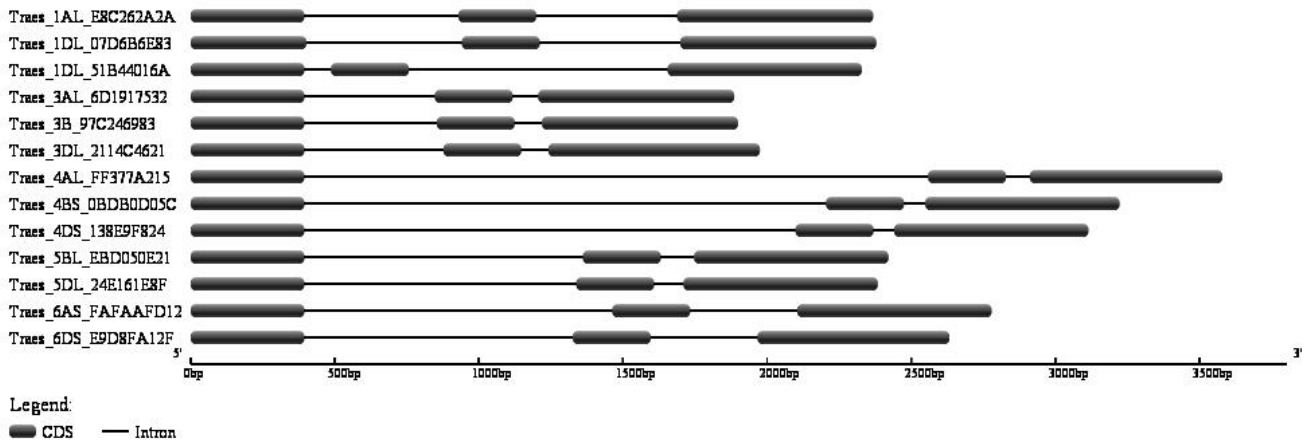


Рис. 4. Екзон-інтронна структура ймовірних 13 генів β -тубуліну у пшениці.

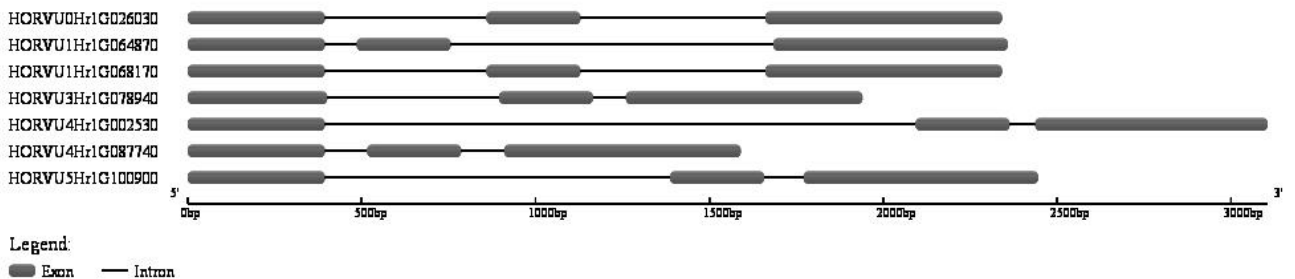


Рис. 5. Екзон-інтронна структура ймовірних 7 генів β -тубуліну у ячменю.

Крім того, отримані ТВР-профілі *T. aestivum* чітко відрізняються від аналогічних ТВР-профілів для *Ae. biuncialis*, але при цьому мають частину загальних ампліконів, що доводить спорідненість пшениці та егілопсу та при цьому дозволяє їх розрізнити і може надалі бути корисним у підтримці програм селекції чужорідних

інтрогресій. Таким чином, за допомогою ТВР методу вперше вдалося доволі чітко виявити міжсортовий поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у злаків.

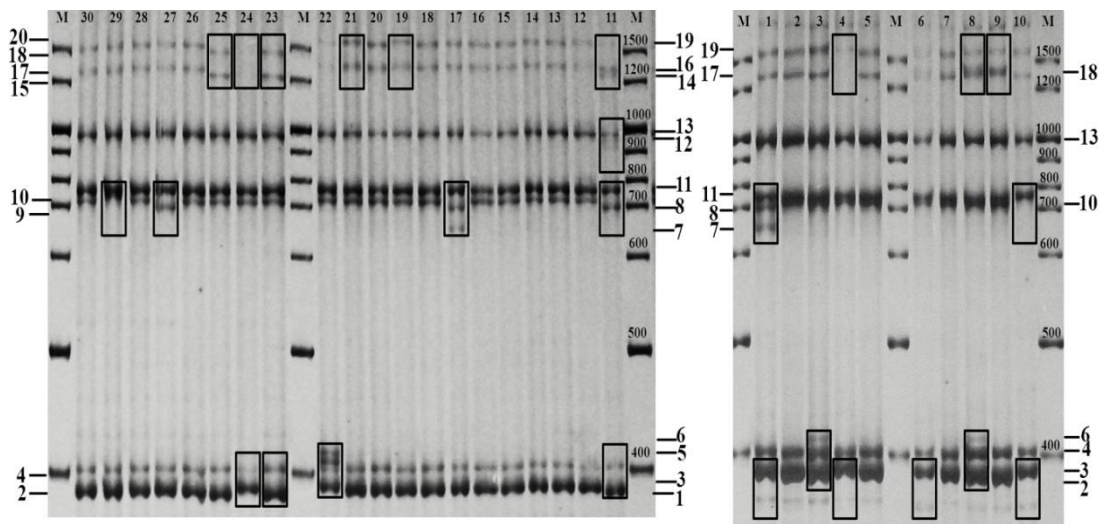


Рис. 6. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну сортів ячменю (інтервал 300–1500 п.н.), отриманими за допомогою ТВР методу. Прямокутниками позначені поліморфні зони; М – маркер; 1–30 (зверху) – номери сортів; 1–20 (з боків рисунку) – номери смуг.

