

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

РАБОКОНЬ АНАСТАСІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК 575.2:577.2

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

03.00.22 – молекулярна генетика
091– біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

 А. М. Рабокoнь

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, академік НАН України
Блюм Ярослав Борисович

Київ – 2018

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.

В дисертаційному дослідженні 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 і 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. В роботі перевірена можливість використання ТВР методу для диференціації та генотипування рослин різних таксономічних груп, а саме, на міжвидовому (окремі види) та внутрішньовидовому (популяції, сорти та генотипи) рівнях. Показано, що даний метод однаково добре зарекомендував себе під час аналізу однодольних та дводольних рослин. Для отримання характерного ТВР профілю всіх досліджених рослин проводили полімеразну ланцюгову реакцію з відомими послідовностями праймерів та розділяли отримані продукти реакції в неденатуруючому поліакриламідному гелі з подальшою візуалізацією за допомогою нітрату срібла. Для всіх досліджених видів рослин був встановлений діапазон варіювання розмірів ампліконів (інтронів генів тубуліну), побудовані UPGMA-дендрограми між популяціями, сортами, окремими генотипами на основі значень коефіцієнтів генетичної подібності Нея та Лі; розраховано значення PIC (Polymorphism Information Content). Додатково проведено біоінформаційний аналіз екзон-інтронної структури генів, що кодують β -тубулін у пшениці, ячменю та льону.

Диференціюючі властивості ТВР методу оцінювали на представниках однодольних та дводольних рослин, зокрема з родини Злакові, які широко використовуються в сільському господарстві у різних частинах світу. Було проаналізовано сорти пальчастого проса (*Eleusine coracana*) української селекції, яке останнім часом у зв'язку з розвитком геномних технологій, розумінням механізмів стресостійкості та використанням генів для покращення зернових культур стало перспективним об'єктом досліджень із-за перспектив впровадження у сільське господарство в ряді європейських країн та в Україні, а також близького виду гусячої трави (*E. indica*). За допомогою методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну вдалося диференціювати як різні види (*E. coracana* та *E. indica*), так і сорти або генотипи в межах кожного виду. Крім того, побудована на основі ТВР-профілів дендрограма повністю відповідає генотиповій приналежності досліджених сортів та соматоклональних варіантів елевсини.

Не менш важливим є рід *Aegilops* L., представники якого є одними з найближчих родичів пшениці, та являє собою природний генетичний резервуар для селекційного її поліпшення. При формуванні колекцій, оцінці генетичного різноманіття популяційних ресурсів у різних видів егілопсу необхідні більш інформативні молекулярно-генетичні методи їх диференціації. Для вирішення цього питання було перевірено можливість використання ТВР методу у дослідженні природних популяцій егілопсів. Зокрема, було перевірено диференційну здатність ТВР, сТВР та hТВР методів на різних популяціях *Ae. biuncialis* кримського походження. Встановлено, що застосування всіх варіантів ТВР методу дозволяє отримати достатню кількість поліморфних ампліконів інтронів генів β -тубуліну. До того ж більшість зразків мають свій унікальний генетичний ТВР-, сТВР- або hТВР-профіль. За допомогою ТВР методу та його модифікацій (сТВР та hТВР методів) було диференційовано зразки з різних кримських популяцій *Ae. biuncialis*. І хоча характер кластеризації досліджених популяцій з використанням різних типів ТВР-аналізу значно

відрізняється, разом з тим розподіл на групи популяцій, що утворюються за умов бутстреп-підтримки, в цілому зберігається.

Ще одним цікавим представником злаків є щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* E. Desv.), популяції якого зростають ізольовано в екстремальних умовах Антарктики. Результати аналізу острівних популяцій цього виду, отриманих за допомогою різних варіантів методу аналізу поліморфізму генів тубулінів (ТВР, hТВР, сТВР та cТВР зі специфічними праймерами) свідчать про відсутність суттєвого поліморфізму в досліджених збірках рослин. Це вказує на низький рівень генетичного різноманіття *D. antarctica* острівних популяцій Антарктики, що узгоджується з даними, отриманими іншими дослідниками за допомогою інших типів ДНК-маркерів.

Серед злакових одними з основних продовольчих культур є пшениця (*T. aestivum*) та ячмінь (*H. vulgare*). У зв'язку зі створенням нових сортів цих рослин виникає потреба надійних та швидких методів ідентифікації та диференціації їх сортів на молекулярно-генетичному рівні. Під час проведених нами досліджень було оцінено можливість використання поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для генотипування вітчизняних сортів пшениці та ячменю. Виявлено міжсортний поліморфізм в межах сортів (генотипів) досліджених рослин, що свідчить про непогану диференціюючу спроможність ТВР методу для оцінки генетичного поліморфізму сортів ячменю та пшениці.

Також в даному дослідженні доведено можливість використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну для диференціації та генотипування дводольних рослин. Спочатку за допомогою даного методу нами було досліджено українські сорти та сортозразки рижію (*Camelina sativa* (L.) Crantz), який є перспективною рослиною для отримання біодизелю. За умов використання ТВР та сТВР методів вдалося диференціювати всі використані у роботі зразки. Хоча рівень поліморфізму між сортами рижію був незначним, проте ті зразки, які неможливо було розділити на підставі аналізу поліморфізму довжини першого інтрону, легко вдалося диференціювати один від одного за поліморфізмом довжини другого інтрону гену β -тубуліну.

Серед дводольних рослин однією з найдавніших сільськогосподарських культур є льон. І хоча геном льону активно вивчається, його генетичні карти все ще залишаються неповними, а маркери, які базуються на вивченні послідовностей конкретних генів, зокрема генів тубулінів, досі ще не використовувались. За допомогою ТВР методу нам вдалось розділити різні види льону, а саме *L. usitatissimum*, *L. perenne*, *L. humile*, *L. angustifolium* та *L. bienne*. При цьому отримані на основі ТВР- та сТВР-профілів дендрограми свідчать про те, що *L. angustifolium* та *L. bienne* є різними видами, а *L. bienne* дійсно є підвидом *L. usitatissimum*. Також нам вдалось ідентифікувати та диференціювати сорти *L. usitatissimum* з різних селекційних пулів. Виявилось, що всі зразки розподілилися на дендрограмі таким чином, що сорти однієї селекції знаходяться поряд один з одним.

Було проведено також дослідження внутрішньо- та міжсортового поліморфізму вибірки сортів льону виключно української селекції за допомогою ТВР та SSR-маркерів. Показано, що більшість сортів є генетично неоднорідними за обома маркерами. При цьому ефективність ТВР-аналізу не поступалась ефективності SSR-аналізу в диференційній здатності та навіть має декілька практичних переваг у використанні. Ефективність ТВР методу також було оцінено і при дослідженні білоруських ландрас (стародавніх сортів) льону. Адже вивчення ландрас може не тільки дати повну картину генетичної різноманітності культурного виду, яка в сортах сучасної селекції вельми обмежена, але і дозволити виявити генотипи, цікаві як донори рідкісних алелей генів господарськоцінних ознак. З цією метою було проаналізовано 32 білоруські ландраси льону. Використання ТВР методу дозволило диференціювати вивчені ландраси *L. usitatissimum* та дослідити їх внутрішньосортовий поліморфізм.

Загалом показано високу ефективність та простоту використання ТВР методу для диференціації різних сортів (генотипів), популяцій та видів рослин, що може бути широко застосовано як для фундаментальних досліджень в галузі молекулярної генетики, так і для вирішення задач практичної селекції.

Новизна роботи полягає в тому, що нами вперше було систематично досліджено можливість використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР) для диференціації та генотипування однодольних та дводольних рослин різних таксономічних груп, а саме: на рівні видів, популяцій, сортів та сортозразків. Вперше за допомогою ТВР-аналізу було ідентифіковано та диференційовано сорти вітчизняної селекції таких важливих сільськогосподарських культур як: пальчасте просо (*E. coracana*) та її родича гусячої трави (*E. indica*), рижію (*C. sativa*), пшениці (*T. aestivum*), ячменю (*H. vulgare*) та льону (*Linum*). Досліджено внутрішньосортову гетерогенність сучасних сортів льону української селекції. Продемонстрована можливість використання ТВР методу в молекулярно-генетичних дослідженнях злакових сільськогосподарських рослин, а саме пшениці та ячменю, а також рижію з родини Капустяні. Проведено дослідження диких родичів злакових сільськогосподарських рослин: виявлено вірогідні молекулярно-генетичні відмінності між різними кримськими популяціями *Aegilops biuncialis* та відсутність поліморфізму серед острівних популяцій *Deschampsia antarctica* в Антарктиці.

Показано, що маркерна система, яка базується на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, може бути успішно використана для диференціації та генотипування видів, популяцій, сортів та сортозразків однодольних та дводольних рослин. Результати проведеного молекулярно-генетичного аналізу ряду видів рослин, а саме: *E. coracana* та *E. indica*, *Ae. biuncialis*, *C. sativa*, *T. aestivum*, *H. vulgare* та видів *Linum* L. можуть бути використані в подальших селекційно-генетичних програмах. Отримані дані можна використати як для поліпшення агрономічних характеристик злакових культур, так і в дослідженнях генетичних відмінностей між популяціями, що зростають у різних екологічних умовах. Метод поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну може бути корисним для оцінки генетичної чистоти та однорідності сортів льону, ячменю, пшениці та рижію, застосовуватися в молекулярно-

філогенетичному аналізу не лише досліджених видів та сортів рослин, але й при роботі із іншими видами рослин.

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*.

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

Статті:

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, Пирко 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, Пирко 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, Пирко 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. (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).

Патент на корисну модель:

9. Демкович АЄ, **Рабокoнь АМ**, Пірко ЯВ, Блюм ЯБ, винахідники; заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Прилад для вертикального гелъ-електрофорезу; Патент України на корисну модель № 102060. 2015 Жовт. 12.

Тези:

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. **Рабоконь 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.

SUMMARY

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

Dissertation for scientific 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.

Application possibilities of the molecular genetic method for assessment of the β -tubulin gene's intron length polymorphism (TBP method – length polymorphism estimation of the 1st intron) and its modifications (cTBP method – length polymorphism estimation of the II intron length and the hTBP method – length polymorphism estimation of 1st and 2nd introns) were investigated and summarized in the dissertation study. That allowed to investigate the effectiveness of this method application for molecular genetic differentiation of plants on the intraspecies and interspecies levels.

In this paper, the application possibility of the TBP method for differentiation and genotyping of plants from different taxonomic groups was tested, particularly in cases of interspecies (between species) and intraspecies (populations, varieties and genotypes) levels. It was shown that this method is equally well suitable for the analysis of monocotyledonous and dicotyledonous plants. To obtain a characteristic TBP profile of all tested plants, a polymerase chain reaction was performed with known primer sequences. Resulting reaction products were separated using a non-denaturing polyacrylamide gel followed by visualization with silver nitrate staining. For all investigated plant species, a range of amplicons size variation (introns of the tubulin genes) was obtained, UPGMA-denograms between populations, varieties and separate genotypes were constructed based on the values of the Ney and Lee genetic similarities value; PIC value (Polymorphism Information Content) was calculated. In addition, a bioinformatic analysis of the exon-intron structure of genes encoding β -tubulin in wheat, barley and flax was conducted.

The differentiating properties of the TBP method were evaluated using monocotyledonous and dicotyledonous plants, particularly from the Poaceae family, which are widely used in agriculture in different parts of the world. The Ukrainian varieties of the finger millet (*Eleusine coracana*) were analyzed. Recently, this species due to the genomic technologies development, understanding of the stress resistance mechanisms and the genes usage to grain crops improvement has become a promising research object due to the prospects of introduction into agriculture in a number of European countries and in Ukraine, as well as a close species Indian goosegrass (*E. indica*). By means of the method of β -tubulin gene intron lengths evaluating, it was possible to differentiate between different species (*E. coracana* and *E. indica*) and between varieties or genotypes within each species. In addition, dendrogram of allelic variants, constructed based on the TBP-profiles is fully consisted with genotypes of the studied eleusine varieties and somaclone variants.

Aegilops L. genus is equally important, which members are one of the closest wheat relatives, and is a natural genetic reservoir to wheat selection improvement. Population resources in different *aegilops* species requires informative molecular genetic methods for their differentiation during collections gathering and genetic diversity evaluation. To solve this issue, the possibility of the TBP method application in the study of natural *aegilops* populations was checked. Particularly, the differentiation possibility of the TBP, hTBP and cTBP methods was checked in different *Ae. biuncialis* populations. It was found, that usage of all variants of the TBP method allows obtaining a sufficient number of polymorphic amplicons of β -tubuline genes. In addition, most of the samples have their own unique TBP-, hTBP- or cTBP-pattern. TBP method and its modifications (cTBP and hTBP methods) allowed us to differentiate samples from different *Ae. biuncialis* Crimean populations. And, although, the clustering patterns of tested cultivars obtained using different types of TBP analysis are significantly different, population clusterization under bootstrap support are generally persistent at the same time.

Another cereal member of interest is Antarctic hair grass (*Deschampsia antarctica* E. Desv.), which populations grow isolated under extreme conditions of

Antarctica. The analysis results of these species island populations was obtained using various variants of the tubulin genes polymorphism analysis method (TBP, cTBP, cTBP with specific primers and hTBP) indicate that there is no significant polymorphism in the investigated plant samples. This indicates the low level of genetic diversity of *D. antarctica* island populations, that is consistent with the data obtained by other researchers using other types of DNA markers.

Among the cereals, one of the main food crops is barley (*H. vulgare*) and wheat (*T. aestivum*). Due to the creation of new varieties of these plants, there is a need for reliable and rapid methods for identifying and differentiating its varieties at the molecular-genetic level. In the course of our studies, the application possibility of the β -tubulin genes intron lengths polymorphism for national varieties genotyping of wheat and barley was evaluated. The interspecies polymorphism within the varieties (genotypes) of the investigated plants was detected, that indicates a good differentiating ability of the TBP method for the evaluation of genetic polymorphism of barley and wheat varieties.

Also, the possibility of method using for evaluating the β -tubulin genes intron lengths polymorphism for differentiation and genotyping of dicotyledonous plants has been proved in this study. Firstly, using this method, we studied Ukrainian varieties and genotypes of camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz), that is a promising plant for biodiesel production. Using TBP and cTBP methods it was possible to differentiate all samples tested in the study. Although the level of polymorphism between the camelina varieties was not significant, those samples that could not be separated while using lengths polymorphism analysis of the first intron, were easily differentiated from each other by the lengths polymorphism analysis of the second intron of the β -tubulin gene.

Among dicotyledonous plants, one of the oldest crops is flax. Although the flax genome is actively studied, its genetic maps are still incomplete, and markers based on the study of sequences of specific genes, particularly, tubulin genes, have not yet been used. Using TBP method, we managed to differentiate between different species of flax, *L. usitatissimum*, *L. perenne*, *L. humile*, *L. angustifolium* and *L. bienne*. In this case, the dendrograms derived on the basis of TBP- and cTBP-profiles, indicate that

L. angustifolium and *L. bienne* are different species, while *L. bienne* is actually the *L. usitatissimum* subspecies. Also we was able to identify and differentiate *L. usitatissimum* varieties from different breeding pools. It was found that all samples differentiated on the dendrogram in such manner that the varieties of one selection were adjacent to each other.

The study of intra- and inter-species polymorphism of Ukrainian selection flax varieties was conducted while using TBP- and SSR-markers. It was found that most varieties are genetically heterogeneous according both markers. At the same time, the effectiveness of the TBP-analysis was not lower in comparison with the SSR-analysis in differential ability and even has some practical advantages in its usage. The effectiveness of the TBP method was also evaluated in the belorussian flax landraces (ancient varieties) study.

Landraces research can give not only a full information of the genetic diversity of the cultural species, which is very limited in the modern breeding varieties, but also allows identification of genotypes, which are useful as donors of rare alleles of genes, that can influence economic value. For this purpose, 32 Belarusian flax landraces were analyzed. Using the TBP method it was possible to differentiate studied *L. usitatissimum* landraces and to investigate their intracultivar polymorphism.

In general, high efficiency and ease of use of the TBP method for differentiation of different varieties (genotypes), populations and plant species is shown. This method can be widely applied both for molecular genetic research in the field and for solving practical selection problems.

The novelty of the work is a system assessment of application possibility of the β -tubulin gene's intron length polymorphism (TBP) evaluation method for the differentiation and genotyping of monocotyledonous and dicotyledonous plants of different taxonomic groups, particularly, species, populations, varieties, cultivars and genotypes were used. Using TBP-analysis, varieties of national important crops such as finger millet (*E. coracana* Gaertn.) and its relative, Indian goosegrass (*E. indica* (L.) Gaertn.), camelina (*C. sativa* (L.) Crantz), wheat (*T. aestivum* L.), barley (*H. vulgare* L.) and flax (*Linum* L.) were identified and differentiated for the first time. Intracultivar

heterogeneity of modern Ukrainian flax varieties was investigated. The usage possibility of the TBP method in molecular genetic studies of cereal crops, particularly, wheat and barley, and camelina was demonstrated. The study of wild relatives of cereal crops was conducted: there are significant molecular genetic differences between different Crimean *Aegilops biuncialis* Vis. populations and a lack of polymorphism among *Deschampsia antarctica* E. Desv. from Antarctica.

It was shown that a marker system based on β -tubulin gene's intron length polymorphism evaluation can be successfully used for differentiation and genotyping of species, populations, varieties, cultivars and genotypes of monocotyledonous and dicotyledonous plants. The results of the molecular genetic analysis of many plant species, particularly, *E. coracana* and *E. indica*, *Ae. biuncialis*, *C. sativa*, *T. aestivum*, *H. vulgare* and *Linum L.* species can be used in further breeding genetic programs. Obtained data can be used both for the improvement of agronomic characteristics of cereal crops and for the research of genetic differences between populations growing in different environmental conditions. The method of β -tubulin gene's intron length polymorphism evaluation may be useful in assessing the genetic purity and homogeneity of varieties of flax, barley, wheat and rye, and applied in molecular phylogenetic analysis of not only investigated species and plant varieties, but also with other plant species.

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*.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	18
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	26
1.1. Основні типи молекулярно-генетичних маркерів	26
1.2. Молекулярно-генетичні маркери на основі поліморфізму довжини інтронів генів.....	30
1.3. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну як інструмент для молекулярно-генетичної диференціації рослин	34
1.3.1. Принцип роботи методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну	34
1.3.2. Генотипування рослин за допомогою методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	41
2.1. Рослинний матеріал.....	41
2.3. Виділення рослинної ДНК та визначення її концентрації	47
2.4. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).....	48
2.5. Електрофорез та візуалізація продуктів ампліфікації	50
2.6. Статистичний аналіз даних.....	51
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ.....	53
3.1. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у видів роду <i>Eleusine L.</i>	53
3.2. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у егілопсу	57
3.2.1. Поліморфізм довжини I-го інтрону генів β -тубуліну у <i>Ae. biuncialis</i> (ТВР-аналіз).....	57

3.2.2. Поліморфізм довжини II-го інтрону генів β -тубуліну у <i>Ae. biuncialis</i> (сТВР-аналіз).....	61
3.2.3. Поліморфізм довжини I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну у <i>Ae. biuncialis</i> (hТВР-аналіз).....	64
3.3. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у острівних популяцій <i>D. antarctica</i> з морської Антарктики	68
3.4. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів пшениці та ячменю	72
3.5. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у рижю	78
3.6. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у видів льону	85
3.6.1. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у різних видів роду <i>Linum</i> L.	86
3.6.2. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів льону різної селекційної спрямованості та географічного походження	92
3.6.3. Порівняльний аналіз ефективності застосування поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів для генотипування сортів льону української селекції	94
3.6.4. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в білоруських ландрасах льону	105
УЗАГАЛЬНЕННЯ	114
ВИСНОВКИ	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	123
ДОДАТКИ	139

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
п.н.	– пара нуклеотидів
ПААГ	– поліакриламідний гель
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
AFLP	(Amplified fragment length polymorphism) – поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів
CAPS	(Cleaved amplified polymorphic sequence) – аналіз рестрикційного поліморфізму ампліфікованих послідовностей
CISP	(conserved-intron scanning primers) – праймери до консервативних ділянок екзонів, що фланкують інтрон
TBP	(Tubulin Base Polymorphism) – поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (I-го інтрону)
cTBP	(combinatorial Tubulin Base Polymorphism) – комбінований поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (II-го інтрону)
EST-SSR	(Simple sequence repeats in expressed sequence tags) – короткі повтори з послідовностями, що експресуються
EPIC-ПЛР	(Exon-Primed Intron-Crossing) – ПЛР з використанням праймерів до ділянок екзонів, що фланкують інтрон
hTBP	(horse Tubulin Base Polymorphism) – поліморфізм довжини I-го разом з II-м інтронів генів β -тубуліну
ILP	(Intron Length Polymorphism) – поліморфізм довжини інтронів
IT	(intron-targeting) – таргетування інтрону
IRAP	(Inter-retrotransposon amplified polymorphism) – поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами
ISSR	(Inter simple sequence repeat) – послідовності ДНК між простими повторами
PIC	(Polymorphism Information Content) – величина індексу

	поліморфності
PIP	(potential intron polymorphism) – потенційний поліморфізм інтронів
RAPD	(Random amplified polymorphic DNA) – довільно ампліфікована поліморфна ДНК
REMAP	(Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) – поліморфізм ампліфікованих послідовностей між фрагментом LTR ретротранспозону і поруч розташованого праймера
SCAR	(Sequence characterized amplified region) – ампліфіковані області, охарактеризовані секвенуванням
SNP	(Single nucleotide polymorphism) – поліморфізм однонуклеотидних замін
SSR	(Simple sequence repeat) – прості послідовності, що повторюються
STS	(Sequence-tagged sites) – сайти, прив'язані до послідовностей
UPGMA	(Unweighted Pair-Group Method) – незважений парногруповий метод з арифметичним усередненням

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Молекулярні маркери широко застосовуються як у фундаментальних, так і в прикладних дослідженнях генетичного спрямування [105]. 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 [104]. 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 [85]. Все це вже привело до спроб використати інтрони як перспективну мішень для молекулярно-генетичного поліморфізму [5, 12, 131, 134].

В силу поліморфізму довжини інтрони виявились універсальним і зручним інструментом молекулярно-генетичних досліджень у широкого спектру організмів [5, 12, 103]. На сьогодні маркери поліморфізму довжини інтронів успішно використовуються для побудови генетичних карт [137], ідентифікації видів [65] і аналізів з генотипування [4]. Це особливо характерно для послідовностей тих ділянок геному, які містять гени, що кодують структурні білки, такі, як, наприклад, білки цитоскелету [100, 101]. Зокрема, метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (tubulin base polymorphism, TBP) є достатньо новим і перспективним прикладом використання молекулярно-генетичних маркерів, створених завдяки розумінню екзон-інтронної структури цих генів [4]. 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 TBP методу для генотипування сортів льону різного селекційного та географічного походження.
- Дослідити внутрішньосортову гетерогенність сучасних сортів льону української селекції за допомогою TBP методу та оцінити ефективність його використання у порівнянні з SSR-методом.
- Оцінити можливість використання TBP 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).

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.

Дисертант висловлює щире подяку науковому керівнику академіку НАН України, професору, д.б.н. Блюму Ярославу Борисовичу за наукове керівництво та обрання актуальної теми дисертаційної роботи, допомогу при інтерпретації отриманих результатів та написанні дисертаційної роботи. Автор дякує к.б.н. Пірку Ярославу Васильовичу за цінні поради та допомогу під час проведення досліджень та аналізу результатів. Здобувач висловлює подяку співробітникам відділу популяційної генетики ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки»: к.б.н. Демковичу Андрію Євгеновичу, к.б.н. Калафат Любові Олександрівні, к.б.н. Пірко Надії Миколаївні, к.б.н. Білоножко Юлії Олександрівні, м.н.с. Постовойтової Анастасії Сергіївні за допомогу в проведенні досліджень. Автор висловлює щире подяку чл.-кор. НАН України, д.б.н. Кунаху Віктору Анатолійовичу, д.б.н. Козерецькій Ірині Анатоліївні, к.б.н. Парнікозі Івану Юрійовичу за надану можливість працювати з рослинним матеріалом *Deschampsia antarctica*, зібраним під час антарктичних експедицій. Дисертант також висловлює подяку всім колегам та співробітникам ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України за допомогу та консультації при плануванні експериментів. Також, автор дякує рідним та близьким за розуміння і підтримку під час виконання дисертаційної роботи.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Основні типи молекулярно-генетичних маркерів

Кількість нових сортів культурних рослин, що вимагає більш досконаліх прийомів їх генотипування, збільшується з кожним роком. Ідентифікацію сортів та перевірку їх генетичної чистоти прийнято визначати за допомогою оцінки біохімічних та морфологічних ознак (GOT (grow-out test)) [93]. Проте ці методи вимагають значного часу і ресурсів, їх результати залежні від впливу чинників середовища, тому кінцевий результат часто є суб'єктивним. Крім того, деякі діагностичні ознаки проявляються лише на певній стадії розвитку рослини (цвітіння і дозрівання плоду). Всі ці обмеження можуть бути ефективно усунені з використанням молекулярно-генетичних методів, які базуються на використанні ДНК-маркерів [19, 61, 93]. Ці методи дозволяють значно більшою мірою виявити об'єктивні відмінності між досліджуваними зразками і, відповідно, істотно підвищити ефективність аналізу.