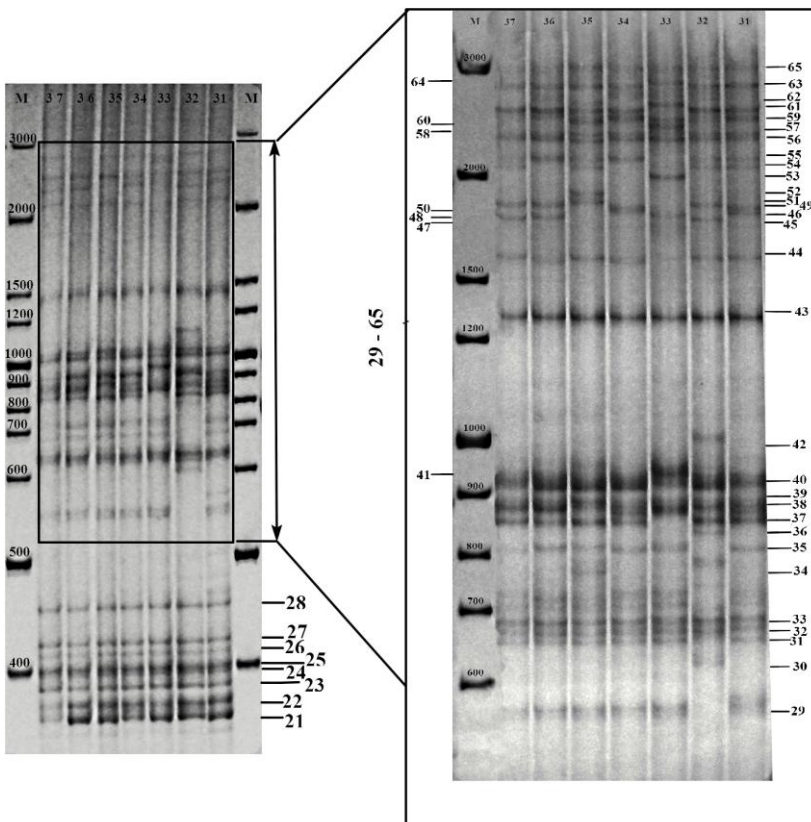


Рис. 7. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну сортів пшениці (інтервал 300–3000 п.н.), отриманими за допомогою ТВР методу. Праворуч – збільшена поліморфна зона 600–3000 п.н.; м – маркер; 31–37 (у верхній частині рисунку) – досліджені сорти; 21–65 (з боків рисунку) – номери смуг.

Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у рижю. Нами було проведено аналіз поліморфізму довжини I-го (ТВР) та II-го (сТВР) інтронів генів β -тубуліну вітчизняних сортів та сортозразків рижю посівного. Із отриманих електрофореграм видно, що при проведенні ТВР-аналізу (рис. 8А) всі смуги

знаходяться в діапазоні 295–3200 п.н., при сТВР-аналізі (рис. 8Б) чіткі фрагменти ДНК знаходяться в межах 350–1990 п.н. В обох випадках у *C. sativa* утворюється велика кількість продуктів ампліфікації (близько 50). Це можна пояснити тим, що рижій є поліплоїдною рослиною. При цьому значна частина смуг є мономорфною.

Що стосується аналізу поліморфізму I-го інтрону генів β -тубуліну, то всього детектується 7 поліморфних смуг довжиною 295 п.н., 370 п.н., 375 п.н., 650 п.н., 660 п.н., 1085 п.н. і 1110 п.н, більшість з яких є типовою для невеликої кількості зразків. Так, лише для зразків ФЕОРЖЯФ-5 і ФЕОРЖЯФ-ЧП характерні амплікони довжиною 370 п.н., у інших зразків утворюються амплікони в 375 п.н. У 4 з 12 досліджених сортозразків спостерігається смуга 660 п.н, у решти восьми – 650 п.н. Смуга 1085 п.н. є тільки у сорту Міраж. У більшості зразків значення коефіцієнта подібності Нея та Лі варіює від 0 (між зразками ФЕОРЖЯФ-5 – Міраж та ФЕОРЖЯФ-ЧП – Міраж) до 1. Генетична дистанція Нея має значення від 0 до 1,242. Щодо сТВР-аналізу, то всього детектовано 6 поліморфних фрагментів довжиною у 515 п.н., 520 п.н., 525 п.н., 550 п.н., 995 п.н. та 1015 п.н. Значення коефіцієнта подібності Нея та Лі варіює від 0 до 1, а генетичної дистанції Нея – від 0 до 1,099.

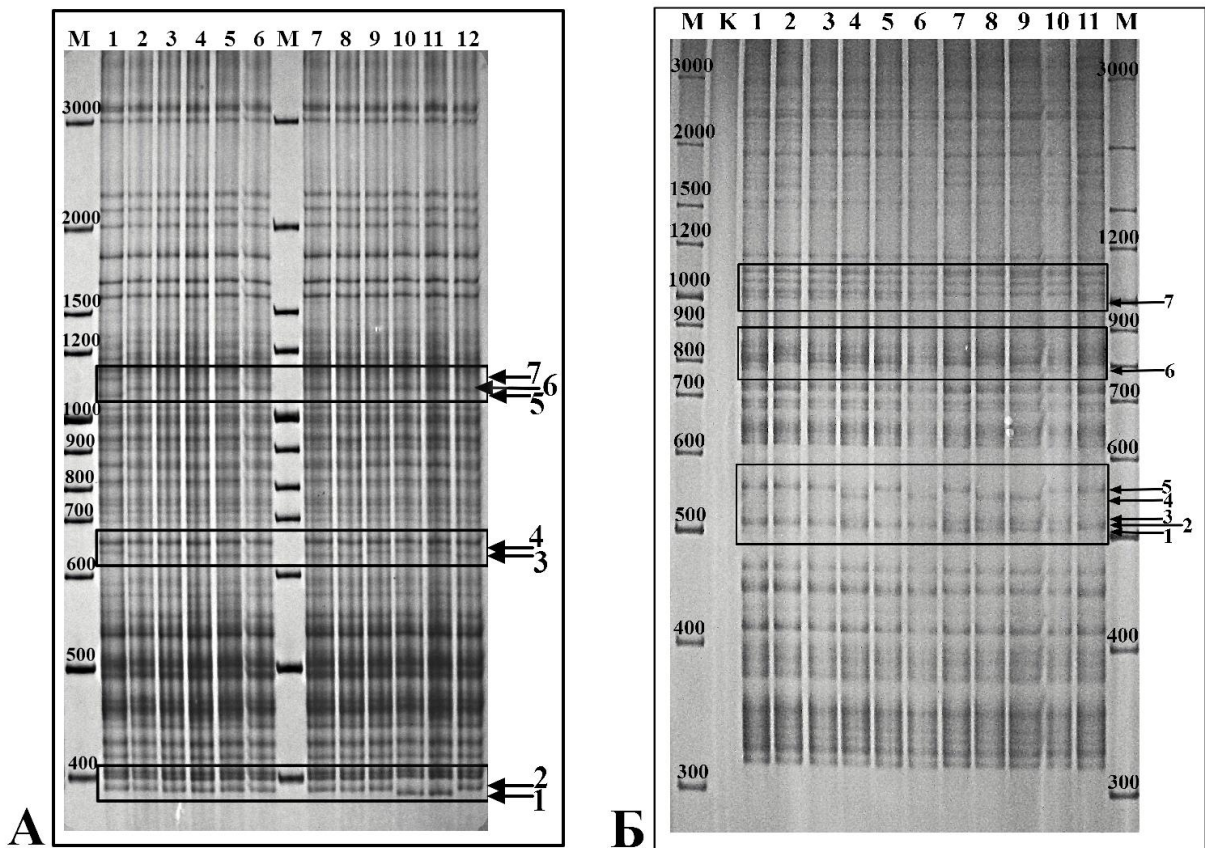


Рис. 8. Молекулярно-генетичні профілі досліджених зразків рижію. А – ТВР-аналіз (1–12: Міраж, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, Євро-12, ФЕОРЖЯФ-4, Перемога, Клондайк, ФЕОРЖЯФ-Ч, ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-ЧП, ФЕОРЖЯФ-Д); Б – сТВР-аналіз (1–11: Перемога, ФЕОРЖЯФ-ЧП, ФЕОРЖЯФ-Д, ФЕОРЖЯФ-1, Клондайк, ФЕОРЖЯФ-2, Євро-12, Міраж, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-4). Прямокутниками позначені поліморфні зони; праворуч стрілками та номерами відмічені поліморфні фрагменти ДНК; К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси.

При використанні обох видів аналізу спостерігається однакова закономірність, серед всіх зразків лише один сорт Міраж виокремлюється від інших, а такі сорти, як Перемога та Клондайк, мають дуже схожий молекулярно-генетичний профіль. Важливо, що зразки ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, Євро-12, ФЕОРЖЯФ-4 ФЕОРЖЯФ-Д, які не диференціювалися за поліморфізмом довжини I-го інтрону, легко вдалося розрізнити один від одного за поліморфізмом довжини II-го інтрону. Таким чином, використавши обидва варіанти методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, які доповнюють один одного, вдалось диференціювати досліджувані сорти та сортозразки рижію.

Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у різних видів роду *Linum*. За результатами біоінформаційного аналізу екзон-інтронної структури генів β -тубуліну в базі даних Phytozome v12.1 було відібрано 10 нуклеотидних послідовностей, які відносяться до генів β -тубуліну: Lus10021094, Lus10017217, Lus10036069, Lus10026813, Lus10023348, Lus10038458, Lus10039231, Lus10027476, Lus10016448 і Lus10040712. Ці результати співпадають з раніше отриманими (Баєр та ін., 2014). Всі відібрані гени β -тубуліну також мають 2 інтрони та 3 екзони. Довжина першого інтрона варіює від 96 п.н. до 983 п.н., а другого – від 86 п.н. до 741 п.н.

Результати щодо ефективності методу оцінки поліморфізму довжини I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну на п'яти видах льону – *L. usitatissimum*, *L. perenne*, *L. humile*, *L. angustifolium* та *L. bienne* – виявляють основну зону розподілу фрагментів ДНК в діапазоні 400–1900 п.н. (рис. 9А). Всього детектовано 46 ампліфікованих фрагментів ДНК різної довжини, проте 17 з них є унікальними та зустрічаються тільки у виду *L. perenne*. При спільному розгляді зразків *L. humile* (сорти Еврика та Орфей), *L. usitatissimum*, *L. angustifolium* та *L. bienne* зафіксовано 29 різних фрагментів ДНК, з яких 16 є поліморфними з довжиною 400 п.н., 457 п.н., 460 п.н., 480 п.н., 670 п.н., 690 п.н., 795 п.н., 800 п.н., 815 п.н., 1030 п.н., 1080 п.н., 1130 п.н., 1600 п.н., 1700 п.н. і 1865 п.н. При порівнянні всіх зразків значення PIS склало 0,21 (за винятком *L. perenne*), а з урахуванням *L. perenne* – 0,323 (за формулою 1). Коефіцієнт подібності Нея та Лі коливається від мінімум 0,046 у пари зразків *L. perenne* та *L. bienne* до 0,923 у пари *L. usitatissimum* та *L. bienne*.

При проведенні сТВР-аналізу отримано чіткі фрагменти ампліфікації інтронів генів β -тубуліну, які розташовуються в межах 310–2115 п.н. (рис. 10А). Загалом виявляється 28 чітких фрагменти, 9 (330 п.н., 345 п.н., 350 п.н., 605 п.н., 675 п.н., 755 п.н., 895 п.н., 955 п.н.) з яких є унікальними лише для *L. perenne*. Один фрагмент (320 п.н.) є мономорфним для всіх, а дев'ять – для всіх зразків за виключенням *L. perenne* (310 п.н., 410 п.н., 585 п.н., 710 п.н., 790 п.н., 815 п.н., 910 п.н., 1070 п.н., 1180 п.н.). Значення PIS дещо вище ніж при використанні ТВР методу та становить 0,313 та 0,345 (за формулою 1) за виключенням зразка *L. perenne*. Коефіцієнт подібності Нея та Лі коливається від 1 між зразками *L. angustifolium* та *L. humile* (Орфей) до 0,083 між всіма зразками та *L. perenne*. А якщо виключити *L. perenne* мінімальне значення становить 0,643 між *L. humile* (Еврика) та *L. bienne*.