ДНК-маркери можна застосовувати на будь-яких стадіях розвитку рослини, вони більш поліморфні, а результати їх використання не залежать від впливу факторів навколишнього середовища на організм. Для молекулярно-генетичного аналізу можна використовувати різні частини рослини [61]. Методи молекулярно-генетичного аналізу незамінні в випадках, коли застосування традиційних підходів не дозволяє достовірно розрізнити досліджувані зразки. Тому на сьогодні, рівень генетичного поліморфізму рослин найефективніше визначається саме за допомогою ДНК-маркерів. Для генотипування сільськогосподарських культур використовують різні системи молекулярних маркерів, які відрізняються розподілом по геному, рівнем поліморфізму, специфічністю або універсальністю тощо [61, 62, 86]. Все це дозволяє гнучко підбирати ті чи інші генетичні маркери для різних ситуацій.

Крім того, оцінка генетичного поліморфізму має велике значення для вивчення біорізноманіття та філогенії видів, динаміки популяцій і екологічних

відносин в природних і штучних рослинних угрупованнях. Відомості про генетичні ресурси мають фундаментальне значення для розробки програм отримання нових сортів і захисту диких видів рослин.

Розуміння генетичних основ дивергенції і адаптації популяцій є одним з найважливіших завдань популяційної генетики, бо грає ключову роль для оцінки еволюційних процесів. Молекулярно-генетичні маркери дозволяють ідентифікувати окремі гени, їх блоки, які контролюють адаптивні ознаки в популяціях рослин і тварин, що радикально змінило підходи до оцінки генетичного різноманіття, паспортизації та класифікації сортів, картування і визначення фізичної природи генів і генетичного моніторингу в селекції і генетиці культурних рослин. У селекційному процесі молекулярно-генетичні маркери використовуються під час пошуку нових генотипів для залучення в колекцію; при ідентифікації і реєстрації зразків рослин, для запобігання дублювання та оцінки структури колекції; для найбільш ефективного підбору батьківських пар при гібридизації; у формуванні колекцій, контролі генетичної стабільності при створенні колекцій *in vitro*; охороні авторських прав (ідентифікації та реєстрації джерел і донорів цінних ознак, вирішенні питань авторства сортів і зразків рослин) [162]. Важливим завданням в дослідженні генетичного поліморфізму є оптимальний підбір типу молекулярно-генетичних маркерів. Одним з найбільш доступних і швидких способів виявити варіабельність є застосування молекулярно-генетичних методів, які базуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) і оцінці відповідного поліморфізму ДНК. Маркери, що обираються для аналізу, повинні мати певні властивості і характеристики, особливо доступність фенотипічних проявів алельних варіантів для їх ідентифікації, рівномірність розподілу в геномі, легке виявлення і відтворюваність результатів, можливість автоматизації тощо [145, 147].

Використання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) істотно полегшує аналіз і реалізовано в переважній більшості сучасних молекулярно-генетичних маркерів. Найпоширенішими серед них є, але не обмежується ними, наступні молекулярні маркери [153]:

1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) – метод ампліфікації ДНК сегментів з використанням випадкових праймерів (приблизно 10 нуклеотидів) [109].
2. SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions, – послідовність, що характеризує ампліфіковані регіони) – заснований на секвенуванні і підборі праймерів до одного з ампліконів RAPD спектра [63].
3. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) – аналогічний SCAR-маркерам і має додатковий етап обробки рестриктазами, що підвищує кількість виявлених поліморфізмів [123].
4. AFLP (Amplified restriction Fragment Length Polymorphism, ампліфікація поліморфних по довжині фрагментів ДНК) – метод селективної ПЛР ампліфікації поліморфних по довжині фрагментів, отриманих в результаті ензиматичного розщеплення геномної ДНК ендонуклеазами рестрикції [32].
5. SSR (Simple Sequence Repeat, тандеми повторів простих послідовностей) – ПЛР з фланкуючими праймерами до короткого міні- або мікросателітного повтору дозволяє виявляти маркери з кодомінантним успадкуванням і, відповідно, зручний для виявлення гетерозигот по даному локусу. Одна пара праймерів для флангів в ПЛР дозволяє розглядати поліморфізм тільки одного локусу, тобто маркер є локус-специфічним. Для багатьох мікросателітних локусів не вдається виявити поліморфізм. Як правило, фланкуючі послідовності для даного мікросателітного локусу виявляються видоспецифічними. Порівняно невисока кількість і складність розробки SSR локусів в значній мірі компенсуються високою варіабельністю, відтворюваністю, простотою аналізу та можливістю його часткової автоматизації [25, 28], що є досить зручним для індивідуального генотипування і дослідження потоків генетичної інформації [60, 159].
6. EST-SSR (ESTs, expressed sequence tag, короткі фрагменти послідовностей клонуваних ділянок ДНК (mRNA→cDNA)) – використовуються для ідентифікації транскриптів генів, можуть бути джерелами для виявлення

SSRs, тобто для пошуку мікросателітів в ділянках генома, що експресуються [29].

7. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats, область генома між двома сусідніми, протилежно орієнтованими мікросателітами) – пов'язаний з дослідженням поліморфізму ділянок ДНК, що знаходяться між мікросателітними послідовностями. Генерує велику кількість локусів з використанням однієї пари праймерів [54, 151, 152].
8. SNP (Single Nucleotide Polymorphism, поліморфізм по одному нуклеотиду) – заснований на тому, що в організмах зміни в одному нуклеотиді призводять до точкових мутацій, обумовлюючи тим самим поліморфізм по одному нуклеотиду (діалельний тип маркерів). Останнім часом набуває популярності, бо метод добре автоматизований [114].
9. IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) – генерує ПЛР продукти між двома прилеглими ретротранспозонами [59].
10. REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplification Polymorphism) – аналогічний IRAP, однак поряд з праймерами до ретротранспозонів використовуються мікросателітні праймери, з огляду на те, що мікросателіти можуть виявити високі показники мутації, які мають індивідуальне місце розташування у різних генотипів [59, 161].

Отже, на даний момент вже розроблено велику кількість різних типів ДНК-маркерів, кожен з яких має свої переваги і недоліки, а деякі з них використовуються тільки з певною метою. Розвиток маркерних систем спрямовано від оцінки анонімних послідовностей (iSSR, RAPD) до визначення поліморфізму цільових послідовностей генів. Крім того, у міру накопичення інформації про структуру геному, постійно тривають пошуки нових, більш ефективних, зручних і дешевих маркерних систем для проведення генетичного аналізу.

1.2. Молекулярно-генетичні маркери на основі поліморфізму довжини інтронів генів

Молекулярно-генетичні маркери є досить ефективними в дослідженнях генетичного спрямування. Проте ті з них, які досить інформативні і ефективні, є трудоємкими і вимагають наявності попередньої генетичної інформації про об'єкт. І навпаки, методи, що дають інформацію без попередніх генетичних досліджень, часто можуть бути застосовані з істотними обмеженнями. Одночасно з цим, більшість молекулярних маркерів відповідають анонімним послідовностям ДНК, які, хоча і ефективні при оцінці генетичного поліморфізму широкого спектру різних видів організмів, майже повністю знаходяться всередині регіонів з невідомою функцією. Насправді, більшість певних змін не відбувається в функціонально значущих ділянках ДНК, і таким чином рідко відповідають змінам, які відбуваються всередині генів [5, 11, 14]. У зв'язку з цим, методи, які базуються на потенційно-варіабельних регіонах специфічних генів або родин генів, дозволяють оцінити генетичні зміни всередині ДНК-послідовностей з відомою функцією.

В задачах класифікації та філогенії краще використовувати саме функціональні послідовності, які в тій чи іншій мірі пов'язані зі структурними або фізіологічними відмінностями організмів, ніж нефункціональної ДНК [66, 108]. Залежно від глибини філогенетичного аналізу, таксономічний рівень та ступінь роздільної здатності можуть зменшуватися при використанні повільно еволюціонуючих послідовностей генів і водночас штучно завищуватися при використанні швидко еволюціонуючих послідовностей, наприклад, SSR маркерів, які втрачають роздільну здатність на високому таксономічному рівні [135]. В даний час як джерела ДНК-поліморфізму все більшої популярності набувають інтрони, які як виявилось навіть можуть впливати та експресію генів [73]. Інтрони є помірно еволюціонуючими послідовностями і досить успішно використовуються при створенні маркерних систем для оцінки генетичної різноманітності. Зазвичай інтрони розглядаються як сміттєва ДНК, і в зв'язку з

цим, мінімально відхиляються від моделі нейтральної еволюції Кімури [64]. Тому інтрони, зокрема, поліморфізм їх довжини, виявилися універсальним для широкого спектра організмів і зручним для генетичного картування молекулярними маркерами, оскільки вони безпосередньо пов'язані з конкретними генами [16, 85].



Рис. 1.1. «Intron-targeting» маркер с праймерами, що фланкують екзонні області [105].

Основний підхід, що використовує як джерело інформації поліморфізм довжини інтрона, називається «intron-targeting» (ІТ). В ньому застосовуються праймери до сайтів сплайсингу інтронів (intron splice junction (ISJ)), як описано Вейнином и Лангриджем (Рис. 1.1) [132]. У цьому первинному дослідженні вивчали поліморфізм довжини інтронів в родині гена α -амілази. Подальші модифікації методу були представлені багатьма авторами [20, 74, 75, 95, 104, 119]. Ця методика відома під багатьма назвами, в тому числі: (EPIC) PCR [95], conserved-intron scanning primers (CISP; [34]), intron-flanking primers [131], potential intron polymorphism (PIP; [134]) та PCR-based landmark unique gene (PLUG) маркери [52]. Є незначні відмінності між цими методами, наприклад, в джерелі, що використовується для отримання праймерів, методі розділення фрагментів після ампліфікації ПЛР, і області ампліфікації інтрона за допомогою праймерів. Однак всі вони, безсумнівно, спираються на один і той же фундаментальний метод, іменованій як «intron-targeting» поліморфізм [132] (або частіше використовується в даний момент як «Intron Length Polymorphism» (ІЛР)). Так вже існує цілий ряд специфічних варіантів ІЛР методу, які ґрунтуються на поліморфізмі довжини інтронів і відрізняються один від одного родинною генів,

що виступає в якості джерела поліморфізму, і консервативною областю ДНК на межі з інтроном.

Однак використання ILP-маркерів для рослин залишалося ще дещо обмеженим. Це пов'язано з тим, що було необхідне виявлення відповідних інтронів, а для більшості рослин в базах даних присутні тільки кДНК або EST послідовності. Однак дослідження показали, що екзон-інтронні структури в значній мірі зберігаються серед різних гомологічних генів [6]. Отже, сайти сплайсингу інтронів в кДНК/EST послідовностях організму можна вивести відповідно до гомологічних генів зі спорідненого організму. Це забезпечує спосіб розробки ILP маркерів для будь-якого організму. Так, на основі цього факту було проведено велике дослідження для визначення потенційних інтронів для створення на їх основі молекулярних маркерів [134]. Дослідження глобально складалося з трьох етапів (Рис. 1.2): ідентифікація довжини і положення інтронів в рослинах з відомою послідовністю (в якості спорідненого виду для дводольних рослин був обраний *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* ecotype *Columbia*), для однодольних – рис (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. *Nipponbare*)) шляхом вирівнювання їх кДНК з геномною послідовністю; ідентифікація можливих позицій інтронів в кожному дослідженому виді шляхом вирівнювання EST послідовностей рослин з відомою кДНК послідовністю спорідненого виду (рису або арабідопсису); створення праймерів для досліджених EST послідовностей, що містять можливі позиції інтронів. Було виявлено 57 658 PIP маркерів для 59 видів рослин (22 273 для однодольних і 35 385 для дводольних рослин). Ця великомасштабна робота поклала початок для подібних робіт, спрямованих на вивчення конкретного виду рослин (наприклад, проса [87]).

Вже проведені дослідження по виявленню і дослідженню ILP-маркерів для різних рослин, наприклад рису, люцерни, проса тощо [20, 87, 129]. Даний тип маркерів почали використовувати при геномному аналізі деревних рослин [133]. Також розроблені варіанти методу, які базуються на багатьох «housekeeping» генах [51, 76, 121], ферментів електронно-транспортного ланцюга [35] і різноманітних ключових структурних білках [5, 154]. В останні роки маркери

поліморфізму довжини інтронів (ILP) були успішно використані для побудови генетичних карт [137], ідентифікації видів [65] і масштабних аналізів генотипування [4].

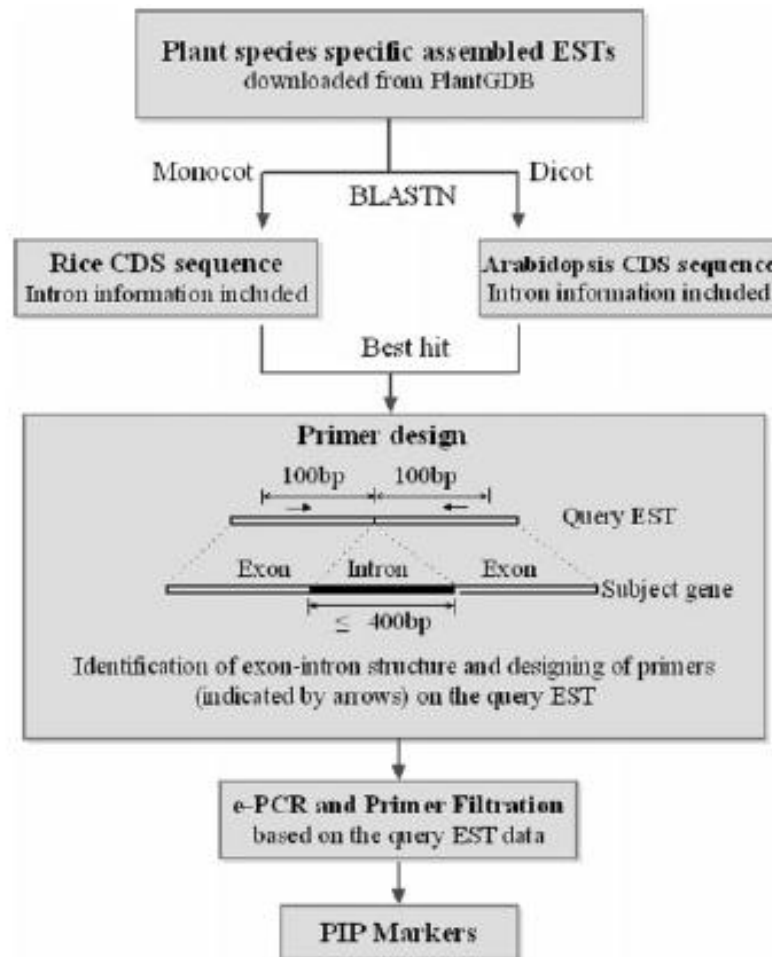


Рис. 1.2. Блок-схема розробки PIP-маркерів [134].

Показано, що ILP-маркери є нейтральними, кодомінантними, стабільними і специфічними, оскільки вони пов'язані з конкретними генами, і успішно застосовуються на різних таксономічних рівнях для дуже різних рослин [5]. А аналіз, який базується на звичайній ПЛР з використанням праймерів до ділянок екзонів, що фланкують інтрон (Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC-PCR)), дозволяє використовувати всього одну комбінацію вироджених праймерів для будь-якої рослинної ДНК. Це дає можливість швидко та зручно отримати надійні, відтворені та легко інтерпретовані результати [129]. ILP-маркери працюють як ефективна мультиплексна реакція при дослідженні інтронів різних представників

конкретної родини генів, дозволяючи отримати специфічний ДНК-профіль досліджуваного сорту або виду.

1.3. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну як інструмент для молекулярно-генетичної диференціації рослин

Один з найбільш вдалих ІР-маркерів ґрунтується на оцінці поліморфізму довжини інтронів у представників родини генів β -тубуліну різних видів рослин. Такий метод був названий ТВР (Tubulin-Based-Polymorphism) і продемонстрував високу ефективність при використанні на доволі широкому спектрі видів та інших таксономічних одиницях рослин [11, 41, 103.]. ТВР метод має певний набір переваг в порівнянні з іншими, що базуються на основі вивчення поліморфізму довжини інтронів. Зокрема, висока міжвидова універсальність, що базується, з одного боку, на високому консерватизмі фланкуючих інтрон ділянок екзонів β -тубуліна, до яких підібрані праймери, а з іншого боку – на виродженості праймерів [5], що поєднується з великою кількістю в геномі "housekeeping" генів β -тубуліну. На відміну від інтронів багатьох інших генів інтрони β -тубулінів мабуть відіграють певну регулюючу роль, тому їх еволюція йде повільніше, ніж у багатьох інших інтронних послідовностей [13, 36, 56, 84]. Однією з переваг використання інтронів тубулінів в царстві рослин є кластерна структура генів β -тубуліну з гомологічними послідовностями у кожного фланкуючого екзона. Це робить ТВР навіть більш ефективним для попередньої або прискореної оцінки генетичної різноманітності, ніж популярні AFLP або SSR поліморфізми, для яких необхідна значна попередня інформація про структуру геному.

1.3.1. Принцип роботи методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну

Метод поліморфізму довжини інтронів (ТВР) заснований на наявності інтрон-специфічного ДНК-поліморфізму у рослинних генів родини β -тубуліну [5]. β -тубулін разом з α -тубуліном є ключовою складовою мікротрубочок –

цитоскелетних структур, що беруть участь в основних процесах поділу і росту клітин еукаріотів [90, 101]. У зв'язку з цією ключовою роллю їх первинна амінокислотна послідовність досить консервативна у всіх еукаріотичних організмів. Кожен вид містить певну кількість генів β -тубуліну, які утворюють родину даних генів [77, 78, 83]. У рослинах, майже всі гени β -тубуліну мають загальну геномну організацію: два інтрони, розташованих в чітко фіксованих локусах в межах кодуєчих екзонів (виняток – гени β -тубуліну *ZeamatUB1* у кукурудзи та *OryzaTUB2* рису [5], в яких присутній тільки перший інтрон). Характерно, що у всіх рослин перший (I-ий) інтрон β -тубуліну починається з 397-го нуклеотиду після стартового кодону АТГ. З обох боків цей інтрон оточують відносно консервативні ділянки екзонів. Схематичне представлення локусу гена β -тубуліну рослин і зони, що ампліфікуються, наведені на Рис. 1.3. Екзони генів, що кодуєть β -тубулін, консервативні, в той час як інтрони тубулінів відносяться до гіперваріабельних ділянок генів і можуть мати різну довжину [5, 14]. Підібравши до цих консервативних ділянок екзонів на межі з інтронами праймери, можна за допомогою полімеразної ланцюгової реакції отримати багато копій послідовностей, що знаходяться між ними, тобто, інтронів. Поліморфізм спостерігається в тому випадку, коли довжина інтронів у порівнюваних зразків виявляється різною.

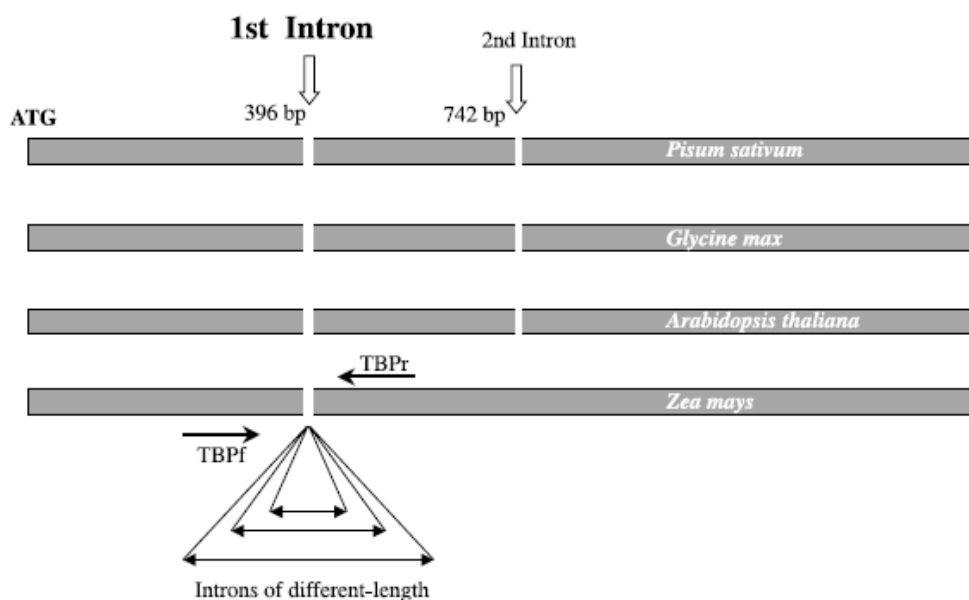


Рис. 1.3. Схема методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну [5].

Спочатку особлива увага приділялася лише першому інтрону гена β -тубуліну. До даної ділянки були підібрані наступні праймери: TBPF1: 5'-GARGCYGARAAУTGУGAYTG-3'; TBPR1: 5'-TCHGGRTAYTCУTCHCKRA T-3' [5]. Вперше TBP метод, який базується на поліморфізмі довжини I-го інтрону, був застосований [15] на рисі і надалі перевірений і успішно впроваджений для встановлення генетичних зв'язків всередині підвидів і різновидів *Brassica L.*, *Lotus L.*, *Coffea L.* [5]. У базовому TBP методі для створення характерного електрофоретичного профілю продукт ПЛР розділяється в неденатуруючому 6%-му поліакриламідному гелі [113] і візуалізується шляхом фарбування гелю нітратом срібла [7]. Фрагменти (смуги) найчастіше реєструють в бінарній системі: наявним фрагментам привласнюють значення одиниці, а відсутнім – нуля. Розмір ампліконів відповідного фрагмента визначають використовуючи ДНК-маркер.

Проте, було виявлено одне обмеження оригінального TBP методу. Воно полягає в невеликій кількості молекулярних маркерів, які були отримані для деяких видів рослин, оскільки сам метод спирається тільки на поліморфізм довжини першого інтрона гена β -тубуліну. Це обмеження може перешкодити точній оцінці таксономічної спорідненості та вимірюванню генетичних відстаней, особливо при аналізі, що виконується на найнижчому таксономічному рівні. Щоб компенсувати цей недолік, вчені успішно досліджували використання другого інтрона β -тубуліну, збільшивши тим самим диференційну здатність методу [11]. Другий інтрон присутній у переважній більшості видів рослин. Тому надалі була запропонована модифікація TBP методу – cTBP метод (combinatorial TBP, комбінований поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну) [11], яка спирається на аналіз поліморфізму довжини II-го інтрона гена β -тубуліну і поєднує в собі дані, як про поліморфізм довжини першого, так і другого інтронів (Рис. 1.4). При цьому використовуються наступні дві пари праймерів: TBPfex1: 5'-AACTGGGCBAARGGNCAУTAYAC-3' та TBPrex1: 5'-ACCATRCAУTCRTCD GCRTTYTC-3' (фланкують межі першого інтрону гена); TBPfin2: 5'-GARAAYGCHGAYGARTGYATG-3' та TBPrin2: 5'-CRAAVCCBACCATGAA RAARTG-3' (фланкують межі другого інтрону гена) [11]. Ті сорти і види, які не

могли бути диференційовані по одному інтрону, можуть бути розділені по другому. Метод сТВР (I-й інтрон та II-й інтрон) використовувався для оцінки видів і сортів *Rosa L.*, *Eleusine Gaertn.*, *Arachis L.*, *Camelina Rantz*, *Phaseolus vulgaris L.* і ряду диких трав'янистих рослин [11, 14, 16, 40].