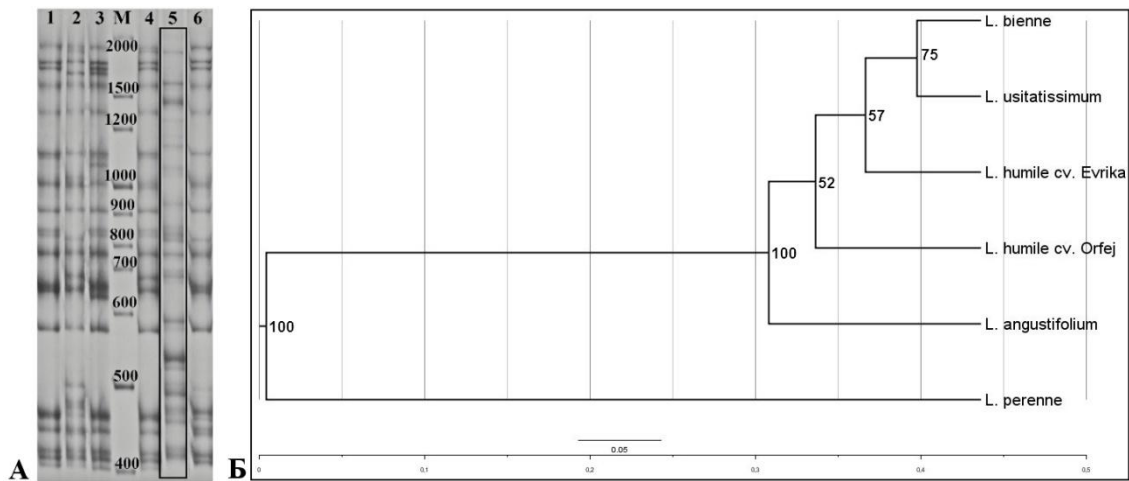


Рис. 9. А - Электрофореграма з ампліконами I-го інтрону генів β -тубуліну досліджених видів льону (ТВР аналіз); м – ДНК-маркер; 1–6 – зразки *L. bienne*, *L. angustifolium*, *L. usitatissimum*, *L. humile* cv. Еврика, *L. perenne*, *L. humile* cv. Орфей; Б – Дендрограма, побудована за результатами аналізу отриманих ТВР-профілів.

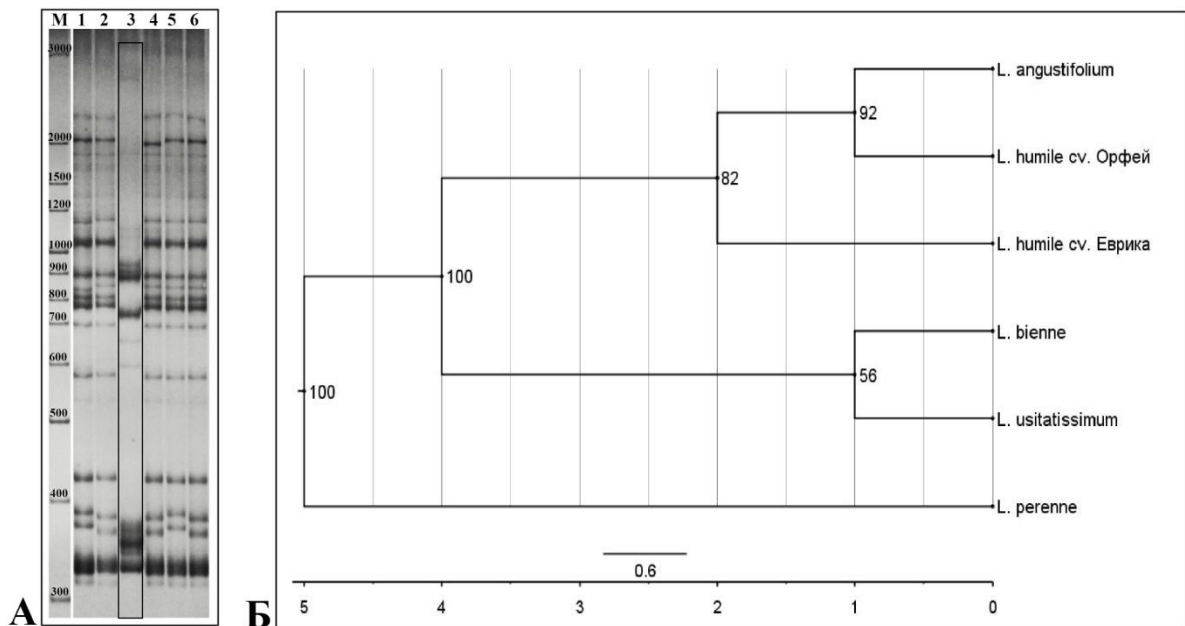


Рис. 10. А – Электрофореграма з ампліконами II-го інтрону генів β -тубуліну досліджених видів льону (сТВР-аналіз); м – ДНК-маркер; 1–6 – зразки *L. bienne*, *L. angustifolium*, *L. perenne*, *L. humile* cv. Еврика, *L. usitatissimum*, *L. humile* cv. Орфей; Б – Дендрограма, побудована за результатами отриманих сТВР-профілів.

В обох варіантах методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну утворюються фрагменти ДНК розміром понад 1000 п.н., які є відтворюваними, що дозволяє використовувати їх для диференціації сортів, хоча їх природа потребує подальшого аналізу. Можливо, вони є результатом утворення гетеро- та/або гомодуплексної ДНК під час ампліфікації (Kulibaba and Liashenko, 2016).

Дані фінгерпринтингу були використані для відображення закономірностей генетичної диференціації видів на основі кластерного аналізу методом UPGMA (рис.

9Б, рис. 10Б). З отриманих дендрограм видно, що всі зразки льону відрізняються за поліморфізмом довжини як I-го, так і II-го інтрону. Крім того, дендрограми, побудовані за результатами обох методів, виявилися подібними та вносять ясність у картину філогенії даних видів. На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що *L. angustifolium* та *L. bienne* є різними видами, та що *L. bienne*, можливо, є підвидом *L. usitatissimum*.

Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів льону різного селекційного та географічного походження. Надалі нами було проведено ТВР-аналіз 7 сортів *L. usitatissimum*, що походять з різних країн. Результати аналізу показали, що амплікони знаходяться в діапазоні 405–2820 п.н. (рис. 11А). Всього спостерігається 31 чітка смуга, 16 з яких є поліморфними. Поліморфні амплікони розташовуються в діапазонах 435–480 п.н., 665–730 п.н., 880–885 п.н., 1105 п.н. і 1595–1895 п.н. Проте коротші фрагменти ДНК (480 п.н. та 885 п.н.) були виключені з аналізу через те, що не відтворювались експериментально.

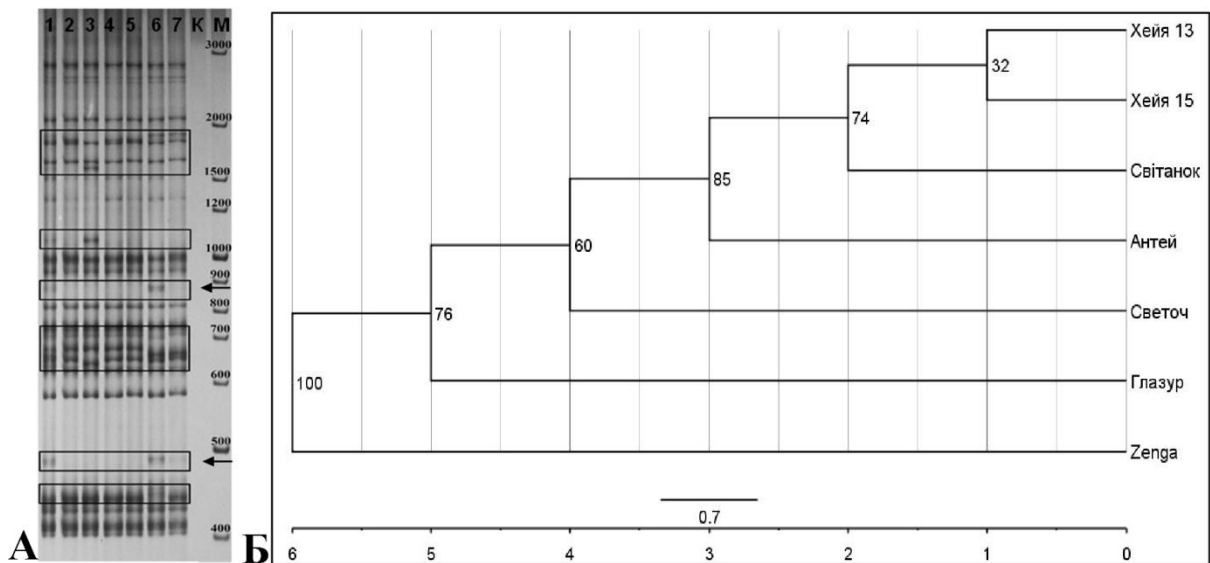


Рис. 11. А – Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну льону. Прямокутниками позначені поліморфні зони; стрілками відмічені фрагменти, виключені з аналізу; м – маркер; к – контроль; 1–7: Хейя 15 (Китай); Хейя 13 (Китай); Светоч (Росія); Світанок (Україна); Антей (Росія); Zenga (Нідерланди); Глазур (Україна); Б – Дендрограма, що побудована за результатами дослідження поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну у сортів льону. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Значення PIS становить 0,158 (за формулою 1). Таке низьке значення PIS пояснюється наявністю у зразків великої кількості мономорфних фрагментів ДНК; при їх виключенні значення PIS зростає до 0,305. Коефіцієнт подібності Нея та Лі варіює від мінімуму 0,711 (між сортами Светоч та Zenga) до максимуму 1 (між сортами Хейя 13, Хейя 15 та Світанок). Досить високі значення коефіцієнта подібності також можна пояснити великою кількістю мономорфних смуг. Значення стандартної генетичної дистанції Нея становить від 0 (між сортами Хейя 13, Zenga

та Глазур) до 0,341 (між сортами Світанок та Zenga). За результатами кластерного аналізу (рис. 11Б) всі зразки розділилися на окремі гілки, але таким чином, що сорти однієї селекції знаходяться поряд один з одним.

Отже, за допомогою TBP методу також вдалося ідентифікувати та диференціювати сорти льону, що походять з різних країн.

Порівняльний аналіз ефективності застосування поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів для генотипування сортів льону української селекції. За допомогою TBP- і SSR-аналізу було виявлено та досліджено міжсортівий та внутрішньосортівий поліморфізм льону-довгунцю. Для кожного досліджуваного сорту за допомогою TBP- і SSR-аналізу були розраховані значення PIC, встановлено наявність гетерогенності, діапазон розмірів ампліконів і кількість виявлених алельних фенотипів (табл. 1).

Результати електрофоретичного аналізу ділянок інтронів β -тубуліну свідчать про наявність чітких і відтворюваних фрагментів довжиною приблизно від 400 п.н. до 1900 п.н., що є характерним для виду. В цілому було зафіксовано 25 фрагментів різної довжини, 8 з яких виявилися поліморфними. Коефіцієнти подібності Нея та Лі знаходяться в діапазоні від 0,25 до 1 для більшості генотипів, оскільки у всіх сортів встановлено велику кількість спільних для них мономорфних смуг. Результати внутрішньосортівого TBP-аналізу свідчать про те, що 6 з 16 досліджених сортів льону є гомогенними, а 10 гетерогенними з різним рівнем поліморфізму.

Для аналізу поліморфізму досліджуваних сортів льону за допомогою SSR-аналізу було відібрано 2 пари мікросателітів – LU_1 та LU_25 з високим рівнем поліморфізму (Pali et al., 2014). При встановленні міжсортівого поліморфізму у 16 зразків льону для обох локусів коефіцієнт подібності Нея та Лі, як і очікувалося, варіює від 0 до 1. Аналіз стану 2 мікросателітних локусів показує, що сорти Глобус, Глазур та Сіверський виявилися генетично однорідними за обома локусами, а сорти Есмань, Рушничок, Глінум та Вручий лише за SSR-локусом LU_25.

Отже дані, отримані за допомогою TBP та SSR методів, свідчать про те, що більшість досліджених сортів льону української селекції є генетично неоднорідними. Це слід враховувати при створенні молекулярно-генетичних паспортів даних сортів. Також продемонстрована досить висока ефективність використання TBP-аналізу для диференціації генотипів льону в порівнянні з SSR-маркерами. При цьому у випадку використання TBP методу вдається значно скоротити час роботи, і зникає необхідність обробки великого обсягу даних.