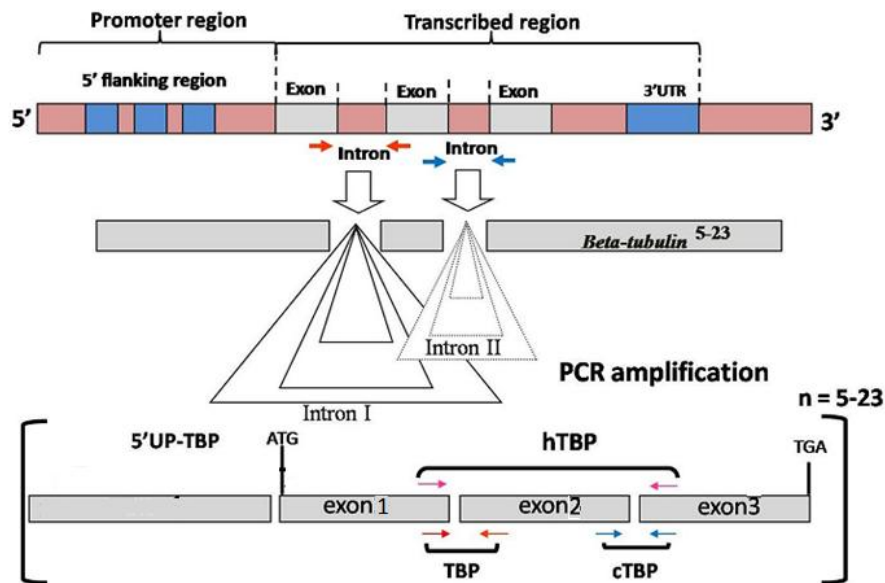


Рис. 1.4. Схема можливих варіантів аналізу поліморфізму довжин інтронів у генах β -тубуліну рослин. Стрілки вказують різні комбінації праймерів у відповідній позиції і орієнтації. Цифри 5–23 вказують на кількість можливих генів β -тубуліну рослин в межах виду [11].

У 2011 р. була запропонована нова версія ТВР, названа hТВР (horse ТВР) [39], що заснована на одночасній ампліфікації обох інтронів і екзона, який знаходиться між ними (Рис. 1.4). Кожен з генів, що кодує в рослинах β -тубулін, характеризується наявністю трьох кодуєчих екзонів, які перериваються двома інтронами, розташованими у фіксованих позиціях. Ампліфікація двох інтронів виходить з використанням вироджених сумішей праймерів, призначених для екзонів на межі з інтронами. Комбінації праймерів, спочатку розроблені для селективної ампліфікації або I-го інтрону (ТВР), або II-го інтрону (сТВР), можуть використовуватися разом у тих же експериментальних умовах ПЛР. Це дає супутнє посилення двох інтронів з утворенням більшої кількості маркерів з того ж

локусу гена. Використовується всього одна пара вироджених праймерів: *TBP-F*: 5'-AACTGGGCBAARGGNCAУТАУАС-3' та *TBP-R*: 5'-CRAAVCCBACCATG AARAARTG-3' [39]. Даний метод був використаний для характеристики представників роду *Camelina* [39].

Останнім часом автори методу пропонують використовувати для розділення отриманих фрагментів капілярний електрофорез (СЕ-ТВР, в якості джерела поліморфізму використовують І-ий інтрон), що дозволяє отримувати більш точні і легше відтворювані дані [10, 40, 42].

1.3.2. Генотипування рослин за допомогою методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну

На даний момент з використанням різних ТВР-маркерів досліджені представники мінімум 12 родин вищих покритонасінних рослин (див. Додаток А) та ведуться дослідження представників голонасінних рослин [102]. В основному дослідження Брев'ярію [5] з колегами зосереджені на дводольних трав'янистих рослинах, що також стало однією з причин дослідження придатності ТВР для злаків і деревних рослин. Найбільш вдалим ТВР-аналіз може виявитися у дослідженні генетичного різноманіття та філогенетичних взаємовідносин у перехреснозапильних покритонасінних рослин. Наприклад, у видів *Achillea leptophylla* та *A. glaberrima*, вдалося виявити внутрішньовидовий поліморфізм, а саме: 230 п.н. – у *A. leptophylla*, 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н. – у *A. glaberrima* та *A. leptophylla* [103]. Слід зазначити, що, наприклад, під час дослідження різних сортів *Brassica napus* L. var. *napus* завдяки ТВР було виявлено 13 поліморфних зон в інтервалі (205 – 275 п.н.). Встановлено чіткий збіг між специфічними смугами (зонами) та певними індивідами культиварів [5]. Досліджуючи ТВР у *Coffea arabica* L., *C. eugenioides* S.Moore та *C. canephora* Pierre ex A. Froehner за допомогою ТВР вдалося виявити внутрішньовидовий поліморфізм у *C. canephora*, тоді як він був відсутній у *C. arabica*. В цілому для цих трьох видів було виявлено 7 смуг у діапазоні 587 – 1000 п.н. ТВР метод

дозволив чітко диференціювати всі три види, а також підтвердити гіпотезу, що *C. eugenoides* є одним з прабатьків *C. arabica* [5]. Результати проведеного кластерного аналізу на базі ТВР у *Rosa* ssp. продемонстрували узгодженість результатів досліджень з напрямками селекційних програм для 20 різновидів *Rosa*, які мали різні властивості і були виведені для різних цілей [11].

Для перевірки сТВР методу, були розглянуті види трьох родів, що належать до різних родин однодольних і дводольних рослин: *Brassica* (*Brassicaceae*), *Eleusine* (*Poaceae*), *Arachis* (*Fabaceae*). Ріпак був використаний для перехресних порівнянь з даними, отриманими з використанням оригінального ТВР методу [5]. Рід *Eleusine* був використаний для уточнення ступеня спорідненості між різними видами, зокрема між диким типом *E. coracana* ssp. *africana* і домашнім *E. coracana* ssp. *coracana*. Різні сорти *Arachis* – для філогенетичного аналізу та побудови дендрограми. Аналіз здійснювався в одному гелі. Крім того, відмінності легко виявляються не тільки у різних видів, але також і між зразками одного виду.

Останнім часом ведуться розробки по застосуванню ТВР методу для ідентифікації видів, які є компонентами складних комерційних рослинних сумішей. Це може бути використано в харчовому аналізі при встановленні складу продуктів рослинного походження, виявленні різних алергенів, збудників, продуцентів токсинів тощо. Уже проаналізовані рослинні суміші, що містять пшеницю, ячмінь, сою, кукурудзу, люцерну та соняшник [42, 106, 107].

Разом з тим, ТВР може бути використаний як молекулярно-генетичний маркер і у деревних рослин [102, 103, 144]. Якщо в рішенні біотехнологічних і селекційних питань сільськогосподарського виробництва вже давно застосовуються молекулярно-генетичні маркери, то в лісорозведенні вони практично не використовуються. Молекулярні маркери дозволяють картувати гени кількісних ознак у ряду видів деревних рослин. Такі дослідження проводяться в першу чергу щодо ознак, які мають значний економічний інтерес, а саме – швидкість росту, якість деревини, стійкість до екстремальних умов середовища, захворювань і шкідників. Цей важливий, добре розвинений в західних країнах напрямок популяційної генетики лісоутворюючих деревних

рослин зовсім не використовується в Україні. Як свідчить світовий науковий досвід, визначення генетичного поліморфізму аборигенних видів деревних рослин, їх популяційно-генетичної структури, її відтворення в насінному потомстві і система схрещування, є тільки початковим рівнем для отримання інформації про розподіл адаптивної мінливості складних ознак на мікро- і макрорівнях. У зв'язку з цим досліджується можливість застосування ТВР методу для деревних рослин. Ведеться вивчення таких видів як *Quercus robur* L., *Fagus* L., *Ulmus* L., *Betula* L., *Acer* L., *Picea* D. Don ex Loudon, *Pinus* L [102]. Встановлено, що за допомогою аналізу поліморфізму довжини тільки першого інтрона гена β -тубуліну у *Q. robur* відрізняються рослини всередині однієї популяції. Розміри ампліконів варіюють в межах приблизно від 295 п.н. до 1820 п.н. Для *Fagus* L. і *Pinus* L. діапазон ампліконів становить 300–3500 п.н. і 300–3000 п.н., відповідно.

Поліморфізм довжини інтронів тубуліну слід розглядати як успішний приклад ІЛР-маркерів, який базується на оцінці цільових послідовностей, що широко представлені у рослин, і найчастіше дає специфічний багатосмуговий «штрих-код» будь-якого рослинного виду [5, 11, 41, 103]. При цьому немає необхідності в отриманні будь-якої попередньої інформації про геном рослини.

В цілому, можна зробити висновок, що метод поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну є новим, доступним інструментом для молекулярно-генетичного аналізу та селекційної роботи. Однак його розширене використання потребує верифікації на рослинах, що належать до різних таксономічних одиниць.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Рослинний матеріал

Оскільки метод оцінки поліморфізму довжини інтронів родини генів β -тубуліну (ТВР, tubulin base polymorphism) є новою системою молекулярно-генетичного аналізу рослин, його розширене використання потребує додаткових досліджень та оцінки застосування на різних таксономічних рівнях, особливо при використанні в молекулярно-генетичних дослідженнях. В зв'язку з цим як рослинний матеріал були обрані різні представники однодольних (родина *Poaceae*) та дводольних (родина *Brassicaceae* та *Linaceae*) рослин.

Загалом в роботі було використано наступний рослинний матеріал:

1. Пальчасте просо (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) та гусяча трава (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.).

Зокрема було досліджено два сорти (Тропіканка і Євгенія) *E. coracana*, отримані методами класичної селекції [157], два соматоклональних варіанти (SE-1, SE-4) *E. coracana* [Баєр 2009], які було отримано від сорту Тропіканка, та три генотипи *E. indica*, один з яких є природною популяцією виду *E. indica*, а два (*E. indica* 4A-21, *E. indica* 4A-1) є стійкими до дії динітроанілінових гербіцидів і були люб'язно надані проф. У. В. Баярдом (Мічиганський Університет, США).

2. Егілопс (*Aegilops biuncialis* Vis., синоніми *Ae. lorentii* Hochst., *Ae. macrochaeta* Schuttl. et Huet, *T. lorentii* (Hochst), *T. macrochaetum* (Schuttl. et Huet) K. Richt, *T. biunciale* K. Richt).

Для аналізу було взято насіння 15 різних кримських популяцій *Ae. biuncialis*. Кожному зразку надали свій порядковий номер, наведений в Табл. 2.1 з даними про походження популяції, колір та опушення колоскових лусок.

Таблиця 2.1

Характеристика вибірок з кримських популяцій *Ae. biuncialis*

Н/п	Зразок <i>Ae. biuncialis</i>	Походження	Опушення колоскових лусок	Колір колоскових лусок
1	NK_02	Не відомо	Опушені	темний
2	NK_010	Кара-Даг	Неопушені	світлий
3	NK_B1-1	Піщане	Неопушені	світлий
4	NK_11-2	Кара-Даг	Неопушені	світлий
5	NK_MM7-3	Мис Мартьян	Неопушені	світлий
6	NK_MMB-1	Мис Мартьян	Неопушені	світлий
7	NK_13-1	Кара-Даг	Неопушені	світлий
8	NK_50	Кара-Даг	Середньоопушені	темний
9	NK_6-2	Берегове	Неопушені	світлий
10	NK_4N2	Берегове	Неопушені	світлий
11	NK_1-I	Мис Мартьян	Опушені	темний
12	NK_OZ-2	Аю-Даг	Опушені	темний
13	NK_10-3	Кара-Даг	Опушені	темний
14	NK_MM2-1	Мис Мартьян	Неопушені	світлий
15	NK_14-12	Кара-Даг	Неопушені	світлий

3. Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* E. Desv.)

Для порівняльного аналізу в цій роботі використовували рослини *D. antarctica* з острівних популяцій, які походять з двох географічно віддалених регіонів морської Антарктики, а саме, з району Аргентинських островів (о. Галіндез (узвиштя Купол), о. Скуа (S22), о. Великий Ялур (Y66), мис Расмуссен (R35), о. Дарбо (DAR12)) та з о. Кінг-Джордж (Південні Шетлендські острови) (два зразки з оазису Поінт Томас, район польської антарктичної станції «Генрик Арцтовський», та одна проба з півострова Келлера, район бразильської станції «Команданте Ферраз»). Матеріал був зібраний учасниками IX (2004/05), XI (2006/07), XII (2007/08) та XV (2010/11) Українських антарктичних експедицій та І. А. Козерецькою під час сезонної роботи на станції «Генрик Арцтовський» (2005/06).

4. Ячмінь звичайний (*Hordeum vulgare* L.).

До аналізу було залучено 30 сортів ячменю вітчизняної селекції. Кожному сорту присвоювали порядковий номер, який наведено у Табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Список сортів рослин *H. vulgare*, задіяних в дослідженні

№	Сорт	№	Сорт	№	Сорт
1	Дружба	11	Паллідум 107	21	Адапт
2	Одеський 100	12	Одеський 131	22	Галатея
3	Вестнік	13	Одеський 151	23	Галактик
4	Одеський 111	14	Престиж	24	Зоряний
5	Романтик	15	Дерибас	25	Південний
6	Тайфун	16	Переможний	26	Південний
7	Одеський 115	17	Гамбринус	27	Гетьман
8	Ітиль	18	Едем	28	Оболонь
9	Прерія	19	Сталкер	29	Чудовий
10	Рось	20	Незалежний	30	Селеніт

5. Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.).

Для аналізу було використано 7 сортів пшениці вітчизняної селекції, а саме Харківська 30, Безоста 1, Етюд, Елегія, Харківська 26, Миронівська 808, Колективна.

6. Рижій посівний (*Camelina sativa* (L.) Crantz.).

Для аналізу використали високопродуктивні олійні сорта та сортозразки рижю посівного, отримані у відділі нових культур Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка, серед яких: сортозразки ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-Ч, ФЕОРЖЯФ-ЧП, ФЕОРЖЯФ-Д та сорти Перемога, Євро-12, а також сорти Міраж та Клондайк селекції Інституту олійних культур НААН України.

7. Різні види роду *Linum* L. та сорти льону-довгунця.

Матеріалом для дослідження слугували види льону: льон-довгунець *L. usitatissimum*, льон багаторічний *L. perenne* L., льон-кудряш *L. humile* Mill. (*L. humile* cv. *Орфей* і *L. humile* cv. *Еврика*), льон вузьколистий *L. angustifolium* Huds. і льон дворічний *L. bienne* Mill.

В подальшому використовували сорти з різних селекційних груп: Хейя 15 (Китай); Хейя 13 (Китай); Светоч (Росія); Світанок (Україна); Антей (Росія); Zenga (Нідерланди); Глазур (Україна).

Крім того, було досліджено (на між- та внутрішньосортовому рівнях) 16 сортів льону української селекції, люб'язно наданих Інститутом луб'яних культур НААН України. Назви сортів разом з даними про їх походження наведені в Табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Сорти *L. usitatissimum* української селекції

№ п/п	Назва сорту	Оригінатор
1	Есмань	ДСЛК*
2	Чарівний	ДСЛК
3	Зоря 87	Інститут Карпатського регіону
4	Сіверський	ДСЛК
5	Каменяр	Інститут Карпатського регіону
6	Журавка	Інститут сільського господарства Полісся
7	Глухівський ювілейний	ДСЛК
8	Іванівський	ННЦ «Інститут землеробства»
9	Глобус	ДСЛК
10	Вручий	ННЦ «Інститут землеробства»
11	Глазур	ДСЛК
12	Міандр	Інститут Карпатського регіону
13	Рушничок	ННЦ «Інститут землеробства»
14	Гладіатор	ДСЛК
15	Надія	Інститут сільського господарства Полісся
16	Глінум	ДСЛК

Примітка *ДСЛК – Дослідна станція луб'яних культур Інституту сільського господарства Північного Сходу НААН

Через те, що Білорусь має дуже давню історію вирощування льону та володіє великою колекцією стародавніх сортів льону (ландрас), були досліджені білоруські ландраси *L. usitatissimum*: 24 – довгунцевого, 3 – олійного, 2 – довгунцево-олійного типів, 2 зразки стародавнього сорту та 1 зразок поліпшеного сорту (див. Табл. 2.4).

Таблиця 2.4

Список білоруських ландрас льону, використаних в дослідженні

№	Назва сорту	№	Назва сорту
1	<i>L. usitatissimum</i> K-594	17	<i>L. usitatissimum</i> K-1431
2	<i>L. usitatissimum</i> K-790	18	<i>L. usitatissimum</i> K-783
3	<i>L. usitatissimum</i> K-5330	19	<i>L. usitatissimum</i> K-1430
4	<i>L. usitatissimum</i> K-5455	20	<i>L. usitatissimum</i> K-5452
5	<i>L. usitatissimum</i> K-5451	21	<i>L. usitatissimum</i> K-6221
6	<i>L. usitatissimum</i> K-5460	22	<i>L. usitatissimum</i> K-5475
7	<i>L. usitatissimum</i> K-5476	23	<i>L. usitatissimum</i> K-5453
8	<i>L. usitatissimum</i> K-6212	24	<i>L. usitatissimum</i> K-5483
9	<i>L. usitatissimum</i> K-5465	25	<i>L. usitatissimum</i> K-5991
10	<i>L. usitatissimum</i> K-1453	26	<i>L. usitatissimum</i> K-5990
11	<i>L. usitatissimum</i> K-1424	27	<i>L. usitatissimum</i> K-5992
12	<i>L. usitatissimum</i> K-1042	28	<i>L. usitatissimum</i> K-603
13	<i>L. usitatissimum</i> K-186	29	<i>L. usitatissimum</i> K-604
14	<i>L. usitatissimum</i> K-777	30	<i>L. usitatissimum</i> K-37
15	<i>L. usitatissimum</i> K-780	31	<i>L. usitatissimum</i> K-6601
16	<i>L. usitatissimum</i> K-4219	32	<i>L. usitatissimum</i> K-7236

2.2. Біоінформаційний аналіз екзон-інтронної структури генів β -тубуліну

Серед обраних для дослідження рослин, лише для пшениці та ячменю є дані повного сиквенування геному. На даний момент у базі даних Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) не міститься жодної достовірно анотованої послідовності β -тубулінів, закодованих у геномі льону. Що стосується злаків, то в

цій базі даних наразі знаходиться 5 анотованих послідовностей β -тубуліну пшениці і лише 1 анотована послідовність β -тубуліну ячменю. Як правило, у геномах вищих рослин міститься від 3 до 11 ізотипів β -субодиниць тубулінів, довжиною 445 – 447 амінокислотних залишків [9].

На основі п'яти, віднесених до послідовностей β -тубуліну пшениці, однієї анотованої послідовності ячменю та однієї послідовності β -тубуліну *A. thaliana*, а саме – ізотипу beta-1 (TBB1_ARATH) за допомогою інструменту BLASTN нами було проведено пошук передбачених генів білків β -тубуліну, доступних у базі даних Phytozome v12.1. (www.phytozome.net) у геномах пшениці, ячменю та льону, відповідно [130]. Для пошуку було використано налаштування програми BLASTN за замовчуванням. Відбір гомологів був заснований на відсоткових показниках ідентичності і подібності генів, а також на повноті нуклеотидних послідовностей і трансльованих продуктів. Для множинного вирівнювання досліджуваних нуклеотидних сіквенсів були використані програми Clustal 2.0 і UGENE [72, 92]. Відібрані нами в ході аналізу послідовності використовували для візуалізації екзон-інтронної структури за допомогою програми Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>).

Для ТВР та сТВР-аналізу *D. antarctica* необхідно було здійснити дизайн пари специфічних праймерів. Тобто необхідно було розробити специфічну пару праймерів для *D. antarctica* з метою проведення більш точного ТВР або сТВР-аналізу даного організму. На даний час в базі даних Gene Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) наявна інформація про послідовність кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (HM208297), яка є неповною, оскільки має довжину 917 п.н. та кодує лише 304 амінокислотних залишки, в той час як повний поліпептидний ланцюг β -тубуліну складається з 450 амінокислотних залишків. З метою розроблення специфічних праймерів для оцінки поліморфізму хоча б одного з інтронів генів β -тубуліну *D. antarctica* спочатку за допомогою подвійного вирівнювання у програмі ClustalX 2.0.11 [72] визначили ділянки екзонів, які належить кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (HM208297). При вирівнюванні як референсні використовували послідовності генів β -тубуліну з

бази даних Phytozome v9.1 (www.phytozome.net) різних видів вищих рослин, а саме: *Arabidopsis thaliana* – tubulin beta-1 (P12411_TBB1_ARATH та *Oryza sativa* – Os01g18050, для яких відома екзон-інтронна структура цього гену. В результаті попарного вирівнювання встановлено високий ступінь гомології двох ділянок (довжиною 240 та 677 п.н.) кДНК *D. antarctica* з фрагментами другого та третього екзонів генів β -тубуліну *A. thaliana* та *O. sativa*. Надалі було підбрано пару специфічних сТВР праймерів для оцінки поліморфізму II-го інтрону генів β -тубуліну *D. antarctica* за допомогою програми PrimerBlast [146].

2.3. Виділення рослинної ДНК та визначення її концентрації

Виділення ДНК з проростків або насіння досліджуваних рослин проводили згідно дещо модифікованого ЦТАБ методу [26, 111]. Для цього тканину (проросток або вимочене у воді насіння), приблизно 250 – 300 мкг, клали в 1,5 мл пластикову пробірку типу «Eppendorf» та розтирали з рідким азотом до стану пудри за допомогою спеціального пестика. До розтертої тканини додавали 350 мкл 2хЦТАБ (2%-вий СТАВ, 1,4 М NaCl, 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 20 мМ EDTA) добре перемішували та ставили до термостату на 65°C та інкубували протягом 1 год. В період термостатування суміш зрідка перемішували. Після цього лізат центрифугували протягом 10 хв при 10 000 об./хв. Супернатант обережно знімали та переносили до нових пробірок, додавали рівний об'єм суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1 за об'ємом) та перемішували до утворення суспензії. Центрифугували протягом 10 хв при 10 000 об./хв. Знімали водну верхню фазу, переносили до нових пробірок та додавали 0,2 об'єму 5хЦТАБ (5%-вий СТАВ, 350 мМ EDTA). Обережно перемішували та ставили до термостату при 65°C на 10 хв. Додавали рівний об'єм хлороформу та ретельно перемішували. Знов центрифугували протягом 10 хв при 10 000 об./хв. Надосадкову рідину (верхню фазу) знімали та переносили у нові пробірки. Додавали 3 об'єми буферу для преципітації (1%-вий СТАВ, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 10 мМ EDTA), перемішували та залишали на ніч за умов нормальної

температури. Після цього центрифугували протягом 10 хв при 16000 об./хв. при 4°C. Супернатант видаляли, а осад розчиняли у 300 мкл 1,2 М NaCl. Додавали 300 мкл хлороформу та ретельно перемішували до утворення суспензії. Центрифугували протягом 10 хв при 16000 об./хв. при 4°C. Надосадкову рідину переносили у нові пробірки та додавали 0,6 об'єму охолодженого ізопропанолу (утворювався каламутний розчин). Центрифугували протягом 10 хв при 16000 об./хв. при 4°C. Обережно зливали супернатант, до осаду додавали 250 мкл 70%-вого етилового спирту. Центрифугували протягом 10 хв при 16000 об./хв. при 4°C. За допомогою піпетки обережно видаляли спирт, а від залишків спирту позбавлялися за допомогою термостату (сушили ДНК при 65°C). До осаду додавали 50 мкл бідистильованої води.

Якість і кількість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5%-вому агарозному гелі і спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» у бідистильованій воді з визначенням концентрації і ступеня забруднення ДНК. Зразки ДНК зберігали при -20°C.

2.4. Проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в мікропробірках на 200 мкл в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль MgCl₂, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мм кожного дНТФ, 0,5 од. Taq полімерази («Fermentas», Литва).

ТВР-аналіз та його модифікації виконували згідно методики [5]. Послідовності праймерів наведені нижче у Табл. 2.5. Для SSR-аналізу льону була обрана пара праймерів, запропонована раніше, оскільки вона має досить великі значення PIC: 0,750 та 0,625, відповідно [93].

Опис використаних праймерів

Метод	Праймери (5' - 3')		Т, °C	Джерело
	F	R		
TBP	AACTGGGCBAARGGNCA YTAYAC	ACCATRCAYTCTCD GCRTTYTC	55	[12]
cTBP	GARAAYGCHGAYGARTG YATG	CRAAVCCBACCATGA ARAARTG	55	[11]
hTBP	AACTGGGCBAARGGNCA YTAYAC	CRAAVCCBACCATGA ARAARTG	55	[39]
SSR Lu_1	TCATTCATCTCCTTCCAC TAAAA	TTGAAAGCCCTAGTA GACACCA	58	[93]
SSR Lu_25	TCTACAGAGTTCAATTC CCGTA	GTTGGACCTTACAAG ACTCACTG	58	[93]

Ампліфікацію проводили за наступним протоколом:

- для TBP- та cTBP-аналізу: початкова денатурація (94°C) – 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація при 94°C – 30 с, відпал праймерів при 55°C – 40 с, елонгація при 72°C – 1,5 хв), кінцева елонгація при 72°C – 8 хв, утримання при 15°C [5];

- для hTBP- аналізу: початкова денатурація (94°C) – 4 хв, а потім 14 циклів (30 с при 94°C, 45 с при 65°C (зниження на 0,7°C в кожному циклі від початкового до кінцевого значення), та 2,5 хв при 72°C), потім 15 циклів (30 с при 94°C, 30 с при 55°C та 2,5 хв при 72°C), кінцева елонгація при 72°C – 8 хв, 15°C – утримання [39];

- для SSR-аналізу: початкова денатурація (95°C) – 4 хв, 32 цикли ампліфікації (денатурація при 95°C – 1 хв, відпал праймерів при 58°C – 1 хв, елонгація при 72°C - 1 хв), кінцева елонгація при 72°C – 7 хв, утримання при 15°C [93].

Кожну ПЛР проводили як мінімум у двократній повторності з використанням негативного контролю, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації.

2.5. Електрофорез та візуалізація продуктів ампліфікації

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою методу вертикального неденатуруючого електрофорезу в 6%-вому поліакриламідному гелі (ПААГ) на пластинках розмірами 200 x 200 x 1 мм. Для виготовлення 6 %-вого ПААГ об'ємом 40 мл використовували: 2,32 г акриламідну та 0,08 г бісакриламідну (тобто 8 мл 30% акриламідну), 4 мл 10 x TBE (0,89 М Tris base, 0,89 М H_3BO_3 , 20 мМ EDTA, pH 8,0), 28 мл бідистильованої H_2O , 400 мкл 10%-вого персульфату амонію та 20 мкл TEMED [113]. Перед нанесенням на гель до реакційної суміші додавали 10x буфер для нанесення (0,1% ксилен-ціанол, 0,1% бромфеноловий синій, 0,5% лаурилсульфат натрію, 0,1 М EDTA pH 8,0, 50% гліцерин). До 10 мкл реакційної суміші додавали 2 мкл буфера, тобто 0,2% (w/v). У лунки гелю наносили по 1–3 мкл реакційної суміші. Електрофорез проводили за постійної напруги 350 В протягом 2–3 год в 1xTBE (89 мМ Tris base, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ EDTA, pH 8,0) буфері в залежності від молекулярної маси фрагментів, що аналізувалися.

Візуалізацію фрагментів проводили шляхом фарбування нітратом срібла [7]. Гель з приладу переносили в кювету, додавали 250 мл розчину 10%-вого етанолу та 0,5%-вої оцтової кислоти (10–12°C), накривали склом та інкубували похитуючи протягом 3 хв. Зливали перший розчин та проводили експозицію в 250 мл розчину азотнокислого срібла (0,15% AgNO_3 , 0,08% формалін), інкубували на денному світлі похитуючи протягом 3–5 хв. Зливали другий розчин, швидко 1–2 рази рясно промивали бідистильованою водою та додавали 250 мл відновлюючого розчину (1,5% NaOH, 0,08% формалін (перед кожним використанням додавали 1 мл/л формаліну (40%)), інкубували на денному світлі похитуючи до розвитку фарбування (приблизно 3–7 хв, проте швидкість забарвлення напряму залежить від температури третього розчину). Зливали третій розчин та обробляли гелеву пластину 5% льодяною оцтовою кислотою до зупинки фарбування (приблизно 1 хв). На заключному етапі гелеву пластину промивали бідистильованою водою протягом 2 хв.

Забарвлені гелюві пластини фотографували цифровою відеокамерою. Аналіз зображень проводили з використанням програми GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину відтворюваних і найбільш чітких фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

2.6. Статистичний аналіз даних

Ампліфікацію фрагментів інтронів генів β -тубуліну проводили мінімум два рази. Якщо результати ПЛР збігалися, то враховували всі фрагменти (смуги). Якщо результати відрізнялися, то проводили повторну ампліфікацію і враховували лише подібні для всіх ПЛР фрагменти. У всіх випадках оцінювали тільки відтворювані і чіткі смуги. Смуги реєстрували згідно бінарної системи: присутнім фрагментам присвоювали значення одиниці, відсутнім – нуля.

Коефіцієнт подібності Нея та Лі [89] та стандартну генетичну дистанцію Нея [88] між генотипами визначали за допомогою програми FreeTree [99] 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 було проведено бутстреп (bootstrap) аналіз [47] для 1000 повторностей. Тобто цей аналіз вказує ймовірність відповідного галудження в побудованій дендрограмі. Отримані дендрограми візуалізували за допомогою програми FigTree v1.4.2 [110]. Для оцінки поліморфізму SSR- та TBP-локусів 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 TBP, f_a – частота фрагментів, в яких відсутній i -й фрагмент, а f_b – частота фрагментів, в яких присутній i -й фрагмент [12, 48].

Для SSR- та TBP-аналізу у випадку, коли необхідно було порівняти ці два методи, використовували наступну формулу 2:

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

де p_i – частота присутності i -го алельного фенотипу у вибірці, n – загальна кількість різних алельних фенотипів [2]. Зважаючи на складність визначення частот алелей конкретного TBP-локусу, при розрахунку PIC замість частот алелей використовували показник частоти алельних фенотипів [68].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у видів роду *Eleusine L.*

Рід *Eleusine* невеликий, об'єднує близько 10 видів одно- і багаторічних рослин родини злакових, що зустрічаються в тропічних і субтропічних країнах Азії і Африки. На особливу увагу заслуговує пальчасте просо (*E. coracana*). З давніх часів *E. coracana* вважається цінною зерною і кормовою культурою в Африці та Індії. Для багатьох народів тропічної Азії та Африки вона є основною їжею, що замінює рис, просо, сорго. У Південній Африці *E. coracana* використовують і як лікарську рослину. У посушливих і напівпосушливих районах Південно-Східної Азії, Індії, Індонезії, Африки, Китаю, Японії, Південної і Північної Америки *E. coracana* займає значні посівні площі. Однак попри всі ці переваги культура довгий час ігнорувалась. Проте останнім часом у зв'язку з розвитком геномних ресурсів, розуміння механізмів стресостійкості та використання генів для покращення зернових культур, її почали активно досліджувати та впроваджувати в сільське господарство і в ряді європейських країн [55]. Зрошувані землі півдня України, північного Кавказу і частково Середньої Азії визнані перспективними для вирощування пальчастого проса як зернофуражної посухостійкої культури. В Україні ця культура інтродукована в Національному ботанічному саду ім. М. М. Гришка НАН України [142]. Елевсина індійська або гусяча трава (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) є диким родичем Елевсини коракан. Вона широко поширена в дикому вигляді в тропічних країнах [142]. Як бур'ян зустрічається в Закавказзі, Середній Азії та Америці. Була оцінена як п'ятий найгірший бур'ян у світі [112]. Проте насіння та молоді рослини гусячої трави їстівні, тому вона є кошовною кормовою рослиною.

Відомо, що *E. coracana* є тетраплоїдом ($2n=4x=36$) та за морфологічними ознаками подібна до *E. indica* ($2n=18$) та *E. africana* ($2n=36$). Результати цитологічного аналізу свідчать про те, що *E. indica* є донором одного з геномів

(AA) для культурного виду *E. coracana* (AABB) [24]. На сьогодні вже є роботи, де за допомогою молекулярних маркерів (здебільшого SNP, SSR, ISSR) охарактеризовано ці види [3, 31, 45, 46, 70, 96, 118, 141], проте робіт із застосуванням ІЛР-маркерів для цих рослин майже немає [12]. Крім того, на даний момент недостатньо інформації щодо будови геному пальчастого проса, що дуже обмежує дослідження її генетичного поліморфізму та диференціації за допомогою молекулярно-генетичних маркерів. Тому оцінка філогенетичних взаємовідносин між цими видами, а також генетичного поліморфізму за допомогою молекулярно-генетичних маркерів, особливо на основі поліморфізму інтронів, що не потребують попередньої інформації про геном рослини, є дуже актуальним завданням [141].

Використання ТВР методу продемонструвало значну диференціюючу здатність на сортах української селекції роду *Eleusine* (Рис. 3.1). Було проаналізовано 2 сорти (Тропіканка, Євгенія) та два соматоклональні варіанти (SE-1, SE-4) *E. coracana*, а також 2 генотипи (CAL 4A-21, CAL 4A-1) та 1 дика (природна) популяція *E. indica*. При цьому, хоча частина ампліконів є однаковою для всіх зразків, вірогідно через те, що вони є специфічними для роду *Eleusine*, відмінності легко помітні як між різними видами, так і між сортами в межах одного виду. 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., 1190 п.н., а у *E. indica* – 1410 п.н., 830 п.н., 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 *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., 540 п.н., 735 п.н.

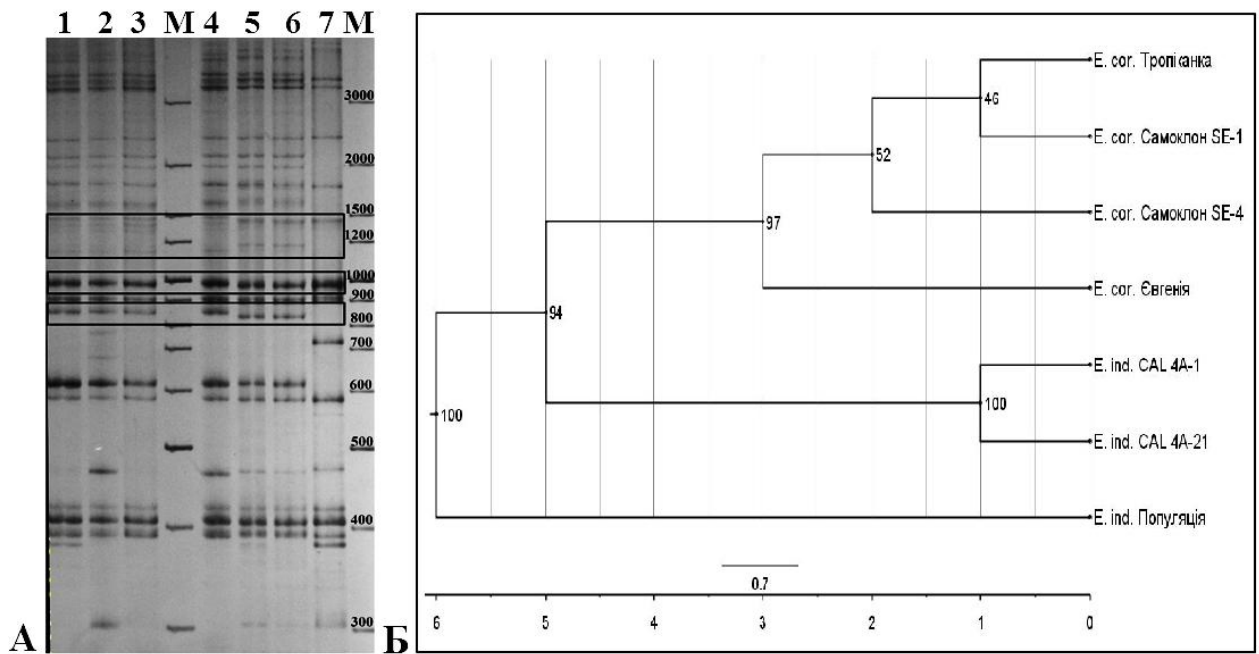


Рис. 3.1. А – Електрофореграма з ампліконами інтронів гена β -тубуліну *Eleusine*. Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; к – контроль; 1–7 (у верхній частині малюнка) – номери зразків. 1–4: *E. coracana* (Тропіканка, Євгенія, соматональні варіанти SE-4 та SE-1), 5–7: *E. indica* (CAL 4A-21, CAL 4A-1, природна (дика) популяція);

Б – Дендрограма UPGMA, побудована на даних поліморфних ТВР-фрагментів *Eleusine*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Таким чином, для диференціації рослин роду *Eleusine* достатньо використання лише I-го інтрона гена β -тубуліну. Коефіцієнт подібності Нея та Лі варіює від 0,591 (між *E. coracana* Євгенія та природною популяцією *E. indica*) до 1 (між двома генотипами *E. indica* CAL 4A-21 та CAL 4A-1). Стандартна генетична дистанція Нея мінімальна (дорівнює нулю) між двома генотипами *E. indica* (CAL 4A-21, CAL 4A-1), а максимальна між *E. coracana* Євгенія та природною популяцією *E. indica* – 0,487.

Дані фінгерпринтингу за першим інтроном були використані для кластерного аналізу за допомогою методу UPGMA на основі коефіцієнта

подібності Нея та Лі. З побудованої дендрограми видно, що з одного боку, всі зразки з високою бутстреп-підтримкою диференціюються один від одного, а з іншого – групуються в два кластери (з 94% бутстреп-підтримкою). Перший кластер містить зразки *E. coracana*, а другий – *E. indica*. При цьому у межах кожного кластера спостерігається розподіл у відповідності до їх генотипової приналежності: з сортом Тропіканка об'єднуються два соматкони, які походять з даного сорту. Сорт Євгенія – найбільш віддалений в цій групі (відокремлюється від інших з 97% бутстреп-підтримкою). У групі досліджених генотипів *E. indica* дві динітроанілінстійкі лінії також об'єднуються в одну підгрупу (з 100% бутстреп-підтримкою). Найбільше з усіх зразків вирізняється генотип дикої популяції *E. indica* – він з 100% бутстреп-підтримкою виокремлюється в окрему гілку. Загалом, отримані результати збігаються з аналогічними, отриманими для цих же зразків, але за допомогою ISSR-аналізу [141]; та підтверджуються роботами з морфологічної, фізіологічної та біохімічної характеристики досліджених нами зразків соматклональних варіантів [138, 139, 155]. Таким чином, можна з впевненістю казати, що ТВР метод може бути успішно застосований для молекулярно-генетичних досліджень рослин роду Елевсина, в тому числі для маркування генотипів та оптимізації довготривалого традиційного селекційного процесу.

Результати експериментальних досліджень розділу 3.1. наведено в публікації:

1. 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).

3.2. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у егілопсу

Рід *Aegilops* L. є найближчим родичем пшениці і являє собою природний резервуар корисних ознак для поліпшення агрономічних характеристик пшениці. Наприклад, *Ae. biuncialis* Vis. ($2n = 4x = 28$ хромосом), що росте в посушливих місцях, зазвичай має генотипи з кращою, ніж у пшениці, посухостійкістю. Ці генотипи можуть бути використані при створенні посухостійких сортів пшениці за допомогою міжгенних схрещувань («intergenetic crossing») [128]. Встановлено, що деякі зразки *Ae. biuncialis* є стійкими до вірусу жовтої карликовості ячменю [79], інші – до іржі злаків [23]. Безпосередньо в селекційній роботі з передачі агрономічно корисних сільськогосподарських ознак частіше застосовуються результати часткових сиквенсів геномів рослин з важливими для дослідників ознаками. Разом з тим при зборі колекцій та оцінці генетичного різноманіття популяційних ресурсів диких видів необхідні більш прості експрес-методи, засновані на вивченні структурно-функціональної організації генів.

Саме тому важливо оцінити можливості використання поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, в генетичних дослідженнях виду *Ae. biuncialis* на основі аналізу 15 кримських популяцій цього виду, а також порівняти диференціюючу здатність ТВР методу та його модифікацій між собою на даному об'єкті.

3.2.1. Поліморфізм довжини I-го інтрону генів β -тубуліну у *Ae. biuncialis* (ТВР-аналіз)

Результати проведеного електрофоретичного аналізу дозволили виявити наявність смуг (ампліконів – ділянок інтронів β -тубуліну) довжиною приблизно від 395 п.н. до 3900 п.н. При цьому більш чіткі, відтворювані смуги візуалізуються в 4 діапазонах, розташованих приблизно в районах 395–433 п.н., 673–706 п.н., 843–907 п.н., 1764–3900 п.н. У діапазоні від 1000 до 1700 п.н. спостерігаються досить нечіткі смуги, характерні для ПЛР-продуктів неповної

ампліфікації. У даній роботі ці амплікони не аналізувалися. Всього було виявлено 27 смуг, 6 з яких виявилися мономорфними для всіх 15 зразків *Ae. biuncialis*, з приблизною молекулярною масою 396 п.н., 408 п.н., 427 п.н., 860 п.н., 1766 п.н., 1885 п.н., таким чином всього було виявлено 21 поліморфний фрагмент ДНК. На Рис. 3.2 зображена електрофореграма із смугами в діапазоні від 395 п.н. до 3900 п.н., що отримані для різних зразків *Ae. biuncialis*. Всім відтворюваним поліморфним фрагментам були надані номери в порядку збільшення їх молекулярної маси (Табл. 3.1).

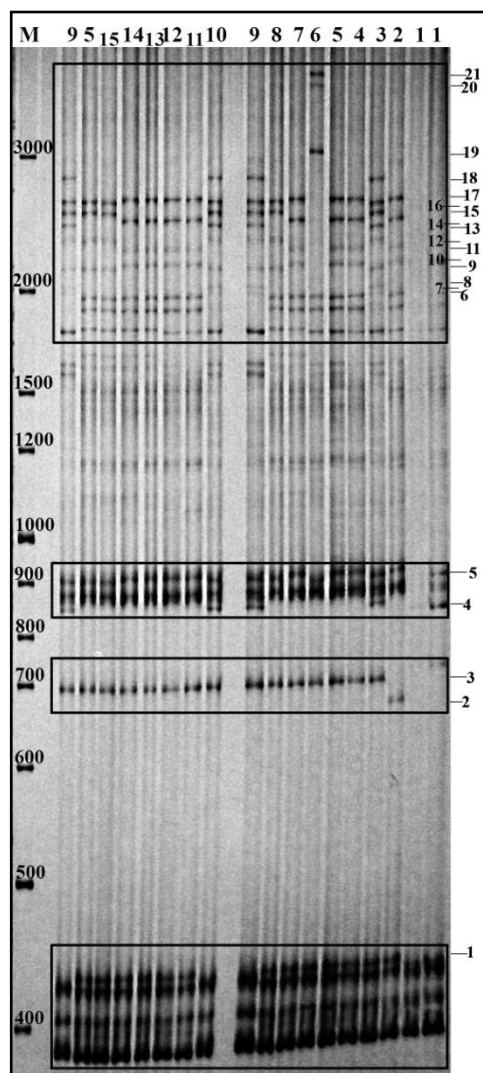


Рис. 3.2. Електрофореграма з ампліконами інтронів гена β -тубуліну досліджених кримських популяцій *Ae. biuncialis* (ТВР-аналіз). Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; 1–15 (зверху) – номери зразків; 1–21 (збоку) – номери смуг.

Більшість досліджуваних зразків характеризувались своїм специфічним набором ампліконів, відмінності між якими базуються як на присутності специфічних смуг, так і на їх відсутності. Наприклад, зразок NK_MMB-1 відрізняється від зразка NK_MM7-3 наявністю 12, 19, 20, 21 смуг та відсутністю 5, 11, 14, 17 смуг.

Дані фінгерпринтенгу за першим інтроном гена β -тубуліну були використані для здійснення кластерного аналізу за допомогою методу UPGMA (Рис. 3.3) та розрахунку значень PIC. З отриманої дендрограми видно, що більшість генотипів *Ae. biuncialis* відрізняються за своїми молекулярними профілями. Середнє значення PIC (за формулою 1 для біалельних маркерів) для 21 поліморфного фрагмента складає 0,320. Коефіцієнт Нея і Лі коливається від мінімуму 0,2 у зразках NK_010 та NK_B1-1 до максимуму 1.

Таблиця 3.1

ТВР-профілі досліджених зразків кримських популяцій *Ae. biuncialis*

Зразок	Номери поліморфних смуг	Зразок	Номери поліморфних смуг
NK_02	3, 4, 5, 6, 10, 11, 14, 17	NK_6-2	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 18
NK_010	1, 2, 5, 6, 10, 14, 17	NK_4N2	3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 18
NK_B1-1	1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18	NK_1-I	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17
NK_11-2	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17	NK_OZ-2	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17
NK_MM7-3	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17	NK_10-3	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17
NK_MMB-1	1, 3, 6, 10, 12, 19, 20, 21	NK_MM2-1	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17
NK_13-1	1, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 17	NK_14-12	1, 3, 5, 6, 9, 12, 15, 16
NK_50	1, 3, 5, 6, 9, 12, 15, 16	Всього	21 поліморфна смуга

Значення коефіцієнта 1 передбачуване, оскільки частина зразків має однаковий набір смуг, зокрема це стосується зразків NK_11-2, NK_MM7-3, NK_13-1, NK_1-1, NK_02-2, NK_10-3, NK_MM2-1. Результати кластерного аналізу матриць коефіцієнтів подібності Нея і Лі для ТВР методу виявили (Рис. 3.2), що в усіх реплікаціях (з 100% бутстреп-підтримкою) зразки диференціюються на дві групи (NK_50, NK_14-12, NK_B1-1, NK_6-2, NK_4N2 та

NK_MMB-1, NK_010, NK_02, NK_MM2-1, NK_10-3, NK_0Z-2, NK_1-1, NK_13-1, NK_MM7-3, NK_11-2). Цей розподіл може відображати масивний географічний бар'єр для двох груп популяцій виду. Перша група зразків характеризується високою підтримкою галуження, так зразки NK_50–NK_14-12 – 100% бутстреп-підтримки, NK_6-2–NK_4N2 – 92% бутстреп-підтримки, (NK_6-2–NK_4N2)–NK_B1-1 – 96% бутстреп-підтримки. Можливо, зразки цієї групи мають близьке географічне розташування або подібну структуру ландшафту. Друга група зразків менш структурована. В ній виокремлюються 6 зразків, що не мають явного злиття всередині групи (NK_10-3, NK_0Z-2, NK_1-1, NK_13-1, NK_MM7-3 та NK_11-2) з досить кластеризованим зразком NK_MM2-1 (87% бутстреп-підтримка), який може бути представником їх батьківської популяції. Далі йде «драбина» зі зразками NK_02, NK_010 та NK_MMB-1 з досить високою бутстреп-підтримкою. Така картина часто проявляється при розгляді міграційних процесів на популяційному рівні.

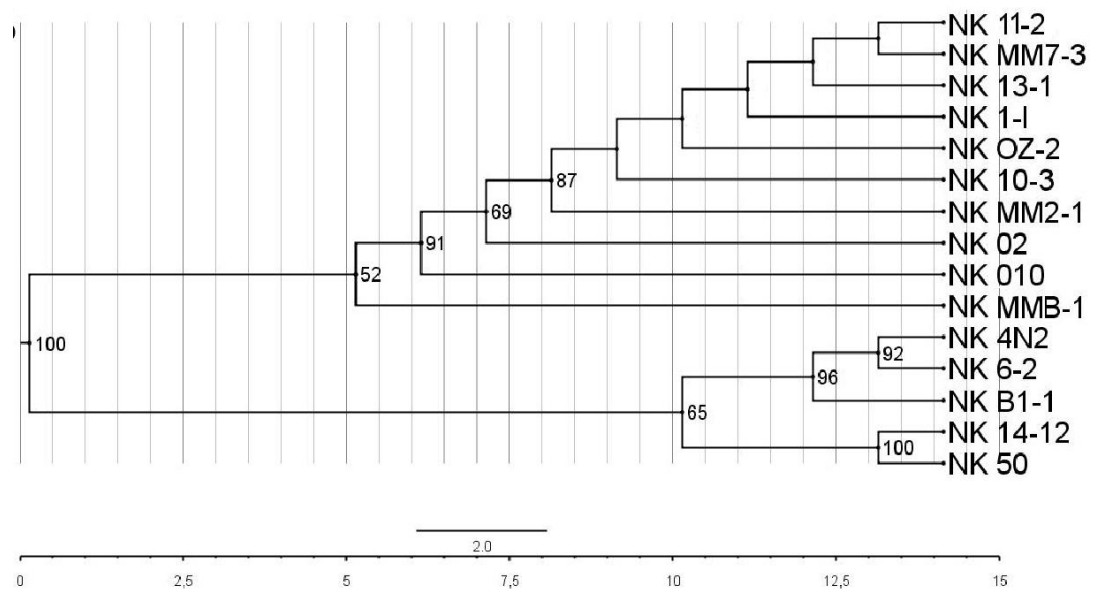


Рис. 3.3. Дендрограма UPGMA, що базується на поліморфних ТВР-фрагментах досліджених генотипів *Ae. biuncialis*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки зразків, %.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що за допомогою ТВР методу можна досить чітко виявляти поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну серед представників виду *Ae. biuncialis*.