Таблиця 1

Результати аналізу генетичного поліморфізму досліджених сортів льону української селекції

№	Назва сорту	Наявність гетерогенності, + / -			Кількість алельних фенотипів			Розмір ампліконів, п.н.			PIS		
		ssr_lu1	ssr_lu25	TBP	ssr_lu1	ssr_lu25	TBP	ssr_lu1	ssr_lu25	TBP	ssr_lu1	ssr_lu25	TBP
1	Каменяр	+	-	+	3	3	3	159-179	162-210	400-1900	0,61	0,61	0,56
2	Есмань	+	-	-	2	1	1	159-174	210	400-1900	0,44	0,00	0,00
3	Глобус	-	-	-	1	1	1	179	200	400-1900	0,00	0,00	0,00
4	Рушничок	+	-	-	2	1	1	174-179	200	400-1900	0,44	0,00	0,00
5	Глухівський ювілейний	+	+	-	3	3	1	166-179	162-210	400-1900	0,61	0,65	0,00
6	Гладіатор	+	+	+	3	3	2	159-174	162-200	400-1900	0,61	0,56	0,32
7	Надія	+	+	+	4*	4*	2	159-179	154-210	400-1900	0,67	0,64	0,32
8	Вручий	+	-	+	3	1	2	159-179	200	400-1900	0,72	0,00	0,28
9	Іванівський	+	+	+	2	2*	2	166-174	162-200	400-1900	0,44	0,28	0,32
10	Глілум	+	-	+	4	1	2	130-179	200	400-1900	0,72	0,00	0,50
11	Зоря 87	+	+	+	4*	4	2	146-174	180-225	400-1900	0,67	0,72	0,48
12	Журавка	+	+	+	3	3	3	159-179	170-213	400-1900	0,50	0,64	0,61
13	Глазур	-	-	-	1	1	1	179	200	400-1900	0,00	0,00	0,00
14	Чарівний	+	+	+	2	2	2	159-166	182-200	400-1900	0,28	0,32	0,32
15	Міандр	+	+	+	2	2	3	146-174	210-213	400-1900	0,50	0,32	0,50
16	Сіверський	-	-	-	1	1	1	174	170	400-1900	0,00	0,00	0,00
	загалом	13	8	10	8	10	6	130-179	154-225	400-1900	0,81**	0,61**	0,48**

* – виявлено гетерозиготи; ** – міжсортове значення PIS (розраховували для 16 зразків різних сортів).

Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в білоруських ландрасах льону. Вивчення ландрас може дозволити виявити генотипи, що представляють інтерес в якості донорів рідкісних алелів генів господарсько-цінних ознак. В Білорусі була створена та вже багато років підтримується досить велика колекція сортів льону. Тому нами за допомогою ТВР-аналізу було досліджено білоруські ландраси *L. usitatissimum*. За результатами аналізу встановлено, що 17 з 30 виявлених фрагментів є ідентичними для всіх вивчених ландрас, а 13 – поліморфними (435 п.н., 460 п.н., 480 п.н., 505 п.н., 645 п.н., 670 п.н., 690 п.н., 800 п.н., 1030 п.н., 1130 п.н., 1600 п.н., 1685 п.н., 1865 п.н. (рис. 12). Середнє значення РС склало 0,136 при розрахунку за формулою 1 та 0,78 – за формулою 2. В цілому використання ТВР методу дозволило диференціювати вивчені ландраси льону, що також підтверджується досить високими значеннями генетичних дистанцій між ними. При цьому зразки не групуються за якоюсь певною ознакою.

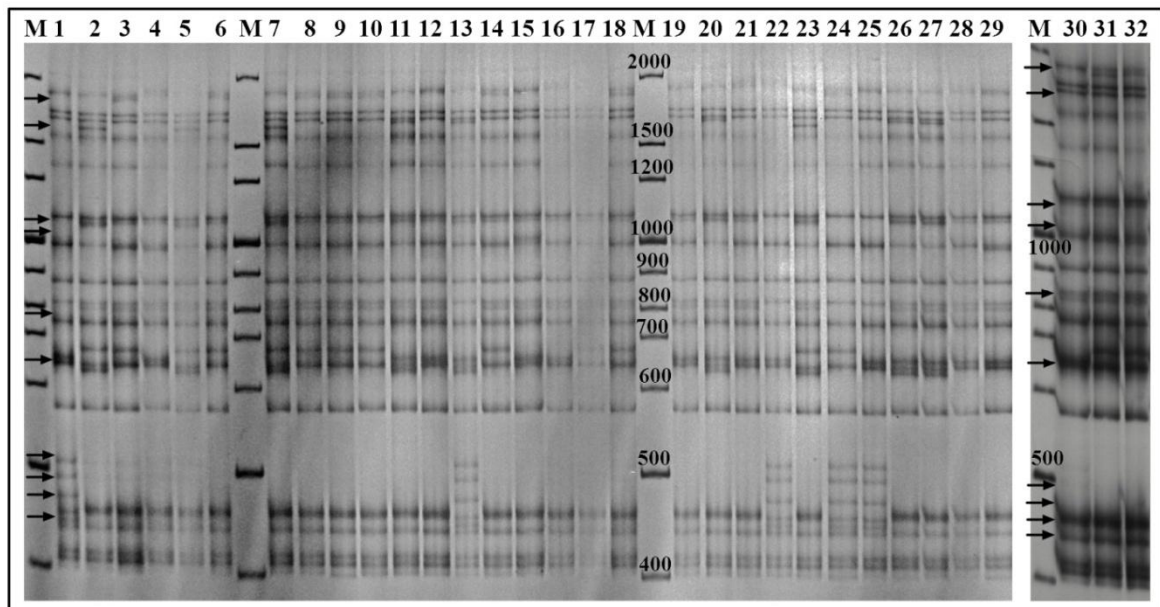


Рис. 12. Електрофореграма продуктів ампліфікації досліджених ландрас льону. Стрілками відмічені поліморфні ТВР-фрагменти; М –маркер; 1–32 (зверху) - номери зразків.

При дослідженні внутрішньосортового поліморфізму встановлено значну генетичну гетерогенність стародавніх сортів. Гомогенними виявилися лише 5 з 30 ландрас. Також було встановлено кількість алельних фенотипів та значення РС в межах кожної ландраси (за формулою 1 варіює від 0,32 до 0,72).