3.2.2. Поліморфізм довжини II-го інтрону генів β -тубуліну у *Ae. biuncialis* (сТВР-аналіз)

За результатами сТВР-аналізу досліджуваних зразків *Ae. biuncialis* було виявлено 42 відтворюваних чітких фрагменти в діапазоні від 395 п.н. до 2880 п.н., 29 з яких виявилися поліморфними. Мономорфні 14 смуг мають приблизну молекулярну масу 360 п.н., 365 п.н., 375 п.н., 378 п.н., 475 п.н., 595 п.н., 620 п.н., 875 п.н., 1280 п.н., 1865 п.н., 2000 п.н., 2230 п.н. та 2550 п.н.. На Рис. 3.4 представлена електрофореграма, отримана для різних зразків *Ae. biuncialis* за допомогою сТВР методу. Всім поліморфним смугам також були надані номери в порядку збільшення їх молекулярної маси (Табл. 3.2).

Таблиця 3.2

сТВР-профілі досліджених зразків кримських популяцій *Ae. biuncialis*

Зразок	Номери поліморфних смуг	Зразок	Номери поліморфних смуг
NK_02	1, 4, 5, 8, 10,11, 15, 20, 25, 26	NK_6-2	2, 3, 4, 6, 7, 9, 14, 17, 20, 27, 28
NK_010	1, 4, 6, 8, 14, 17, 19, 20, 22, 25, 27	NK_4N2	2, 3, 4, 6, 7, 9,12, 14, 17, 20, 23, 27
NK_B1-1	2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 17, 20, 23, 27, 28	NK_1-I	1, 4, 5, 8, 11, 14, 15, 16, 20, 22, 25, 26
NK_11-2	1, 4, 6, 8, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 25, 27	NK_OZ-2	1, 4, 6, 8,14, 16,17, 19, 20, 22, 25, 27
NK_MM7-3	1, 6, 8, 14, 16, 20, 27	NK_10-3	1, 4, 6, 8, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 25, 27
NK_MMB-1	1, 4, 5, 8, 14, 15, 18, 20, 22, 24, 25, 29	NK_MM2-1	1, 4, 6, 8, 14, 16, 17,19, 20, 22, 25, 27
NK_13-1	1, 4, 6, 8, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 25, 27	NK_14-12	1, 4, 6, 8, 14,17,19, 20, 22, 25, 27
NK_50	1, 4, 6, 8, 14, 17, 19, 21, 22, 25, 27	Всього	29 поліморфних смуг

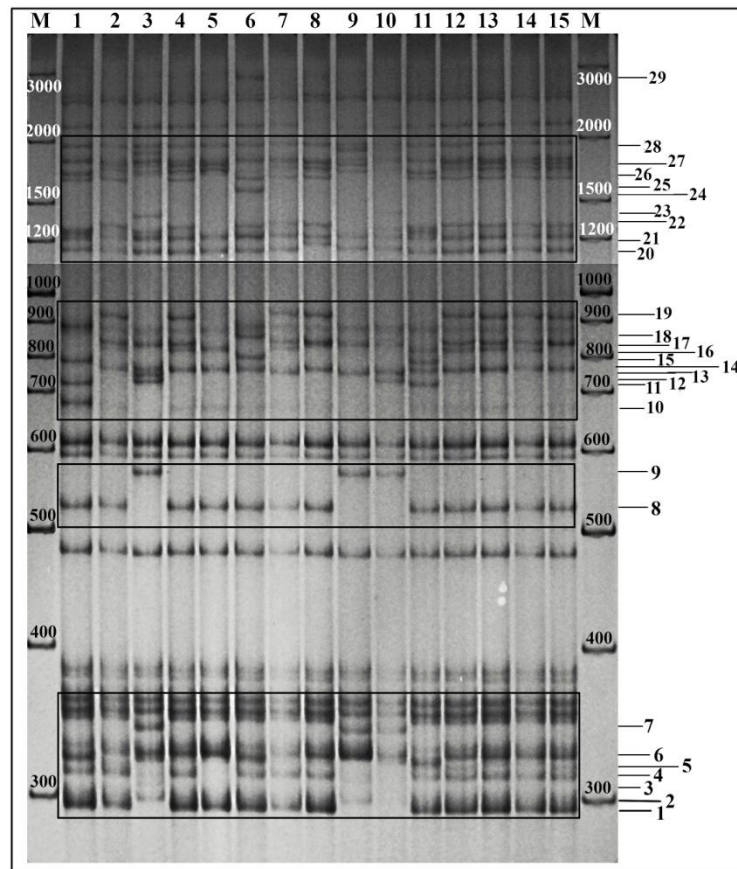


Рис. 3.4. Електрофореграма з ампліконами другого інтрона гена β -тубуліну досліджених популяцій *Ae. biuncialis* (сТВР-аналіз). Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; 1–15 (зверху) – номери зразків; 1–29 (збоку) – номери смуг.

Середнє значення РС становить 0,231. Цей показник є дещо нижчим від значень РС, отриманих за допомогою ТВР-аналізу. Це пояснюється тим фактом, що при сТВР-аналізі утворюється значно більше фрагментів (42), як поліморфних так і мономорфних. На основі отриманих профілів зразків було побудовано UPGMA-дендрограму (Рис. 3.5). Майже всі зразки диференціюються один від одного з високим відсотком бутстреп-підтримки. Виняток – це зразки NK_11-2, NK_13-1, NK_OZ-2 та NK_10-3, що утворюють спільну гілку, виокремлюючись від зразка NK_MM2-1 (67% бутстреп-підтримка). Крім того, між даними зразками коефіцієнт подібності Нея та Лі має максимальне значення – 1. Мінімальне значення коефіцієнта – 0,6 – спостерігається між двома зразками NK_B1-1 та NK_02.

Дерево, що побудоване на підставі результатів сТВР-аналізу (Рис. 3.5) є дуже подібним до hТВР дендрограми (див. Рис. 3.7). Так загалом всі зразки поділяють на три великі групи. Першу (зі 100% бутстреп-підтримкою) утворюють три зразки NK_4N2, NK_6-2 та NK_B-1, як і у випадку з hТВР. Другу групу також формують NK_02, NK_1-I та NK_MMB-1, однак вже з меншою бутстреп-підтримкою – 63%. В третю групу увійшли всі інші зразки, проте вони добре диференціюються один від одного.

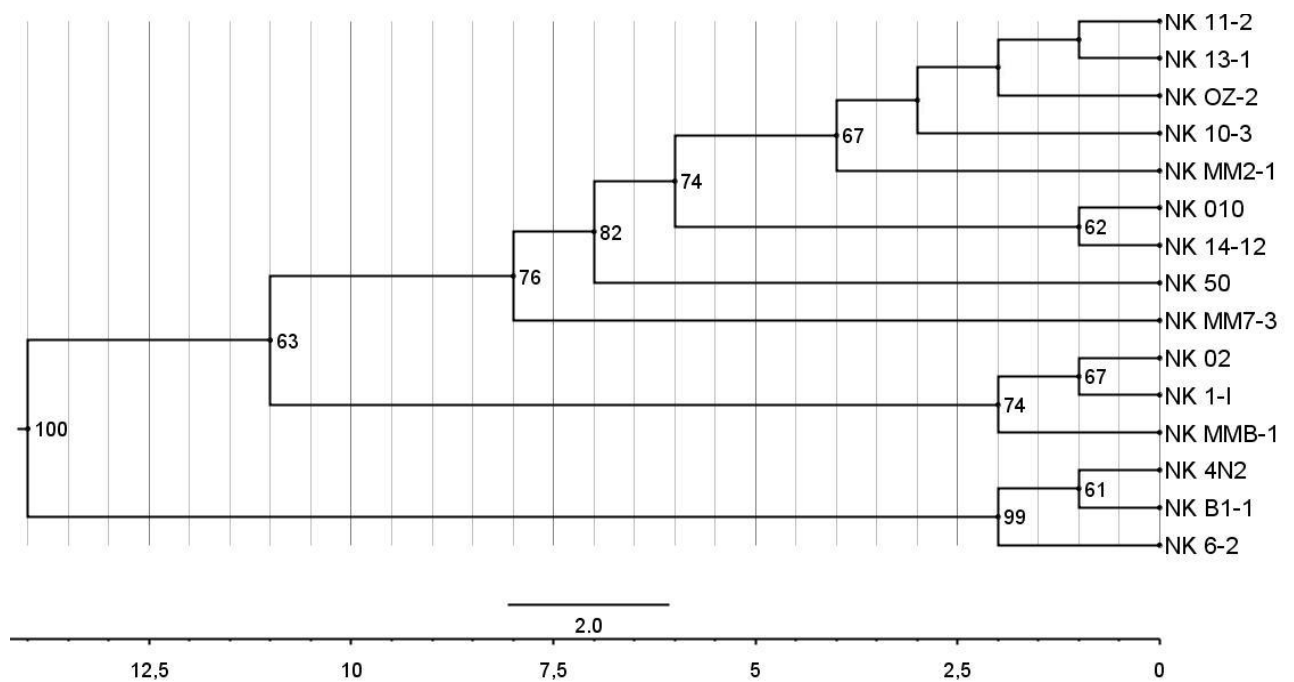


Рис. 3.5. Дендрограма UPGMA, що базується на поліморфних сТВР-фрагментах досліджених генотипів *Ae. biuncialis*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Таким чином, результати сТВР-аналізу *Ae. biuncialis* свідчать на користь високої диференціюючої здатності даної модифікації цього методу та можливість її використання окремо або у поєднанні з дослідженням поліморфізму першого інтрону β -тубуліну для оцінки генетичного поліморфізму цього виду злакових рослин та фінгерпрингу його природних популяцій.

3.2.3. Поліморфізм довжини I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну у *Ae. biuncialis* (hTBP-аналіз)

За допомогою проведеного hTBP аналізу зразків кримських популяцій *Ae. biuncialis* було виявлено 24 відтворювані чіткі смуги в діапазоні від 466 п.н. до 3400 п.н., 21 з яких були поліморфними. Характерно, що у всіх зразків спостерігається лише 1 мономорфна смуга в районі 1244 п.н. В ПЛР продукті для зразків NK_B1-1, NK_11-2 і NK_OZ-2 спостерігається чітка смуга з молекулярною масою 486 п.н. Однак, оскільки його відтворюваність складала лише 50%, він був виключений з подальшого аналізу. Так само для аналізу не враховувалися нечіткі смуги, зафіксовані в наступних діапазонах 538–600 п.н., 700–1000 п.н., 1500–2000 п.н. Всі чіткі смуги знаходилися в приблизних діапазонах 473–538 п.н., 657–693 п.н., 1168–1430 п.н. і 2313–3340 п.н. На Рис. 3.6 представлена електрофореграма, отримана для різних зразків *Ae. biuncialis* за допомогою hTBP методу.

Таблиця 3.3

hTBP-профілі досліджених зразків кримських популяцій *Ae. biuncialis*

Зразок	Номери поліморфних смуг	Зразок	Номери поліморфних смуг
NK_02	2, 5, 7, 9, 15, 16, 18, 21	NK_6-2	2, 6, 8, 20, 22, 23
NK_010	2, 5, 6, 9, 12, 17, 18, 21	NK_4N2	2, 6, 7, 8, 10, 11, 20, 22, 23
NK_B1-1	1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 20, 22, 23	NK_1-I	2, 5, 7, 9, 15, 16, 18, 21, 23
NK_11-2	2, 3, 5, 6, 9, 12, 17, 18, 21	NK_OZ-2	2, 3, 5, 6, 9, 12, 17, 18, 21
NK_MM7-3	2, 6, 9, 13, 14, 18, 21	NK_10-3	2, 4, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21
NK_MMB-1	2, 5, 7, 9, 13, 14, 18, 19, 21	NK_MM2-1	2, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21
NK_13-1	2, 3, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21	NK_14-12	1, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21
NK_50	1, 5, 6, 9, 13, 14, 17, 18, 21	Всього	23 поліморфні смуги

Всім поліморфним смугам також були надані номери в порядку збільшення їх молекулярної маси (Табл. 3.3). Кожному зразку характерний свій специфічний

набір смуг, тобто за набором поліморфних фрагментів ДНК кожен зразок є унікальним і відрізняється, хоча б, однією смугою (як її наявністю, так і її відсутністю) від інших зразків. На Рис. 3.7 показана дендрограма, отримана за допомогою кластерного аналізу. Коефіцієнти Нея і Лі варіюють від 0,111 у зразках NK_B1-1 і NK_MM7-3, NK_50 і NK_4N2, NK_4N2 і NK_14-12 до 1 у зразків NK_11-2 та NK_0Z-2, NK_50 та NK_14-12. Значення PIS (за формулою 1 для біалельних маркерів) складає 0,309.

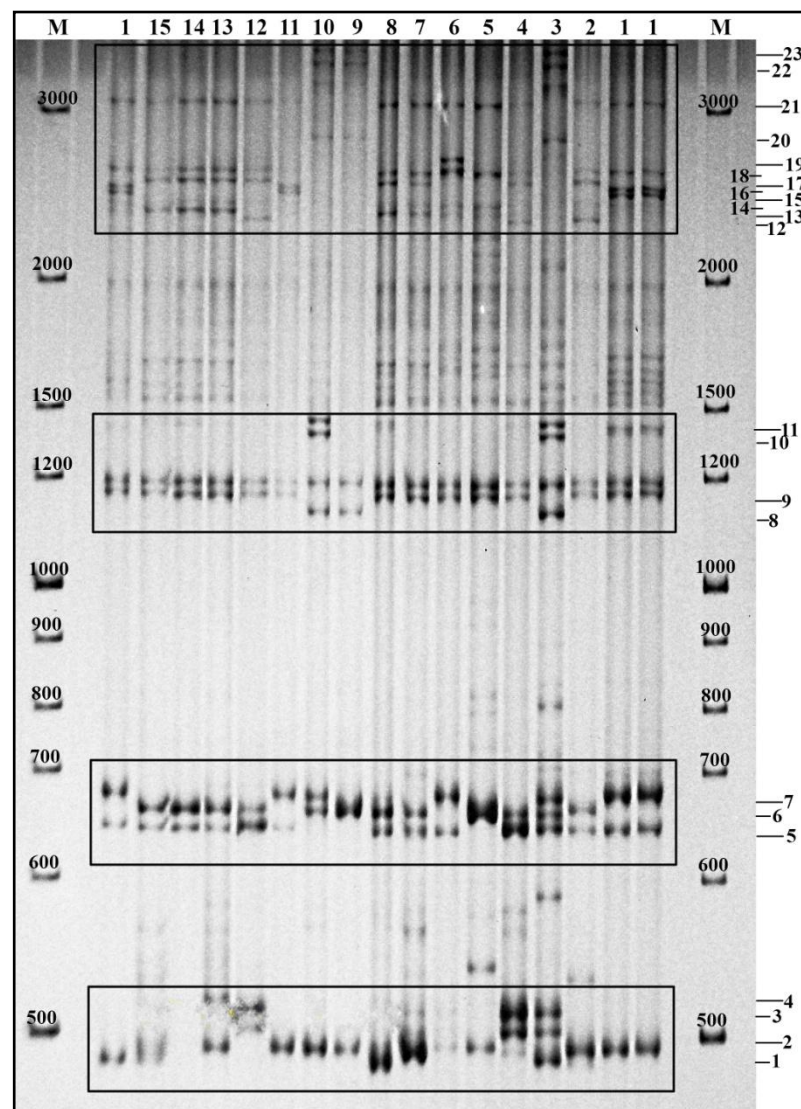


Рис. 3.6. Електрофореграма з ампліконами інтронів гена β -тубуліну досліджених популяцій *Ae. biuncialis* (hTBP-аналіз). Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; 1–15 (зверху) – номери зразків; 1–23 (збоку) – номери смуг.

Дендрограма, побудована на підставі результатів hTBP-аналізу, дещо відрізняється від попередніх (Рис. 3.7). Разом з тим, кластер популяцій *Ae. biuncialis* NK_B1-1, NK_6-2, NK_4N2 однаково і з великим рівнем бутстреп-підтримки відтворюється на основі обох типів TBP-маркерів. Група зразків NK_14-12–NK_50 зберігає високу бутстреп-підтримку (95%), але розташовується в іншому кластері, до якого належать зразки, які раніше не мали будь-якого значимого злиття. Таким же чином кластер зразків NK_MMB-1–NK_02–NK_1-I (з 95% бутстреп-підтримкою) складається із зразків, що за іншими видами TBP-аналізу не утворювали спільний кластер на будь-якому значимому рівні. Це пов'язано, ймовірно, з більшою диференційною здатністю hTBP-аналізу.

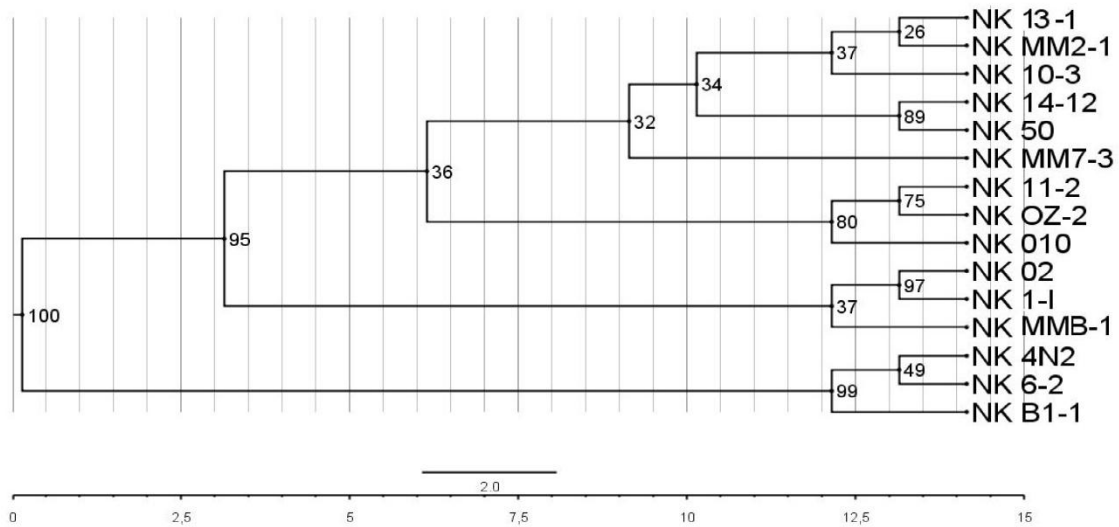


Рис. 3.7. Дендрограма UPGMA, побудована на підставі аналізу поліморфних hTBP-фрагментів досліджених генотипів *Ae. biuncialis*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Отже, при вивченні зразків *Ae. biuncialis* з кримських популяцій за допомогою hTBP методу виявлено досить високий рівень поліморфізму, який може бути ефективно використаний для диференціації генотипів *Ae. biuncialis*. Отримана інформація є корисною для подальших досліджень в області молекулярної генетики егілопсів, зокрема, маркер-залежної селекції, що може значно оптимізувати важкий селекційний процес.

Важливо, що розміри ампліфікованих фрагментів інтронів генів β -тубуліну *Ae. biuncialis* є завжди більшими ніж 300 п.н., що відповідає розташуванню пари праймерів в межах кодуєчих послідовностей [11, 12]. Середнє значення PIS для результатів аналізу за допомогою ТВР і hТВР методів складає у обох випадках близько 0,3, а для cТВР – дещо нижче (0,2). Проте їх можна вважати високими з урахуванням того, що для будь-якого біалельного маркера максимальна оцінка PIS складає 0,5 (за формулою 1) [12]. Характер кластеризації досліджених зразків *Ae. biuncialis* з використанням різних типів ТВР-маркерів відрізняється, разом з тим групи зразків, що мають найбільшу бутстреп-підтримку, зберігаються. Це може бути з декількох причин. По-перше, розділення фрагментів ДНК за допомогою ПААГ електрофорезу є дуже складним і має певний ступінь неузгодженості. Більш того, є амплікони розміром вище 1500 п.н., тому побудовані дендрограми UPGMA можуть відображати проблему відсутності високої роздільної здатності. По-друге, можливо, слід використовувати комбінацію більш видоспецифічних праймерів.

В той же час усі перевірені варіанти методу поєднують надійність та швидкість отримання вихідних даних та простоту їх аналізу. Вони можуть бути використані для попередньої оцінки та класифікації на нижчих таксономічних рівнях. Додаткова перевага даного аналізу полягає в тому, що дослідникові не потрібна попередня інформація про конкретну послідовність інтронів β -тубуліну. До того ж, оскільки метод базується на оцінці поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (інтронів), то не потрібні подальші біохімічні та молекулярні маніпуляції [39].

Таким чином, методи, засновані на оцінці довжини інтронів, є джерелом важливої інформації для генетичної характеристики внутрішньовидового поліморфізму злаків, зокрема *Ae. biuncialis*. Ці інструменти можуть бути використані в селекційних програмах, спрямованих на поліпшення агрономічних та біохімічних ознак злакових культур. Метод може бути корисним для оцінки генетичної чистоти та однорідності виду, застосовуватися в молекулярно-філогенетичному аналізі [5].

Результати експериментальних досліджень розділу 3.2. наведено в публікації:

1. 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).

3.3. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у острівних популяцій *D. antarctica* з морської Антарктики

Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* E. Desv.) є одним з двох видів судинних рослин Антарктики. Ареал виду в Антарктиці є дуже протяжний в широтному напрямі та складається значною мірою з ізольованих острівних популяцій, які характеризуються широким спектром умов існування. Все це потенційно може спричиняти появу різноманітних екотипів виду в цьому регіоні. Нещодавно з району Аргентинських островів були описані нові хромосомні форми *D. antarctica* [160]. Водночас використання AFLP та хлоропластних маркерів показало низьку генетичну гетерогенність виду в морській Антарктиці [21, 124]. Тому, безперечно, актуальним є подальше дослідження генетичних відмінностей між популяціями, що зростають у різних екологічних умовах із використанням додаткового інструментарію з арсеналу молекулярно-генетичних маркерів.

У цьому дослідженні було поставлено за мету розробити власні праймери для ампліфікації другого інтрону гена β -тубуліну *D. antarctica* і за допомогою ТВР-аналізу та його варіацій дослідити молекулярно-генетичні відмінності між різними популяціями цього виду в Антарктиці. Відповідно, для оцінки поліморфізму другого інтрону генів β -тубуліну у *D. antarctica* використали власноруч розроблені специфічні праймери з урахуванням інформації, яка міститься у геномних базах даних (Рис. 3.8).

За результатами застосування всіх варіантів методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР, сТВР, 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 hТВР – 6 фрагментів довжиною від 1100 до 1700 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.

```
>HM208297 TUB mRNA Deschampsia antarctica beta-tubulin, partial cds
GAAC TGGCTCTGGCATGGGTACCCTGCTCATCTCAAAGATCAGGGAGGAGTACCCAGACAGGATGATGTT
GACATTCTCAGTCTTCCCATCCCCAAAGGTGCTGACACTGTGGTGAACCTTACAATGCAACACTCTCT
GTCCATCAACTGTTGAGAAATGCTGATGAGTGCATGCTCCTTGACAATGAGGCTCTCTACGACATCTGCT
TCCGCACCCGTAAGCTTGCTACACCCACTTTTGGTGATCTGAACCATCTTATTTCTGCAACAATGAGTGG
TGTACTTGCTGCGCTGCCCTGCCCTGGGAGCTGAACTCTGACCTCCGGAAACTTGACAGTCAACCTGATC
CCTTCCACGCCTCATTCTTCATGGTTGGCTTGCACCACCTGACCTCAAGGGGTTCTCAGCAGTACC
GTGCCCTCACTGTTCCCTGAGTTGACTCAGCAGATGTGGGATTCAAAGAACATGATGTGTGCTGTGACCC
TAGGCACGGTCGCTACCTCACAGCCTCTGCTATGTTCCGTGGGAAGATGAGCACCAAGGAGGTTGATGAA
CAGATGCTGAACGTCAGAAACAAGAACTCGTCGTAATTTGTTGAGTGGATTCCCAACAACGTAAGTCTGA
GTGTGTGACATCCCTCCACTGGCCTTTCAATGTCAATCCACCTTTGTCGGCAACTCAACCTCAATCCA
GGAGATGTTCCGTCGTGTGAGTGAGCAGTTACAGCTATGTTCCAGGAGGAAGGCTTTCTTGACACTGGTAC
ACCGGGAGGGCATGGATGAGATGGAGTTCAGTGGCTGAGAGCAACATGAACGATCTGGTGGCCGAGT
ACCAGCAGTACCAGGATGCCACAGCTGATGAGGAGGAAGAGTACGATGAGGAGGAGGAGCAGGAGGCTGA
TGCCTAA
```

- екзон 2
 - екзон 3
 - пара праймерів

Рис. 3.8. Послідовність кДНК β -тубуліну *D. antarctica* (HM208297).