Загалом виявилось, що у порівнянні з сучасними сортами української селекції білоруські ландраси є більш різноманітними за поліморфізмом довжини інтронів генів β -тубуліну. Отримані дані можна пояснити тим, що при створенні сучасних сортів рослин селекціонери дотримуються правила відмінності, однорідності та стабільності сорту, а ландраси є стародавніми сортами, які зростали та еволюціонували в різних екогеографічних умовах, і тому є більш гетерогенними. Таким чином, за допомогою ТВР вдалося диференціювати ландраси льону, а також дослідити їх внутрішньосортову різноманітність.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі проаналізовано та узагальнено можливості застосування молекулярно-генетичного методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР метод – оцінка поліморфізму довжини I-го інтрону) та його модифікацій (сТВР метод – оцінка поліморфізму довжини II-го інтрону та hТВР метод – оцінка поліморфізму довжини I-го та II-го інтрону), що дозволило дослідити ефективність цього методу для молекулярно-генетичної диференціації рослин на внутрішньо- та міжвидовому рівнях. Отримані результати можуть бути використані як для фінгерпринтингу різних видів, популяцій, сортів (генотипів) та в молекулярно-генетичному аналізі рослин як загалом, так і для цілеспрямованого застосування в молекулярній селекції, що дозволяє сформулювати наступні висновки.

1. Встановлено, що за допомогою методу оцінки поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну можна досягти високого рівня генетичної диференціації таких видів роду *Eleusine* (Poaceae) як пальчасте просо (*E. coracana*) та гусяча трава (*E. indica*), а також їх окремих сортів та генотипів.
2. При дослідженні кримських популяцій егілопсу (*Aegilops biuncialis*), близького родича пшениці, за допомогою ТВР методу та його модифікацій (сТВР та hТВР методи) виявлено чіткий внутрішньовидовий поліморфізм, притаманний кожній з цих популяцій.
3. Застосування всіх можливих варіантів методу аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (методи ТВР, сТВР, сТВР зі специфічними праймерами та hТВР) дозволило встановити відсутність поліморфізму, тобто низький рівень генетичного різноманіття острівних популяцій щучника антарктичного (*Deschampsia antarctica*) з двох віддалених регіонів морської Антарктики, що підтверджується результатами інших досліджень цього виду за допомогою використання AFLP та хлоропластних маркерів.
4. Доведено високий рівень диференційної спроможності методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну при дослідженні міжсортowego поліморфізму у пшениці (*Triticum aestivum*) та ячменю (*Hordeum vulgare*), що може бути використано при розробці селекційних програм для цих видів.
5. Виявлено низький міжсортový поліморфізм при проведенні аналізу поліморфізму довжини I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну сортів та сортозразків рижю посівного (*Camelina sativa*), що є свідченням їх близької спорідненості.
6. Встановлено, що довжина інтронів генів β -тубуліну може бути джерелом надійної інформації для генетичної диференціації видів роду *Linum* (льон-довгунець *L. usitatissimum*, льон багаторічний *L. perenne*, льон-кудряш *L. humile*, льон вузьколистий *L. angustifolium*, льон дворічний *L. bienne*). У ході порівняння дендрограм, отриманих за результатами оцінки поліморфізму довжини I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну, виявлено співпадіння реконструйованих філогенетичних зв'язків та дистанцій між ними, реконструйованих за допомогою кожного з цих методів.

7. Результати аналізу поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну сортів льону-довгунцю (*L. usitatissimum*) різної селекції свідчать про те, що для всіх досліджених зразків характерні чіткі особливості TBP-профілів, за якими їх можна ідентифікувати та диференціювати один від одного.
8. За результатами аналізу 16 сортів льону української селекції виявлено міжсортівий поліморфізм довжини I-го інтрону генів β -тубуліну. У ході подальшого дослідження цих сортів льону на внутрішньосортівому рівні за допомогою TBP- та SSR-маркерів встановлено, що більшість з них є генетично неоднорідними. Продемонстрована висока ефективність використання методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для диференціації генотипів льону в порівнянні з SSR-маркерами.
9. За допомогою аналізу поліморфізму довжини I-го інтрону генів β -тубуліну проведена диференціація ландрас *L. usitatissimum* білоруського походження та досліджено їх внутрішньосортіву гетерогенність, що підтверджується досить високими значеннями генетичних дистанцій між ними.
10. Отримані результати дозволяють рекомендувати метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та його модифікації, що базуються на комбінаціях використання I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну, для молекулярно-генетичної диференціації представників як однодольних, так і дводольних рослин, а також запропонувати його для використання в молекулярно-генетичних дослідженнях інших філогенетичних груп рослин.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Рабокoнь АН**, Постовойтова АС, Пирко ЯВ, Блюм ЯБ. Анализ гомологов генов основных белков цитоскелета у различных видов высших растений. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014;14:76–78. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).
2. **Рабокoнь АН**, Пирко 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.(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).
3. **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. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).
4. **Рабокoнь 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. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

5. **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.2017.doi: 10.1002/cbin.10886. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).
6. **Рабокoнь АМ**, Демкович АЄ, Пірко ЯВ, Андрєєв Ю, 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. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).
7. **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):3–15. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).
8. **Рабокoнь 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. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).
9. Демкович АЄ, **Рабокoнь АМ**, Пірко ЯВ, Блюм ЯБ, винахідники; заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Прилад для вертикального гелелектрофорезу; Патент України на корисну модель № 102060. 2015 Жовт. 12.
10. Пірко ЯВ, Постовойтова АС, **Рабокoнь АМ**, Блюм ЯБ. Анализ экзон-интронной структуры генов “домашнего хозяйства” у различных видов растений. Матеріали ІІ конференції молодих учених. Біологія рослин та біотехнологія; 2013 груд. 24-25; Київ. Київ: ІХБГ; 2013, с. 34.
11. **Рабокoнь АН**, Демкович АЕ, Пірко ЯВ, Богданова МВ, Сакович ВІ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у ландрас *Linum usitatissimum* L. Матеріали ІІІ Международной научной конференции. Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы; 2016 ноябрь 23-25; Минск. Минск: Белорусское общество генетиков и селекционеров; 2016, с. 33.
12. Blume RY, **Rabokon AN**, Demkovich AYe, Pirko YV, 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, P1177.
13. **Рабокoнь АМ**, Демкович АЄ, Йотка ОЮ, Пірко ЯВ, Блюм ЯБ. Дослідження поліморфізму довжин інтронів генів β -тубуліну у сортів льону української селекції. Третя конференція молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія»; 2017 трав. 16–18; Київ. Київ: ДУ «ІХБГ НАН України»; 2017, с. 42.

АНОТАЦІЯ

Рабокoнь А. М. Оцінка генетичного поліморфізму у рослин за допомогою інтронів генів β -тубуліну на внутрішньо- та міжвидовому рівнях. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2018.