Слід зазначити, що під час аналізу за допомогою методу сТВР як з виродженими, так і зі специфічними праймерами, ампліфікується майже однаковий спектр фрагментів (виняток – фрагменти довжиною 700 та 750 п.н., які візуалізуються за умов проведення сТВР-аналізу зі специфічними праймерами та 4 фрагменти з довжинами 705, 715, 760 та 780 п.н., що проявляються за умов використання вироджених праймерів). Також в обох випадках спостерігаються один чи два чітких фрагменти ДНК, які мають довжину понад 3000 п.н., але нами вони не враховувалися. Цікаво, що кількість фрагментів, отриманих при порівнянні результатів використання двох варіантів сТВР-аналізу (зі специфічними та виродженими праймерами), дещо відрізняється. Загалом, під час

проведення сТВР-аналізу із виродженими праймерами утворюється більша кількість фрагментів. Це можна пояснити тим, що специфічність вироджених праймерів менша, отже і ампліконів може утворюватися більше. В цілому отримані результати електрофоретичного аналізу свідчать про те, що всі використані методи аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР, сТВР, hТВР) не виявили жодної різниці між зразками досліджуваних популяцій *D. antarctica* (Рис. 3.9).

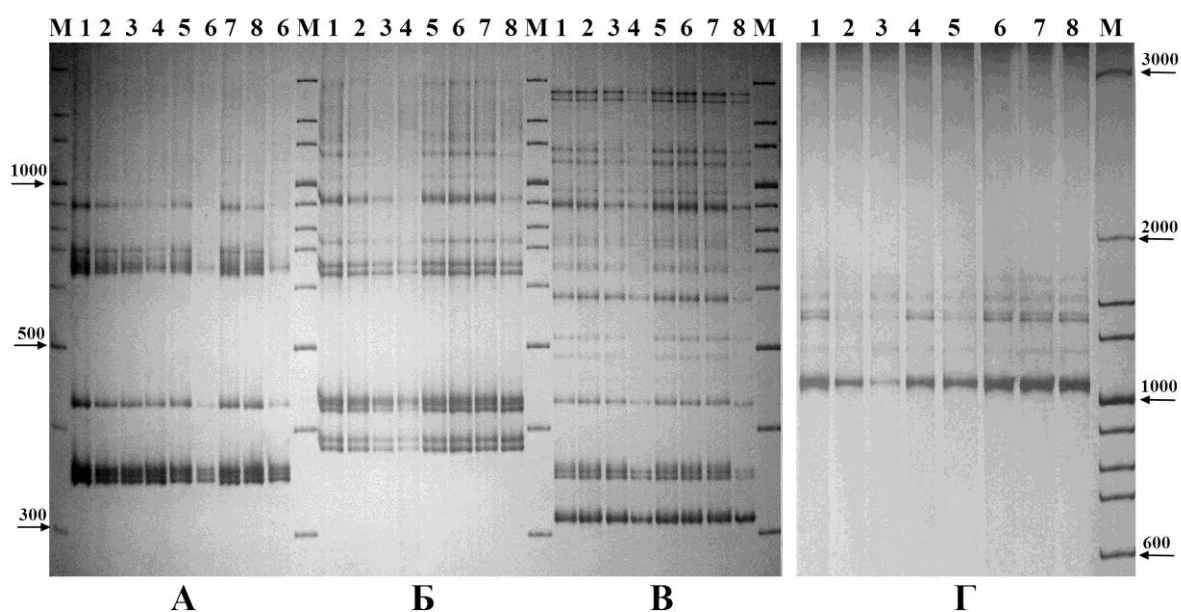


Рис. 3.9. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, які містять інтрони генів β -тубуліну *D. antarctica* з острівних популяцій. А – сТВР з специфічними праймерами; Б – ТВР з виродженими праймерами; В – сТВР з виродженими праймерами; Г – hТВР. Місця збору рослин: 1 – о. Галіндез; 2 – о. Скуа; 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.

Варто зазначити, що висока ефективність та диференціюючі можливості ТВР методу були продемонстровані низкою досліджень із залученням широкого спектру як різних рослинних видів, так і окремих популяцій і генотипів одного і того ж виду [11, 12, 39, 103].

Зокрема, цей метод був успішно використаний для генетичної диференціації двох альпійських екотипів щучника дернистого (*D. cespitosa* (L.) P. Beauv.), які суттєво відрізнялися за умовами зростання і мали різні ТВР-профілі [11]. Таким чином все це дозволяє стверджувати, що ТВР метод та його модифікації можуть бути ефективно використані як ДНК-маркерна система для диференціації різних екотипів щучника. Водночас, відсутність поліморфізму інтронів генів β -тубуліну у проаналізованих вибірках *D. antarctica* з двох віддалених майже на 450 км районів морської Антарктики може свідчити про низький рівень генетичного поліморфізму цього виду в дослідженому регіоні. Подібні дані вказують на низьку генетичну диференціацію антарктичних популяцій виду і були отримані раніше за допомогою інших типів ПЛР-маркерів [21, 124]. Така ситуація, імовірно, зумовлена історичними особливостями формування антарктичних популяцій *D. antarctica*, які згідно однієї з гіпотез, що пояснюють поширення виду в Антарктичному регіоні, зазнали суттєвого скорочення чисельності під час останнього зледеніння або ж зникли зовсім і заселилися повторно згідно іншої, а потім за умови формування сприятливих умов, швидко розповсюдилися усіма придатними для заселення територіями за допомогою птахів, сформувавши популяції, що характеризуються низьким рівнем генетичного різноманіття [97].

Отже, наразі вдалося виявити відсутність будь-яких відмінностей між вивченими острівними популяціями *D. antarctica* за довжиною ПЛР-продуктів. Жоден із застосованих варіантів методу аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну (ТВР, сТВР, сТВР із специфічними праймерами та hТВР) не виявив поліморфізму в дослідженій вибірці рослин. В цілому отримані дані свідчать про низький рівень генетичного різноманіття *D. antarctica* досліджених популяцій двох віддалених регіонів морської Антарктики.

Результати експериментальних досліджень розділу 3.3 наведено в публікації:

1. 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. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

3.4. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів пшениці та ячменю

Інформація по застосуванню методу ТВР для диференціації однодольних рослин, зокрема злаків, є вкрай неповною: в одному із перших досліджень міжсортний поліморфізм у пшениці та ячменю не було виявлено [103], в іншому були продемонстровані можливості методу, хоча виявлений поліморфізм був недостатньо охарактеризований та не міг конкурувати з іншими молекулярними маркерами [11]. Лише нещодавно з'явилося декілька робіт, в яких за допомогою ТВР методу продемонстровано виявлення даних видів рослин в складних комерційних сумішах [42, 106, 107]. Саме тому було необхідно оцінити можливості використання поліморфізму довжини інтронів у генетичних дослідженнях злаків на основі аналізу вітчизняних сортів пшениці та ячменю.

Спочатку було здійснено біоінформаційний аналіз екзон-інтронної структури генів β -тубуліну даних злаків. Не зважаючи на те, що геноми пшениці та ячменю вже є розшифрованими, на сьогодні згідно білковій базі даних UniProt (<https://www.uniprot.org/>) наявні лише 5 анотованих амінокислотних послідовностей генів β -тубуліну у пшениці (Q9ZRB0, Q9ZRA8, Q9ZRA9, Q9ZRB1, Q9ZRB2) та 1 у ячменю (P93176). В базі даних UniProt наведені посилання на відповідні нуклеотидні послідовності генів β -тубуліну у базі даних GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) – це U76744, U76745, U76746, U76895, U76896 у пшениці, та Y09741 у ячменю. Крім того, в базі даних GenBank у пшениці наявна ще одна послідовність гену β -тубуліну – U76896. Тому, провівши пошук та аналіз послідовностей за допомогою інструменту BLASTN, в базі даних Phytozome v12.1, відібрали 13 послідовностей, які відносяться до генів

β -тубуліну у геномі пшениці: Traes_1AL_E8C262A2A, Traes_1DL_07D6B6E83, Traes_1DL_51B44016A, Traes_3AL_6D1917532, Traes_3B_97C246983, Traes_3DL_2114C4621, Traes_4AL_FF377A215, Traes_4BS_0BDB0D05C, Traes_4DS_138E9F824, Traes_5BL_EBD050E21, Traes_5DL_24E161E8F, Traes_6AS_FAFAAFD12, Traes_6DS_E9D8FA12F; та 7 – у геномі ячменю: HORVU0Hr1G026030, HORVU1Hr1G064870, HORVU1Hr1G068170, HORVU3Hr1G078940, HORVU4Hr1G002530, HORVU4Hr1G087740, HORVU5Hr1G100900.

Таблиця 3.4

Характеристика інтронів генів β -тубуліну у пшениці (*T. aestivum*)

№	Назва гена β -тубуліну	Довжина першого інтрону (п.н.)	Довжина другого інтрону (п.н.)
1	<i>Traes_1AL_E8C262A2A</i>	535	489
2	<i>Traes_1DL_07D6B6E83</i>	540	488
3	<i>Traes_1DL_51B44016A</i>	93	898
4	<i>Traes_3AL_6D1917532</i>	453	89
5	<i>Traes_3B_97C246983</i>	750	95
6	<i>Traes_3DL_2114C4621</i>	483	94
7	<i>Traes_4AL_FF377A215</i>	2165	83
8	<i>Traes_4BS_0BDB0D05C</i>	1811	74
9	<i>Traes_4DS_138E9F824</i>	1705	72
10	<i>Traes_5BL_EBD050E21</i>	967	116
11	<i>Traes_5DL_24E161E8F</i>	944	102
12	<i>Traes_6AS_FAFAAFD12</i>	1069	372
13	<i>Traes_6DS_E9D8FA12F</i>	932	371

В подальшому було проаналізовано всі варіанти, представлені в базі даних Phytozome v12.1, проте можливо це не всі наявні гени β -тубуліну, адже, м'яка пшениця має аллогексаплоїдний геном ($2n = 6x = 42$, AABBDD), в утворенні якого брали участь диплоїдні види *Triticum urartu* Thum. (AA), *Aegilops speltoides* Tausch. (BB) і *Aegilops tauschii* Coss. (DD) [33, 82].

Проаналізувавши відібрані ймовірні послідовності генів β -тубуліну було встановлено, що вони складаються з 3 консервативних (та однакових за довжиною в межах кожного виду) екзонів та 2 варіабельних інтронів (Рис. 3.10, Рис. 3.11).

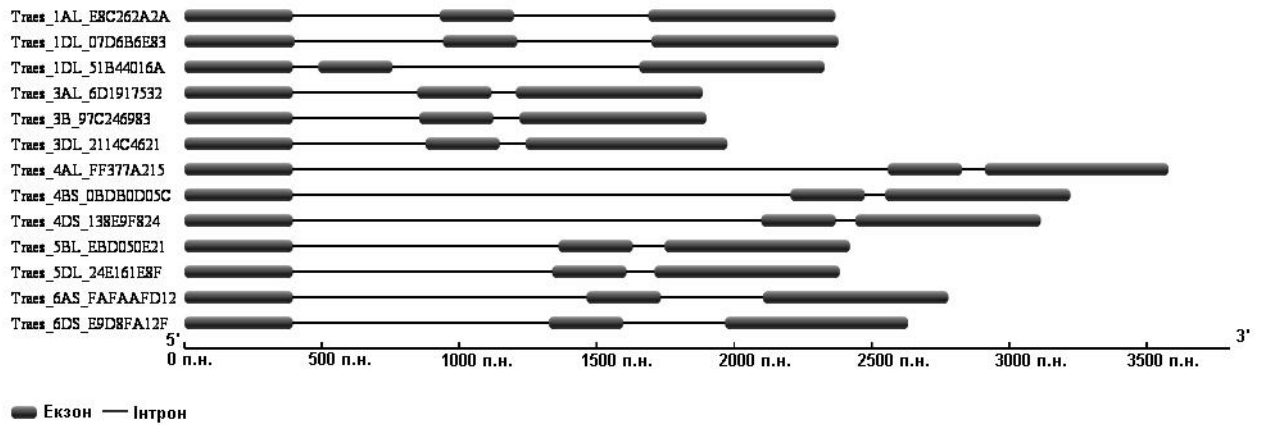


Рис. 3.10. Екзон-інтрона структура ймовірних 13 генів β -тубуліну у пшениці.

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 (Табл. 3.5, Табл. 3.6).

Таблиця 3.5

Характеристика інтронів генів β -тубуліну у ячменю (*H. vulgare*)

№	Назва гена β -тубуліну	Довжина першого інтрону (п.н.)	Довжина другого інтрону (п.н.)
1	<i>HORVU0Hr1G026030</i>	465	532
2	<i>HORVU1Hr1G064870</i>	92	928
3	<i>HORVU1Hr1G068170</i>	465	532
4	<i>HORVU3Hr1G078940</i>	494	95
5	<i>HORVU4Hr1G002530</i>	1699	74
6	<i>HORVU4Hr1G087740</i>	122	124
7	<i>HORVU5Hr1G100900</i>	993	114

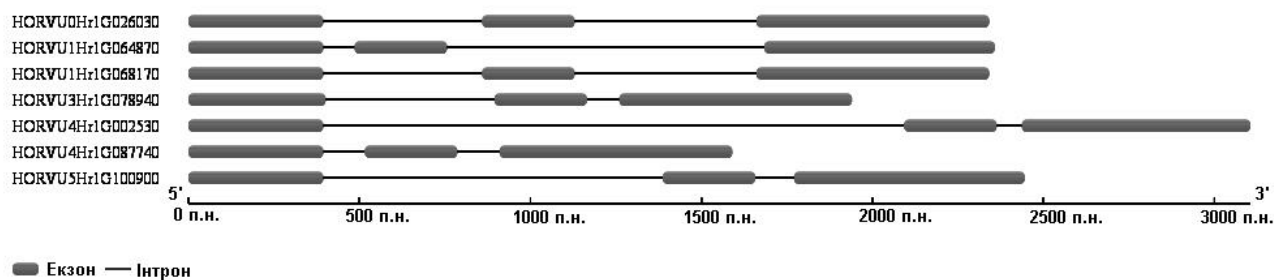


Рис. 3.11. Екзон-інтрона структура ймовірних 7 генів β -тубуліну у ячменю.

Отже, встановлено, що довжина інтронів генів β -тубуліну у пшениці та ячменю дуже варіює у різних генів, тому ТВР метод можливо використовувати для диференціації обраних видів злаків.

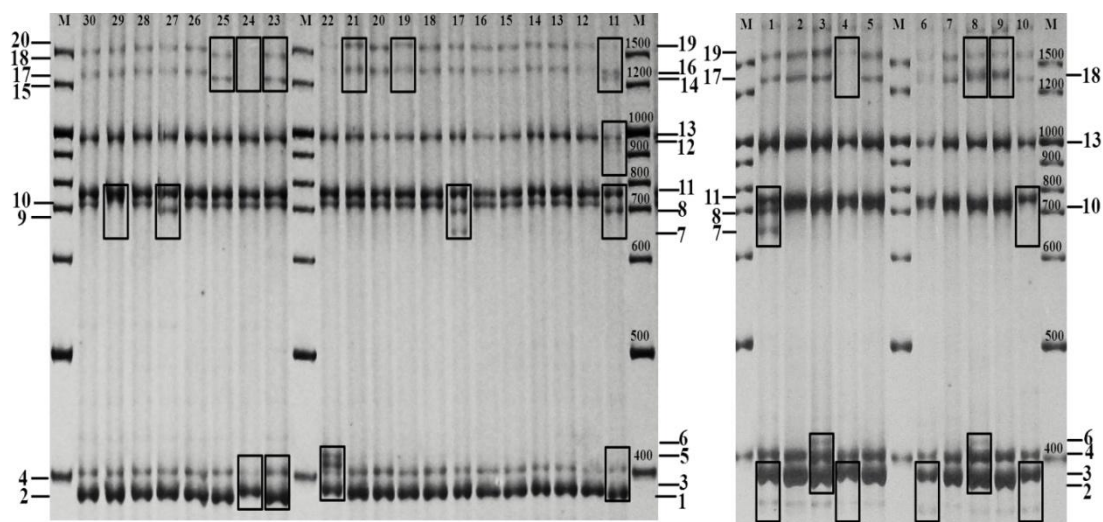


Рис. 3.12. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну сортів ячменю (інтервал 300–1500 п.н.), отримані за допомогою ТВР методу. Прямокутниками позначені поліморфні зони; м – маркер; 1–30 (у верхній частині рисунку) – номери сортів; 1–20 (з боків рисунку) – номери смуг.

Результати проведеного електрофоретичного аналізу свідчать про те, що під час ампліфікації утворюються амплікони (ділянки інтронів β -тубуліну) довжиною приблизно від 94 п.н. до 3000 п.н. – у випадку пшениці, та від 97 п.н. до 1500 п.н. – у випадку 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.

Нижче цих зон спостерігаються мономорфні нечіткі смуги, характерні для ПЛР-продуктів неповної ампліфікації. В подальшому ці амплікони не аналізувалися. Необхідно також зазначити, що для всіх сортів ячменю характерною є дуже чітка, проте ідентична для всіх проаналізованих сортів смуга, що відповідає ПЛР-продукту в районі 104 п.н. Загалом діапазон отриманих фрагментів збігається з теоретично-передбачуваними, адже відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона з ділянками екзонів. Однак не можна виключати утворення високомолекулярних гомо- та/або гетеродимерів [69].

На Рис. 3.12 зображено електрофореграми з ампліконами в діапазоні 300–1500 п.н., отриманими для різних сортів ячменю, а на Рис. 3.13 – продукти ампліфікації для різних сортів пшениці. Всім відтворюваним смугам, що відповідали ампліконам певної довжини, були надані номери в порядку зростання розмірів ампліконів (Табл. 3.6, Табл.3.7).

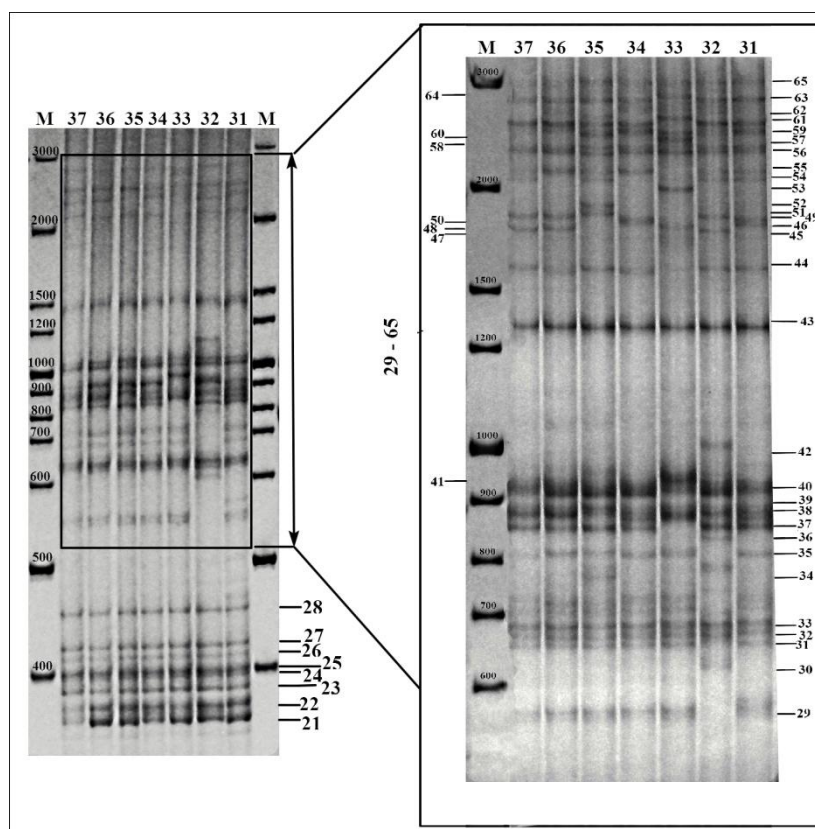


Рис. 3.13. Електрофореграми з ампліконами інтронів генів β -тубуліну сортів пшениці, отриманими за допомогою ТВР методу. Праворуч – збільшена поліморфна зона 600–3000 п.н.; м – маркер; 31–37 (у верхній частині рисунку) – досліджені сорти (див. Табл. 2); 21–65 (з боків рисунку) – номери смуг.

ТВР-профілі сортів ячменю (*H. vulgare*)

№ сорту	Номери смуг	№ сорту	Номери смуг
1	3, 4, 7, 10, 11, 13, 17, 19	16	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19
2	1, 4, 10, 11, 13, 17, 19	17	2, 4, 7, 8, 11, 13, 17, 19
3	2, 4, 6, 10, 11, 13, 17, 19	18	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19
4	2, 4, 10, 11, 13, 19	19	2, 4, 10, 11, 13, 17, 20
5	3, 4, 10, 11, 13, 17, 19	20	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19
6	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	21	2, 4, 10, 11, 13, 17, 20
7	3, 4, 10, 11, 13, 17, 19	22	3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 17, 19
8	2, 4, 6, 10, 11, 13, 18, 19	23	1, 4, 10, 11, 13, 14, 15
9	2, 4, 10, 11, 13, 18, 19	24	3, 4, 10, 11, 13
10	3, 4, 11, 13, 17, 19	25	2, 4, 10, 11, 13, 14, 15
11	1, 4, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 19	26	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19
12	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	27	2, 4, 9, 11, 13, 17, 19
13	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	28	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19
14	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	29	2, 4, 11, 13, 17, 19
15	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19	30	2, 4, 10, 11, 13, 17, 19

Більшість досліджених зразків характеризуються своїм специфічним набором смуг з певними відмінностями. Різниця в наборі ампліконів базується не лише на наявності специфічних смуг, але і на їх відсутності. Наприклад, для сорту ячменю Чарівний характерні смуги: 2, 4, 10, 11, 13, 17, 19, а для сорту Зоряний – 3, 4, 10, 11, 13; тобто амплікони № 17 та № 19 відсутні, що і вирізняє цей сорт від інших. Кількість ампліконів, виявлених у сортів пшениці була більшою, ніж у сортів ячменю – 45 (№ 21–65) та 20 (№ 1–20), відповідно. Така велика кількість фрагментів у пшениці можливо пояснюється тим, що більшість генів м'якої пшениці наявні в її геномі у вигляді гомеологічних копій, тобто копій одного і того ж гену в геномах А, В та D [158].

Крім того, отримані ТВР-профілі *T. aestivum* чітко відрізняються від ТВР-профілів, отриманих раніше (див. розділ 3.2) для *Ae. biunciali*, але при цьому мають частину загальних ампліконів, що доводить спорідненість пшениці та егілопсу та при цьому дозволяє їх розрізняти. Надалі це може бути корисним у підтримці програм селекції пшениці з використанням чужорідних інтрогресій.

ТВР-профілі сортів пшениці (*T. aestivum*)

№ сорту	Номери смуг
31	21-28, 29, 31-33, 35-38, 40, 43, 44, 47, 48, 54-57, 60, 61, 63, 65
32	21-28, 30, 32-34, 36-38, 41-43, 45, 50, 54-57, 61, 63, 65
33	21-28, 29, 31-33, 35, 38, 41, 43, 46, 53, 56, 58, 59, 62, 64, 65
34	21-28, 29, 31, 33, 35, 37, 38, 40, 43, 44, 49, 55-57, 60, 61, 63, 65
35	21-28, 29, 31-33, 35, 37, 39, 40, 43, 44, 51, 52, 54-57, 59, 61, 63, 65
36	21-28, 29, 31-33, 35, 37, 38, 40, 43, 44, 46, 51, 55-57, 63, 65
37	21-28, 29, 31-33, 35, 37, 38, 40, 43, 44, 46, 51, 54-57, 60, 61, 63, 65

Таким чином, в цьому дослідженні за допомогою ТВР методу вперше вдалося доволі чітко виявити поліморфізм довжини інтронів у злаків. Подальше збільшення аналізованих вибірок рослин пшениці та ячменю дасть можливість оцінити генетичний поліморфізм як на рівні сортів, так і на міжсортівному рівні.

Результати експериментальних досліджень розділу 3.4. наведено в публікації:

1. Рабоконт 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).

3.5. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у рижю

Серед олійних рослин, що є високопродуктивними та мають промислове використання, рижій посівний *Camelina sativa* L. Cranz (родина *Brassicaceae*) є однією з найбільш перспективних культур. Останнім часом ця древня непродуктивна рослина широко визнається в якості потенційного альтернативного ресурсу для виробництва біопалива [37, 50, 98]. Рижій також був обраний Міжнародною Асоціацією Повітряного Транспорту (ІАТА) як кандидат

для виробництва біопалива для літаків [50]. До того ж властивості *C. sativa* для виробництва біодизеля вже добре описані [37].

Рижій має число хромосом $2n = 40$ і розмір генома близько 750 Мпн [49]. Останнім часом було проведено багато досліджень з генетичної та геномної характеристики *C. sativa*. У 2006 р. була побудована попередня генетична карта *C. sativa* з використанням 157 AFLP та 3 Brassica SSR маркерів [43]. Відтоді рівень генетичної різноманітності *C. sativa* було додатково оцінено з використанням багатьох інших домінантних або кодомінантних молекулярних маркерів, а саме: RAPD, AFLPs, hTBP, SNP та SSR [39, 44, 80, 81, 117, 126]. Майже всі вони виявили наявність обмеженого рівня генетичної різноманітності серед різних сортів *C. sativa* і сильно підтримують гіпотезу поліплоїдного походження генома *C. sativa* [43, 81]. Поліплоїдне походження також було припущено Hutcheon et al. [49], які вивчали число хромосом і геномну організацію генів, залучених в шлях біосинтезу жирних кислот, та Galasso et al. [39, 40], які аналогічним чином аналізували мультигенну родину β -тубуліну. Розшифрування геному рижію остаточно довело, що *C. sativa* є поліплоїдним видом, що складається з трьох геномів [58]. Крім того, обширні роботи в межах проекту генома *Camelina* по сиквенуванню та аналізу його послідовностей являють собою значний прогрес для подальшого дослідження рижію.

Варто відзначити, що на даний момент добре вивчений генетичний поліморфізм і філогенія сортів *C. sativa* на основі використання методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Встановлено, що родина генів β -тубуліну складається як мінімум з 20 різних генів (CsTUB1 – CsTUB2), що також підтверджує поліплоїдність виду [81]. Таким чином, актуальним завданням для нас було проаналізувати саме вітчизняні сорти та сортозразки рижію, що може стати в нагоді для подальшої роботи з ними селекціонерів при створенні сортів більш придатних для отримання біодизелю.

Нами було проведено ТВР-аналіз перспективних олійних сортів та сортозразків *C. sativa*. З отриманої електрофореграми (Рис. 3.14) видно, що всі

смуги (амплікони - ділянки інтронів β -тубуліну) знаходяться в діапазоні від 295 п.н. до 3200 п.н.

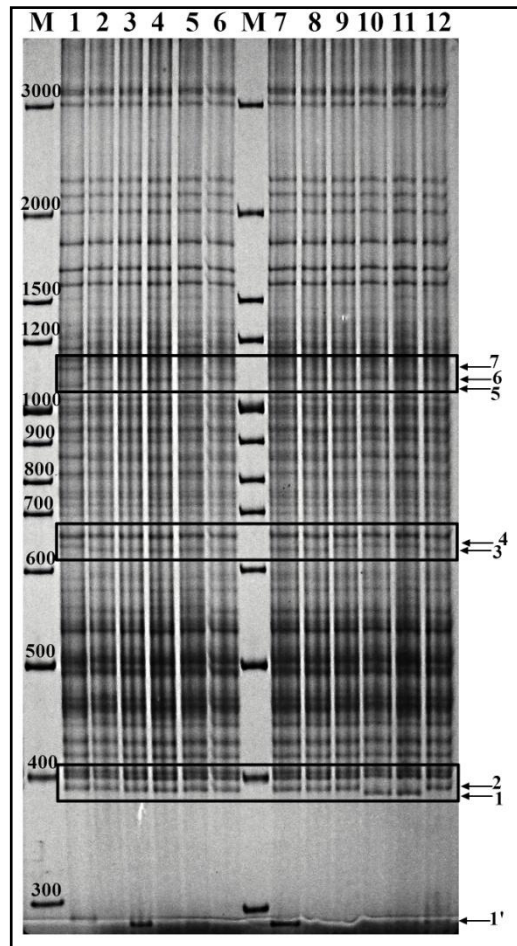


Рис. 3.14. Електрофореграма з ампліконами І-го інтрону генів β -тубуліну *C. sativa* (ТВР-аналіз). Прямокутниками позначені поліморфні зони; праворуч стрілками та номерами відмічені поліморфні фрагменти; м – маркер; 1–12 (у верхній частині рисунка) – номери зразків. 1–12: Міраж, ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, Євро-12, ФЕОРЖЯФ-4, Перемога, Клондайк, ФЕОРЖЯФ-Ч, ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-ЧП, ФЕОРЖЯФ-Д.

У всіх досліджених зразків *C. sativa* утворюється велика кількість продуктів ампліфікації (близько 50), і всі вони чітко помітні на електрофореграмі. Це можна пояснити тим фактом, що рижій посівний є поліплоїдною рослиною. Значна частина смуг є мономорфною. Всього виділяється 7 чітких поліморфних смуг, розташованих в діапазонах 295–300 п.н., 350–400 п.н., 600–700 п.н., 1000–1100 п.н. Ці поліморфні смуги мають приблизну молекулярну масу 295 п.н., 370 п.н.,

375 п.н., 650 п.н., 660 п.н., 1085 п.н., 1110 п.н. Проте смуга 295 п.н. викликає сумніви, адже у деяких зразків вона чітка, а у деяких майже непомітна. Більшість з фрагментів є характерними лише для невеликої кількості зразків. Так, лише для зразків ФЕОРЖЯФ-5 і ФЕОРЖЯФ-ЧП характерні амплікони довжиною 370 п.н., у інших зразків утворюються амплікони 375 п.н. У 4 з 12 досліджених сортозразків спостерігається смуга 660 п.н (Міраж, ФЕОРЖЯФ-1, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-ЧП), у решти восьми – 650 п.н. Смуга 1085 п.н. є тільки у сорту Міраж. Крім того, для сорту Міраж в більшості повторів утворюється ще один амплікон з приблизною молекулярною масою 1150 п.н.

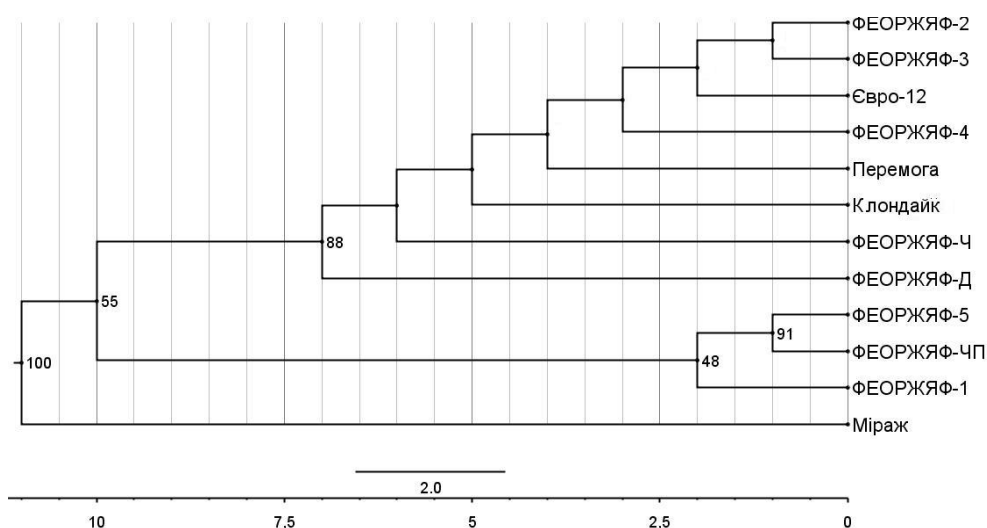


Рис. 3.15. Дендрограма UPGMA, що базується на поліморфних ТВР-фрагментах у *C. sativa*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Спираючись на отримані ТВР-профілі зразків досліджених генотипів рижію був розрахований коефіцієнт подібності Нея та Лі. Значення коефіцієнта варіює від 0 (між зразками ФЕОРЖЯФ-5–Міраж та ФЕОРЖЯФ-ЧП–Міраж) до 1 (у більшості зразків). Генетична дистанція Нея мала значення від 0 до 1,242. На основі коефіцієнта подібності Нея та Лі було побудовано дендрограму, представлену на Рис. 3.15. З неї видно, що зразки розподіляються на три групи. Найбільше від інших зразків вирізняється сорт Міраж (100% бутстреп-підтримка). Другий кластер формують сортозразки ФЕОРЖЯФ-1 ФЕОРЖЯФ-ЧП та

ФЕОРЖЯФ-5 (55% бутстреп-підтримка). До третьї групи з низьким рівнем диференціації увійшли сорти Перемога, Клондайк, Євро-12 та сортозразки ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-4, ФЕОРЖЯФ-Ч, ФЕОРЖЯФ-Д (88% бутстреп-підтримка).

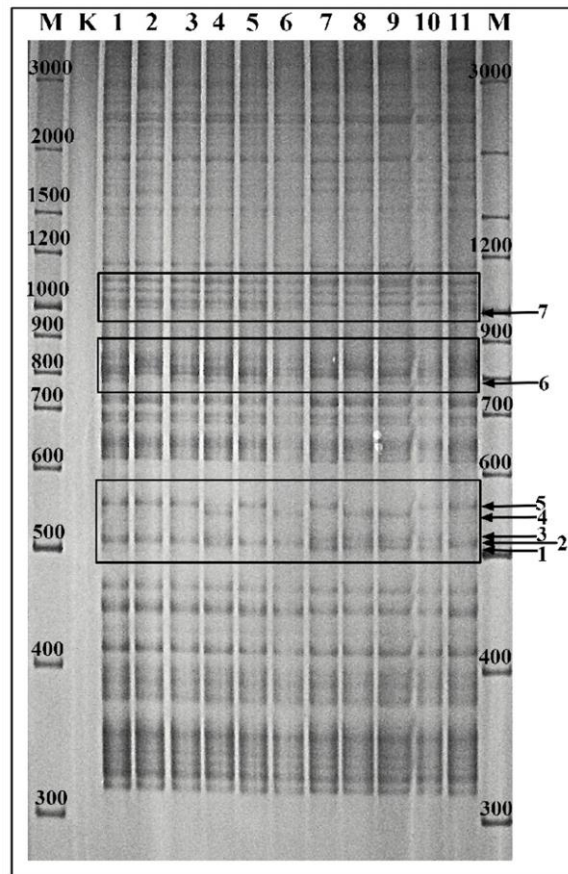


Рис. 3.16. Електрофореграма з ампліконами II-го інтрону генів β -тубуліну *C. sativa* (сТВР-аналіз). Прямокутниками позначені поліморфні зони; праворуч стрілками та номерами відмічені поліморфні фрагменти; м – маркер; к – контроль; 1–11 (у верхній частині рисунка) – номери зразків. 1–11: Перемога, ФЕОРЖЯФ-ЧП, ФЕОРЖЯФ-Д, ФЕОРЖЯФ-1, Клондайк, ФЕОРЖЯФ-2, Євро-12, Міраж, ФЕОРЖЯФ-3, ФЕОРЖЯФ-5, ФЕОРЖЯФ-4.

Таким чином, за допомогою оцінки поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну вдалося диференціювати різні зразки сортів та сортозразків *C. sativa*. Проте приблизно половина зразків має дуже схожий чи навіть той самий генетичний профіль. Тому для доповнення отриманої інформації з метою більш

чіткої диференціації зразків було досліджено поліморфізм довжини другого інтрону генів β -тубуліну, тобто проведено сТВР-аналіз. Від використання hТВР методу було вирішено відмовитися через велику кількість ампліконів, що утворюються під час ампліфікації ділянки як першого, так і другого інтронів. Результати електрофоретичного аналізу при проведенні сТВР методу також показали наявність великої кількості фрагментів, більшість яких виявилися мономорфними для всіх зразків (Рис. 3.16). Фрагменти ДНК знаходяться в діапазоні приблизно від 350 п.н. до 2990 п.н., проте чіткі та відтворені фрагменти виявлені лише в межах від 350 п.н. до 1190 п.н. Саме тому до аналізу були залучені фрагменти з молекулярною масою до 1190 п.н. Всього детектовано 7 поліморфних фрагментів з приблизною молекулярною масою 515 п.н., 520 п.н., 525 п.н., 550 п.н., 570 п.н., 795 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. З побудованої на основі цих коефіцієнтів дендрограми (Рис. 3.17) видно як зразки розподіляються за їх генетичними сТВР-профілями. Загалом утворюються дві великі гілки, які в свою чергу поділяються на підгрупи (із 100% бутстреп-підтримкою). Перша гілка об'єднує дві підгрупи (79% бутстреп-підтримка): сорт Євро-12 з сортозразком ФЕОРЖЯФ-5 (44% бутстреп-підтримка) та сорт Міраж з сортозразком ФЕОРЖЯФ-3 (47% бутстреп-підтримка). Друга гілка поєднує три підгрупи (80% бутстреп-підтримка): Перемога, ФЕОРЖЯФ-Д та Клондайк (47% бутстреп-підтримка); ФЕОРЖЯФ-1 та ФЕОРЖЯФ-2 (72% бутстреп-підтримка); ФЕОРЖЯФ-4 та ФЕОРЖЯФ-ЧП (63% бутстреп-підтримка). Таким чином, в ході використання сТВР методу в даному випадку вдалося дещо краще розділити досліджувані зразки рижію.

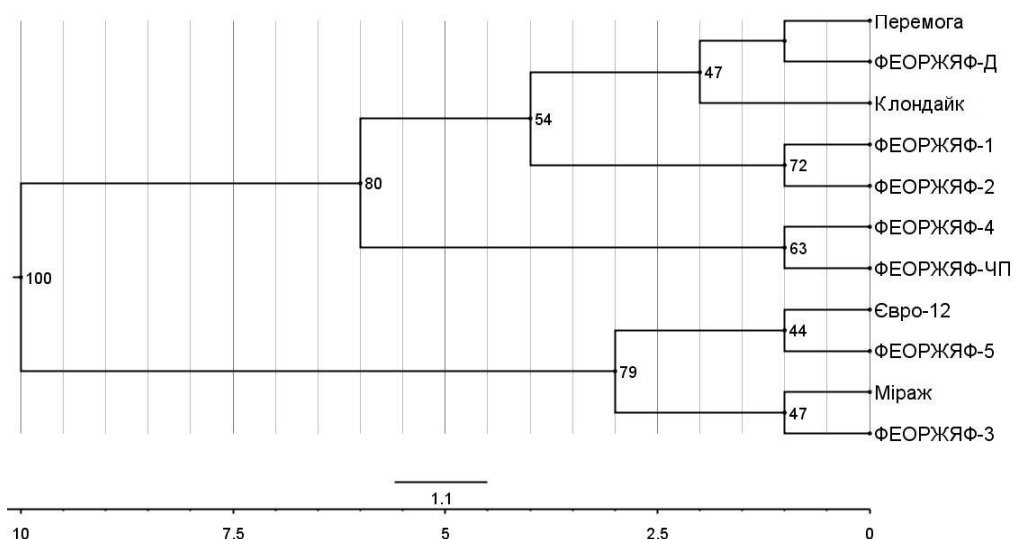


Рис. 3.17. Дендрограма UPGMA, що базується на поліморфних сТВР-фрагментах з *C. sativa*. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

Отримані за допомогою ТВР та сТВР методів дендрограми різняться. Це пояснюється тим фактом, що виявлений міжсортний поліморфізм між дослідженими зразками рижію за обома методами є низьким, що вказує на високу спорідненість цих сортів та сортозразків. При цьому в обох випадках зберігаються однакові закономірності, а саме – серед всіх зразків лише один сорт Міраж виокремлюється від інших, а такі відомі сорти як Перемога (Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка) та Клондайк (Інститут олійних культур НААН України) входять у спільну кладу. Важливо, що зразки ФЕОРЖЯФ-2, ФЕОРЖЯФ-3, Євро-12, ФЕОРЖЯФ-4 ФЕОРЖЯФ-Д, які не диференціювалися за поліморфізмом довжини першого інтрону, легко вдалося розділити один від одного за поліморфізмом довжини другого інтрону. Таким чином, використавши обидва варіанти методу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, які доповнили один одного, нам вдалося диференціювати досліджені сорти та сортозразки рижію.

В цілому в даному дослідженні нами показано, що не тільки поліморфізм довжини I-го інтрону гена β -тубуліну може бути залучений до генетичного аналізу дводольних рослин, але й поліморфізм довжини II-го інтрону гена β -

тубуліну також може бути важливим, а іноді навіть більш ефективним, інструментом при подальшій роботі селекціонерів з дослідженими сортозразками рижію.

Результати експериментальних досліджень розділу 3.5. наведено в публікації:

1. Рабоконь АН, Пирко ЯВ, Демкович АЕ, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжини інтронів генів бета-тубуліна як ефективний інструмент генотипування рослин. Молекулярна і прикладна генетика (Мінск). 2015;19:35–44. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

3.6. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у видів льону

Льон культурний (*Linum usitatissimum* L.) – найдавніша сільськогосподарська рослина, яка широко використовується в різних галузях промисловості [57], є однією з п'яти основних олійних культур світу і вважається третьою за величиною прядильною культурою. Історія обробки льону як технічної культури налічує вже багато тисяч років, і недавні дослідження дозволили виявити сліди лляних волокон в печерах Грузії ще періоду палеоліту (30 тис. років тому) [1, 71]. Через те що льон є однорічною самозапильною трав'янистою рослиною, він є модельним видом для вивчення волокнистих рослин [71, 93].

На сьогодні різні види і генотипи льону активно досліджуються за допомогою анонімних послідовностей, наприклад, SSR, ISSR, RAPD [5, 11, 115, 148]. Разом з тим маркери, які базуються на вивченні послідовностей конкретних генів, зокрема генів тубулінів, досі ще не використовувалися.

3.6.1. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у різних видів роду *Linum* L.

Спираючись на згадане вище було проведено оцінку можливостей використання ТВР методу для молекулярно-генетичної диференціації різних видів льону. Перш ніж почати досліджувати рослини льону за допомогою ТВР методу, був проведений попередній біоінформаційний аналіз, адже в базі даних Phytozome вже є інформація про геном льону (*Linum usitatissimum*).

Таблиця 3.8

Характеристика інтронів генів β -тубуліну у льону (*L. usitatissimum*)

№	Назва генів β -тубуліну	Довжина першого інтрону (п.н.)	Довжина другого інтрону (п.н.)
1	<i>Lus10017217</i>	983	102
2	<i>Lus10021094</i>	959	102
3	<i>Lus10036069</i>	354	94
4	<i>Lus10016448</i>	101	99
5	<i>Lus10027476</i>	428	509
6	<i>Lus10038458</i>	300	506
7	<i>Lus10039231</i>	599	531
8	<i>Lus10023348</i>	273	741
9	<i>Lus10040712</i>	96	100
10	<i>Lus10026813</i>	360	86

Оскільки все ще немає всіх анотованих послідовностей β -тубулінів льону, було проведено пошук та аналіз послідовностей льону за допомогою інструменту BLASTN в базі даних Phytozome v12.1. Було відібрано 10 амінокислотних послідовностей, які відносяться до генів β -тубуліну: *Lus10021094*, *Lus10017217*, *Lus10036069*, *Lus10026813*, *Lus10023348*, *Lus10038458*, *Lus10039231*, *Lus10027476*, *Lus10016448* і *Lus10040712*. Отримані дані збігаються з результатами аналогічного дослідження, в якому було ці ж самі 10 послідовностей віднесено до родини генів β -тубуліну [140]. В подальшому було визначено довжину першого та другого інтрону у відібраних послідовностях. Як видно з Табл. 3.8, довжина першого інтрону варіює від 96 п.н. до 983 п.н., а другого – від

86 п.н. до 741 п.н. Побудована екзон-інтронна структура описаних послідовностей за допомогою онлайн-програми Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) також доводить правильність відбору генів β -тубуліну (Рис. 3.18).

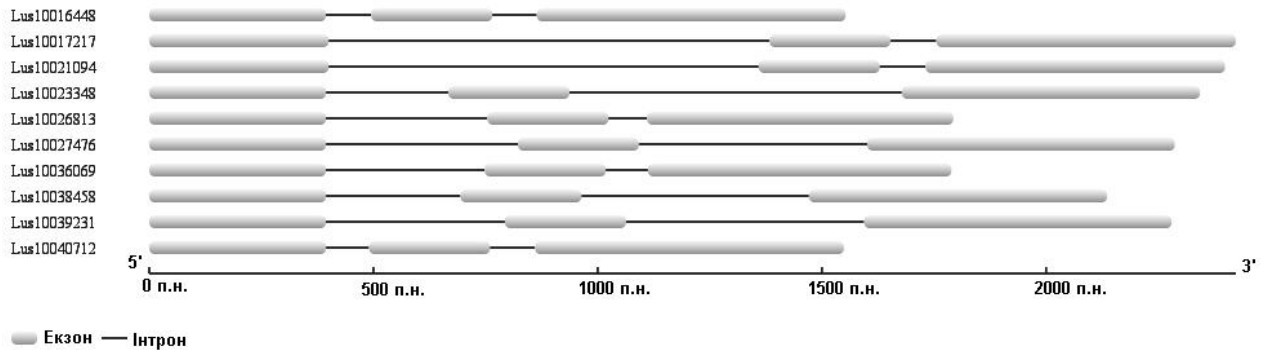


Рис. 3.18. Екзон-інтронна структура генів β -тубуліну льону.

Як видно з Рис. 3.18 всі гени β -тубуліну мають 2 інтрони та 3 екзони. При цьому перший екзон має однакову довжину у всіх ізотипів, а перший інтрон завжди починається з 397 нуклеотиду, що підтверджує раніше встановлені закономірності [5].

Надалі аналізувалась можливість використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в генетичних дослідженнях льону. Диференціююча здатність ТВР методу була перевірена на п'яти видах льону, а саме *L. usitatissimum*, *L. perenne*, *L. humile*, *L. angustifolium* та *L. bienne*. Однак слід зазначити, що систематика роду *Linum* L. і до цього дня залишається неоднозначною. Ряд авторів деякі з наведених вище видів вважають підвидами *L. usitatissimum* або розглядають *L. angustifolium* та *L. bienne* як один вид [146, 156]. На Рис. 3.19 А представлена електрофореграма з результатами аналізу різних зразків льону за допомогою ТВР методу. Результати цього аналізу свідчать про те, що основна зона розподілу фрагментів ДНК знаходиться в діапазоні від 400 п.н. до 1900 п.н. Всього було зафіксовано 46 ампліфікованих фрагментів різної довжини, проте 17 з них є унікальними та зустрічаються тільки у виду *L. perenne*. При спільному розгляді зразків *L. humile* (cv. Еврика та cv. Орфей),

L. usitatissimum, *L. angustifolium* та *L. bienne* зафіксовано 29 різних фрагментів, з яких 16 є поліморфними з приблизним розміром ампліконів: 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., 1865 п.н. При порівнянні всіх зразків, за винятком *L. perenne*, значення PIS склало 0,210 (за формулою 1).

Зразок *L. perenne* значно відрізняється від інших проаналізованих видів. Для нього характерний набір фрагментів: 407 п.н., 415 п.н., 440 п.н., 457 п.н., 480 п.н., 515 п.н., 530 п.н., 580 п.н., 595 п.н., 680 п.н., 690 п.н., 710 п.н., 760 п.н., 795 п.н., 810 п.н., 820 п.н., 940 п.н., 1070 п.н., 1080 п.н., 1150 п.н., 1180 п.н., 1350 п.н., 1470 п.н., 1570 п.н., 1865 п.н. При цьому дві третини фрагментів інтронів генів β -тубуліну є унікальними для цього зразка (17 фрагментів), і лише 8 фрагментів (розміром 457 п.н., 480 п.н., 580 п.н., 690 п.н., 760 п.н., 795 п.н., 1080 п.н., 1865 п.н.) схожі з фрагментами інших зразків. Вірогідно, це пояснюється тим, що *L. perenne* є більш віддаленим родичем досліджуваних видів, що підтверджується високим рівнем відмінностей в морфології та екології даного виду. Значення PIS для *L. perenne* склало 0,323 (за формулою 1). Середнє значення PIS у всіх випадках становить близько 0,3 (0,266), що можна порівняти, наприклад, з оцінками, отриманими для *Eleusine* [12], і є досить високим значенням.

Коефіцієнт подібності Нея та Лі коливається від мінімуму 0,046 у пари зразків *L. perenne* та *L. bienne* до максимуму 0,923 у пари *L. usitatissimum* та *L. bienne*, що мають найбільш схожий набір ампліконів. Дані фінгерпринтінгу, залучених в аналіз зразків, використані для відображення закономірностей генетичної диференціації видів на основі кластерного аналізу методом UPGMA (Рис. 3.19 Б). З отриманої дендрограми видно, що всі зразки льону відрізняються за їх ТВР-профілем.