Здійснено системну оцінку можливості та ефективності застосування однієї з сучасних систем молекулярних маркерів, що базується на наявності інтрон-специфічного поліморфізму ДНК у родині генів β -тубулінів рослин (tubulin-based polymorphism, ТВР). Було розглянуто вже раніше набутий досвід і наведено власні приклади використання ТВР-аналізу та його модифікацій (сТВР та hТВР) при дослідженні однодольних та дводольних рослин на між- та внутрішньовидовому рівні, а саме: сортів пальчастого проса (*E. coracana*) та генотипів гусячої трави (*E. indica*), кримських популяцій егілопсу (*Ae. biuncialis*), острівних популяцій щучника антарктичного (*D. antarctica*), сортів пшениці (*T. aestivum*) та ячменю (*H. vulgare*), сортів та сортозразків рижю посівного (*C. sativa*), видів льону (*L. bienne*, *L. angustifolium*, *L. usitatissimum*, *L. humile*, *L. perenne*), різних сортів льону-довгунцю, а також білоруських ландрас льону. Показано високу ефективність використання ТВР-аналізу для диференціації різних генотипів рослин, що може бути вельми корисним як в молекулярній генетиці рослин при аналізі на всіх таксономічних рівнях, так і в селекційній роботі при створенні та перевірці нових сортів, адже ТВР метод поєднує в собі надійність і швидкість отримання вихідних даних, а також простоту їх аналізу.

Ключові слова: молекулярно-генетичні маркери, ТВР (tubulin base polymorphism), β -тубулін, ген, інтрон, ДНК-фінгерпринтинг, *Eleusine coracana*, *Eleusine indica*, *Aegilops biuncialis*, *Deschampsia antarctica*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Camelina sativa*, *Linum*.

АННОТАЦИЯ

Рабокoнь А. Н. Оценка генетического полиморфизма у растений с помощью интронов генов β -тубулина на внутри- и межвидовом уровнях. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2018.

Проведена системная оценка возможности и эффективности применения одной из современных систем молекулярных маркеров, которая базируется на наличии интрон-специфического полиморфизма ДНК в семье генов β -тубулинов растений (tubulin-based polymorphism, ТВР). Был рассмотрен уже ранее приобретенный опыт

и приведены собственные примеры использования ТВР-анализа и его модификаций (сТВР и hТВР) при исследовании однодольных и двудольных растений на меж- и внутривидовом уровне, а именно: сортов пальчатого проса (*E. coracana*) и генотипов гусиной травы (*E. indica*), крымских популяций эгилопса (*Ae. biuncialis*), островных популяций щучника антарктического (*D. antarctica*), сортов пшеницы (*T. aestivum*) и ячменя (*H. vulgare*), сортов и сортообразцов рыжика посевного (*C. sativa*), видов льна (*L. bienne*, *L. angustifolium*, *L. usitatissimum*, *L. humile*, *L. perenne*), различных сортов льна-долгунца, а также белорусских ландрас льна. Показана высокая эффективность использования ТВР-анализа для дифференциации различных генотипов растений, что может быть весьма полезным как в молекулярной генетике растений при анализе на всех таксономических уровнях, так и в селекционной работе при создании и проверке новых сортов, ведь ТВР метод сочетает в себе надежность и скорость получения исходных данных, а также простоту их анализа.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры, ТВР (tubulin base polymorphism), β -тубулин, ген, интрон, ДНК-фингерпринтинг, *Eleusine coracana*, *Eleusine indica*, *Aegilops biuncialis*, *Deschampsia antarctica*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Camelina sativa*, *Linum*.

SUMMARY

Rabokon A. M. Genetic polymorphism evaluation in plants using introns of β -tubulin genes at intraspecies and interspecies levels. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences (Ph.D) on a speciality 03.00.22 – molecular genetics. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2018.

Introns are universal and convenient tool for molecular genetic research in a wide range of organisms because of its length polymorphism. A systematic assessment of the application possibility and effectiveness of one of the modern molecular marker systems based on the presence of an intron-specific DNA polymorphism of the tubulin family in plants (tubulin-based polymorphism, TBP) was carried out in the present work. Because it is not yet widely used, this method requires verification of its effectiveness for genotyping plants at different taxonomic levels. The previous data were reviewed and new application examples of the TBP analysis (TBP method – I intron length polymorphism assessment) and its modifications (сТВР method - II intron length polymorphism assessment, and hТВР method – I+II introns length polymorphism assessment) in monocotyledonous and dicotyledonous plants assessment at the interspecies and interspecies level were presented.

Following plants were tested: finger millet (*E. coracana*) varieties and the genotypes of Indian goosegrass (*E. indica*), Crimean populations of aegilops (*A. biuncialis*), Antarctica island populations of hair grass (*D. antarctica*), wheat (*T. aestivum*) and barley cultivars (*H. vulgare*); varieties and cultivars of camelina (*C. sativa*), flax species (*L. bienne*, *L. angustifolium*, *L. usitatissimum*, *L. humile*, *L. perenne*), various cultivars of flax and Belarusian flax landraces. Range of amplicon size variation (introns of the tubulin genes) was obtained for all investigated plants, UPGMA-denograms were constructed between populations, varieties and genotypes based on the values of the genetic

similarities of Ney and Lee; PIC values (Polymorphism Information Content) were calculated. In addition, a bioinformation analysis of the exon-intron structure of β -tubulin genes in wheat, barley and flax was conducted. To obtain a specific TBP profile of all studied samples, a polymerase chain reaction was performed with known primer sequences and the resulting reaction products were separated using a non-denaturing polyacrylamide gel followed by silver nitrate visualization.

The high application efficiency of the β -tubulin gene intron length polymorphism assessment was shown for fingerprinting of various plant genotypes, that can be used both for plant molecular genetics and for purposeful application in molecular selection, for example, during creating and testing new varieties. The obtained results allow us to recommend this β -tubulin gene's intron length evaluation method and its modifications for the molecular genetic differentiation of monocotyledonous and dicotyledonous plant representatives, as well as to offer it for application in molecular genetic research of other plant phylogenetic groups, because this method combines reliability and high output data obtaining speed with data analysis simplicity.

Key words: molecular genetic markers, TBP (tubulin base polymorphism), β -tubulin, gene, intron, DNA-fingerprinting, *Eleusine coracana*, *Eleusine indica*, *Aegilops biuncialis*, *Deschampsia antarctica*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Camelina sativa*, *Linum*.