Проаналізовані зразки льону диференціюються наступним чином. *L. perenne* та *L. angustifolium* виділяються в окремі гілки дерева зі 100% бутстреп-підтримкою. До них примикає *L. humile* cv. Орфей з бутстреп-підтримкою 52%, потім *L. humile* cv. Еврика (57% бутстреп-підтримка), а *L. bienne* та *L. usitatissimum* утворюють одну загальну групу (75% бутстреп-підтримка). Таким

чином, результати проведеного дослідження, виконаного з використанням методу ТВР, дозволяють однозначно ідентифікувати вивчені види роду *Linum* L.

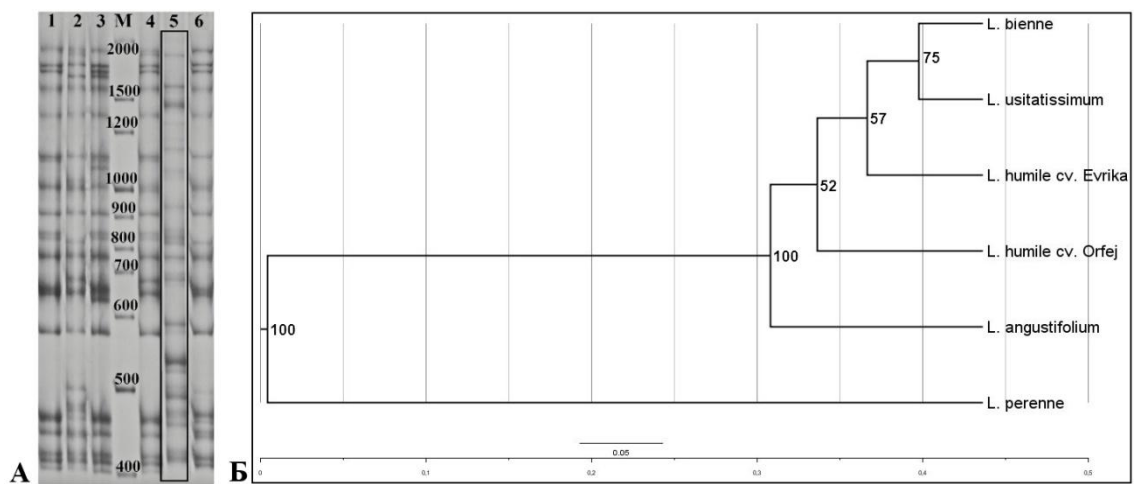


Рис. 3.19. А – Електрофореграма з ампліконами І-го інтрону генів β -тубуліну вивчених представників роду *Linum* (ТВР-аналіз); м – ДНК-маркер; 1–6 (зверху) – номери зразків: *L. bienne*, *L. angustifolium*, *L. usitatissimum*, *L. humile* cv. Эврика, *L. perenne*, *L. humile* cv. Орфей;

Б – UPGMA-дендрограма, побудована на підставі аналізу ТВР-профілей досліджених представників роду *Linum* L.

Для того, щоб перевірити отримані дані та переконатися, зокрема, в тому, що *L. angustifolium* та *L. bienne* можна вважати різними видами, додатково було проведено сТВР-аналіз обраних видів. Як видно з електрофореграми (Рис. 3.20 А) вид *L. perenne* також дуже виокремлюється серед інших видів. Отримані чіткі фрагменти ампліфікації інтронів генів β -тубуліну розташовуються в межах приблизно від 310 п.н. до 2115 п.н. Загалом виявляється 28 чітких фрагменти, 9 (приблизно 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 монорфним для всіх, а дев'ять – для всіх зразків за виключенням *L. perenne* (приблизно 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.).

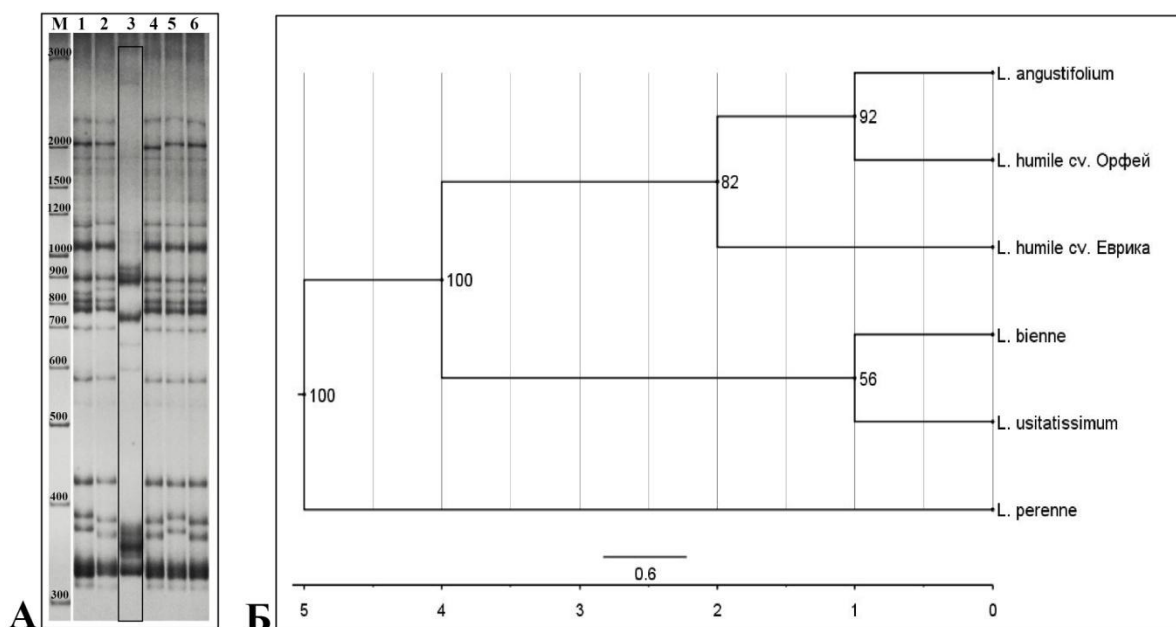


Рис. 3.20. А – Електрофореграма з ампліконами II-го інтрону генів β -тубуліну вивчених представників роду *Linum* (сТВР-аналіз); м – ДНК-маркер; 1–6 (зверху) – номери зразків: *L. bienne*, *L. angustifolium*, *L. perenne*, *L. humile* cv. Еврика, *L. usitatissimum*, *L. humile* cv. Орфей;

Б – UPGMA дендрограма, побудована на підставі аналізу сТВР-профілей досліджених представників роду *Linum* L.

Значення РС 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* cv. Орфей до 0,083 між всіма зразками та *L. perenne*. А якщо виключити *L. perenne* мінімальне значення становить 0,643 між *L. humile* cv. Еврика та *L. bienne*. Із побудованої дендрограми (Рис. 3.20 Б) видно, що зразки не лише добре диференціюються один від одного, а ще і утворюють подібні гілки до дендрограми за ТВР методом. Зокрема, *L. perenne* утворює окрему гілку (100% бутстреп-підтримка); *L. bienne* та *L. usitatissimum* утворюють одну загальну групу (56% бутстреп-підтримка); та *L. humile* cv. Еврика з *L. angustifolium* та *L. humile* cv. Орфей виділяються в окрему гілку дерева зі 82% бутстреп-підтримкою.

Отже, за допомогою сТВР методу також вдалося досить чітко розділити досліджені види. Крім того, отримані подібні дендрограми вказують на схожу картину філогенії даних видів. На цій підставі можна зробити висновок про те, що *L. angustifolium* та *L. bienne* є різними видами, при цьому можливо *L. bienne* дійсно є підвидом *L. usitatissimum*.

Після проведення ТВР/сТВР-аналізу виникла необхідність пояснення розмірів отриманих ампліконів. Так, при використанні ТВР методу утворюються фрагменти ДНК від 300 п.н. до 1900 п.н., а при сТВР – від 310 п.н. до 2115 п.н. Отже, розміри отриманих фрагментів складають більше, ніж 300 пар основ, що відповідає очікуваним результатам ампліфікації першого інтрона з невеликими ділянками екзонів [5]. Що ж стосується фрагментів розміром понад 1000 п.н., то вони є відтворюваними, що дозволяє використовувати їх для диференціації сортів, але природа таких фрагментів невідома і вимагає подальшого аналізу. Можливим поясненням появи цих високомолекулярних фрагментів під час ампліфікації може бути утворення гетеро- та/або гомодуплексної ДНК. Ці ДНК-дуплекси добре візуалізуються під час електрофорезу у поліакриламідному гелі [69]. Крім того, гени β -тубуліну розташовані в чітко визначених геномних кластерах [14, 16, 85], а праймери, які використовували у дослідженні, є виродженими [5]. Тому вони можуть, ймовірно, відпалюватися в різних місцях кластера, що також може привести до появи більш високомолекулярних фрагментів, ніж це теоретично очікувано.

Проте результати проведеного дослідження, виконаного з використанням методу ТВР/сТВР, все ж таки дозволяють однозначно ідентифікувати вивчені види роду *Linum* L, що характеризуються унікальними патернами ампліконів на електрофореграмах. Тому метод може бути застосований в молекулярно-філогенетичному аналізі видів роду *Linum* L.

3.6.2. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів льону різної селекційної спрямованості та географічного походження

В даний час для ідентифікації сортів сільськогосподарських культур, в тому числі льону (*Linum usitatissimum* L.), застосовуються різні молекулярні маркери. Проте геномні ДНК-маркери, які базуються на поліморфізмі довжини інтронів, ніколи раніше не використовувались для генотипування сортів льону. У зв'язку з цим метод, який використовує поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (ТВР), є досить перспективним. Тому нами було перевірено, чи можна застосовувати ТВР метод у дослідженнях сортів льону.

Був проведений ТВР-аналіз 7 сортів *L. usitatissimum*, що походять з різних країн, а саме, Китаю, Нідерландів, України та Росії. Результати аналізу показали (Рис. 3.21 А), що амплікони знаходяться в діапазоні від 405 п.н. до 2820 п.н. Всього спостерігається 31 чіткі зони, 16 з яких є поліморфними. ТВР-фрагменти розташовуються в діапазонах 435–480 п.н., 665–730 п.н., 880–885 п.н., 1105 п.н., 1595–1895 п.н. Проте фрагменти ДНК довжиною приблизно 480 п.н. та 885 п.н. були виключені з аналізу через те, що вони є розмитими та не відтворюються у всіх експериментальних повторностях. Всі зразки мають досить чіткий ТВР-профіль, за яким їх можна диференціювати один від одного. При цьому значення РС становить 0,158 (за формулою 1). Таке низьке значення РС пояснюється наявністю у зразків великої кількості мономорфних фрагментів (майже половина, а саме 15 спільних фрагментів), при їх виключенні значення РС 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 фрагментів. Значення стандартної генетичної дистанції Нея становить від 0 (між сортами Хейя 13, Zenga та Глазур) до 0,341 (між сортами Світанок та Zenga).

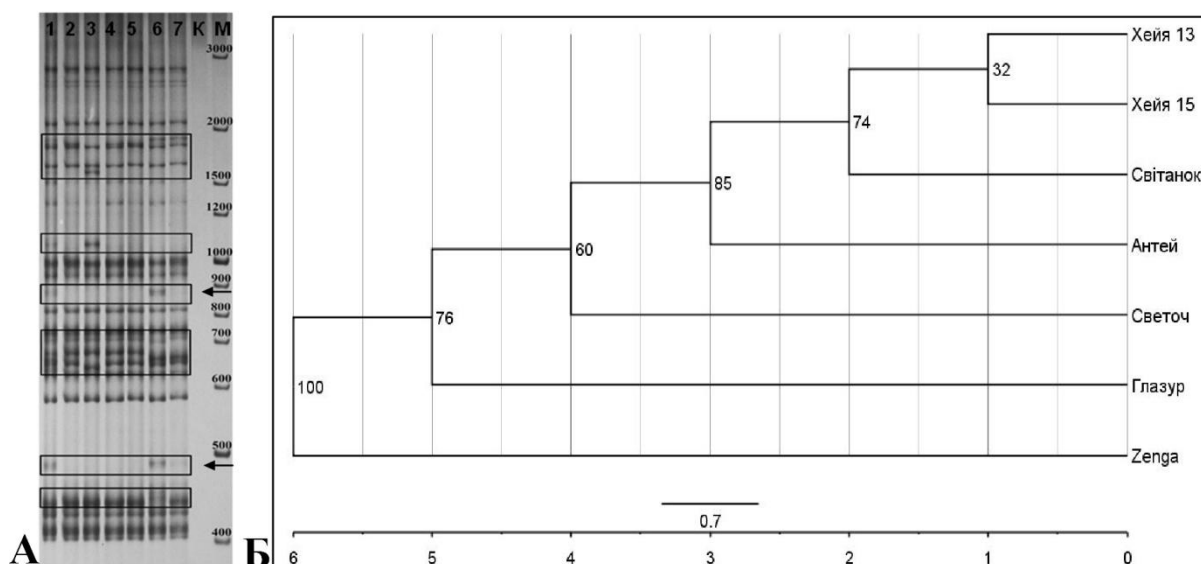


Рис. 3.21. А – Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну *L. usitatissimum*. Прямокутниками позначені поліморфні зони; стрілками відмічені фрагменти, які було виключено з аналізу; м – маркер; к – контроль; 1–7 (зверху) – номери зразків: Хейя 15 (Китай), Хейя 13 (Китай), Светоч (Росія), Світанок (Україна), Антей (Росія), Zenga (Нідерланди), Глазур (Україна);

Б – Дендрограма UPGMA, що базується на поліморфізмі довжини I-го інтрону генів β -тубуліну у сортів льону. Цифри в основі внутрішніх вузлів відповідають значенням бутстреп-підтримки, %.

На основі коефіцієнтів подібності була побудована UPGMA-дендрограма (Рис. 3.21 Б). Всі зразки з високими значеннями бутстреп-підтримки розділилися на окремі гілки. Лише сорти Хейя 15 та Хейя 13 сформували спільну групу (32% бутстреп-підтримки), що є логічним, оскільки вони є сортами з однієї селекційної групи. Загалом всі зразки розподілилися таким чином, що сорти однієї селекції знаходяться поряд один з одним. Найвіддаленішим є сорт Zenga (Нідерланди, 100% бутстреп-підтримки); наступні гілки утворюють сорти, що походять з України та Росії – Глазур (Україна, 76% бутстреп-підтримки), Светоч (Росія, 60 % бутстреп-підтримки), Антей (Росія, 85% бутстреп-підтримки), Світанок (Україна, 74% бутстреп-підтримки); останню гілку утворює група сортів Хейя 15 та Хейя 13 (Китай, 32% бутстреп-підтримки). Сорти української та російської селекції дещо

змішалися, проте це можна пояснити тим, що в Україні та Росії використовували спільний вихідний матеріал. Так, наприклад, сорт Светоч вважається російським сортом, проте вперше його було районовано у 1936 р. в Українській РСР [156]. Крім того, Україна та Росія географічно є сусідами.

Отже, за допомогою ТВР методу також вдалося ідентифікувати та диференціювати сорти льону, що походять з різних країн. В цілому даний метод може бути використаний при подальшій роботі селекціонерів з даними сортами.

3.6.3. Порівняльний аналіз ефективності застосування поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та мікросателітних локусів для генотипування сортів льону української селекції

Аналіз різноманіття сортів льону є важливим компонентом ефективного управління та використання його генетичних ресурсів та проведення програм сертифікації насіння [8], тому оцінка його міжсортового і внутрішньосортового поліморфізму є вкрай важливою. Точна ідентифікація генотипів льону дуже важлива на всіх етапах селекції, починаючи з відбору батьківських ліній і закінчуючи кінцевим використанням отриманої сировини [93, 116, 150]. На цей час для льону була створена лише невелика кількість ефективних маркерів, внаслідок чого його генетичні карти залишаються неповними [22, 91]. Не зважаючи на те, що такі маркерні системи як RAPD [38], AFLP [30], ISSR [94] та SSR [62, 94, 116] вже були використані для льону, вони іноді характеризуються низькою відтворюваністю.

Нині для ідентифікації сортів сільськогосподарських рослин все частіше використовуються SSR-маркери [53, 62, 94, 116]. Ряд таких важливих особливостей SSR-локусів як гіперваріабельність, висока щільність, мультиалельність, кодомінантність, відтворюваність і рівномірність розподілу по геному, роблять їх досить ефективним засобом вивчення між- і внутрішньовидової різноманітності [61]. На сьогодні виконано ряд робіт по SSR-аналізу сортів льону, результати яких демонструють достатньо високу

ефективність використання SSR-маркерів як засобу ідентифікації генотипів [93, 62, 94, 116].

Однак сьогодні все більшої популярності як мішені для оцінки ДНК-поліморфізму набувають саме інтрони. Зокрема поліморфізм довжини інтронів виявився універсальним підходом для генетичної диференціації широкого спектру організмів і зручним для генетичного картування за допомогою молекулярних маркерів, оскільки він (ТВР) безпосередньо пов'язаний з конкретними генами [5].

Виходячи з цього, необхідно було дослідити генетичну однорідність сортів льону української селекції та внутрішньосортний поліморфізм цих сортів за допомогою ТВР- та SSR-аналізу, а також оцінити ефективність використання ТВР методу у порівнянні з SSR методом. Результати електрофоретичного аналізу ампліконів – ділянок інтронів β -тубуліну – свідчать про наявність чітких і відтворюваних фрагментів довжиною приблизно від 400 п.н. до 1900 п.н., що узгоджується з раніше отриманими нами результатами для різних видів льону. Загалом, результати ТВР-аналізу досліджуваних сортів льону вказують на те, що з усіх досліджуваних зразків льону найбільш унікальний та відмінний від всіх інших ТВР-профіль має сорт Надія (Рис. 3.22 А). В цілому було зафіксовано 25 фрагментів різної довжини, 8 з яких виявилися поліморфними. Значення PIC для 16 зразків різних сортів дорівнює 0,48 (за формулою 2). 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.

Дані фінгерпринтингу, залучених до аналізу зразків, були використані для відображення закономірностей генетичної диференціації сортів за результатами кластерного аналізу за допомогою методу UPGMA (Рис. 3.22 Б). З отриманої дендрограми видно, що досліджувані зразки льону чітко (з 100% бутстреппідтримкою) розділилися на дві групи. В одну групу увійшли сорти Сіверський, Журавка, Іванівський, Міандр, Надія, другу ж групу склали інші 11 сортів, при цьому 10 з 11 (окрім сорту Глілум) мають однаковий алельний фенотип, тому і складають одну кладу. Можливо, ці сорти мають такі схожі ТВР-профілі через те,

що при їх створенні був використаний один і той самий вихідний селекційний матеріал, або через те, що вони мають спільне походження.

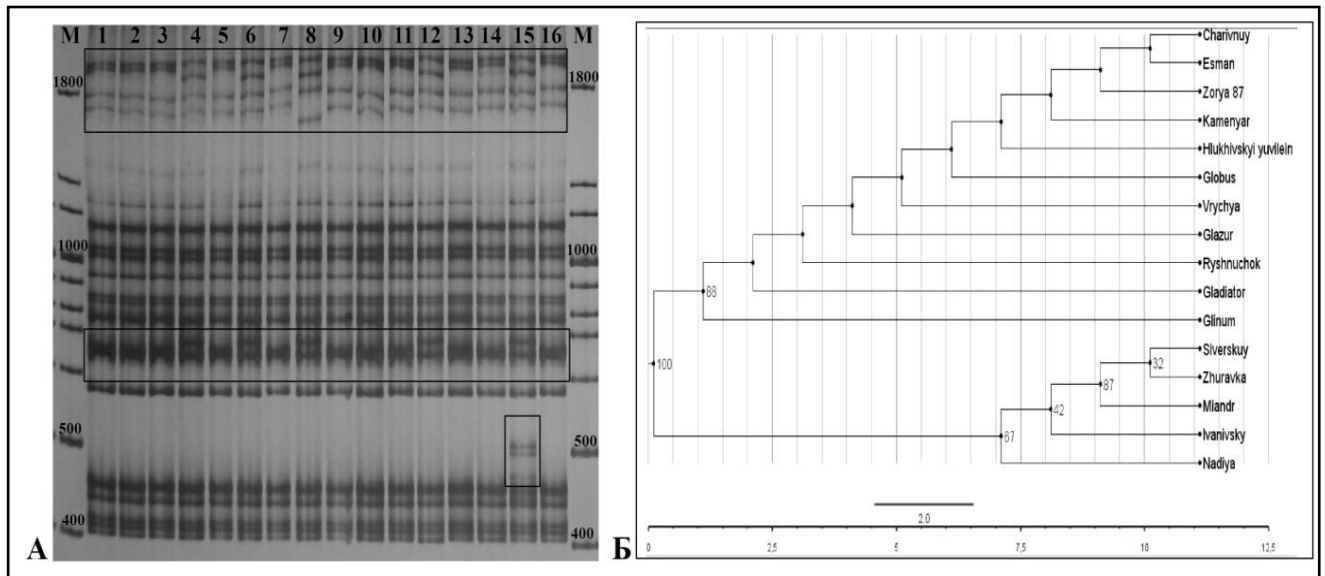


Рис. 3.22. А - Електрофореграма з ампліконами інтронів генів β -тубуліну досліджуваних сортів льону: 1–16 (у верхній частині) – номери зразків, м – ДНК-маркер (O'GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use);

Б - UPGMA дендрограма, що ґрунтується на поліморфізмі довжини інтронів генів β -тубуліну у досліджених зразків льону.

Результати внутрішньосортного ТВР-аналізу свідчать про те, що 6 з досліджених сортів льону є гомогенними, а 10 гетерогенними з різним рівнем поліморфізму. Наявність гетерогенності, кількість алельних фенотипів, розмір ампліконів та значення РС в межах кожного сорту наведені у Табл. 3.8. Гомогенними виявилися сорти Есмань, Глобус, Рушничок, Глухівський ювілейний, Глазур та Сіверський, що підтверджується при аналізі отриманих електрофоретичних продуктів ампліфікації ДНК цих сортів. На Рис. 3.23 представлені результати електрофорезу продуктів ампліфікації за ТВР-фрагментами даних гомогенних сортів.

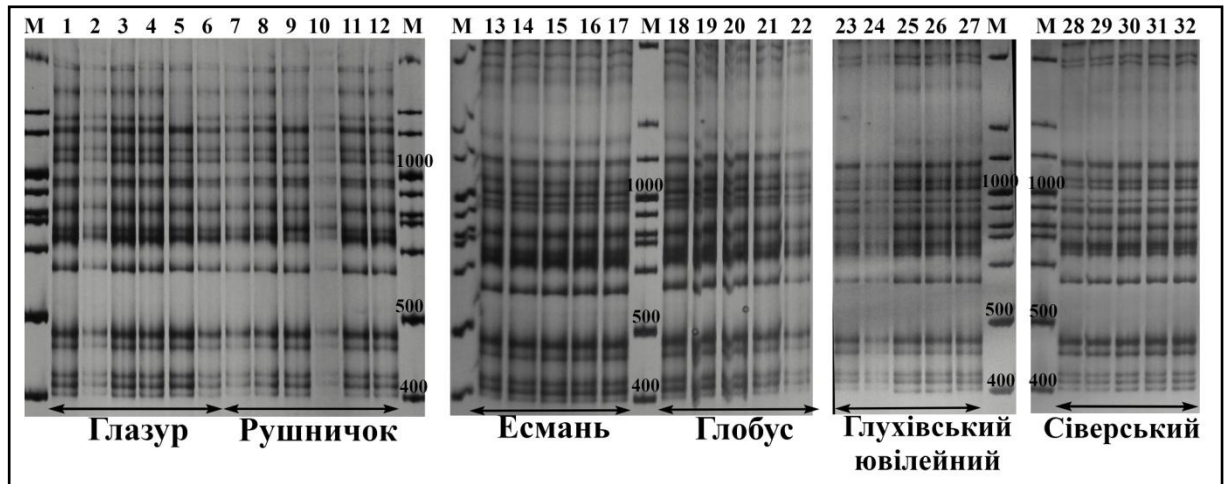


Рис. 3.23. Молекулярно-генетичні ТВР-профілі 6-ти гомогенних сортів льону, отримані за допомогою ТВР методу: 1–6 – Глазур, 7–12 – Рушничок, 13–17 – Есмань, 18–22 – Глобус, 23–27 – Глухівський ювілейний, 28–32 – Сіверський; М – ДНК-маркер «100bp Ladder».

Як видно з Рис. 3.23, всі зразки в межах кожного сорту мають один і той же генетичний профіль, тобто за ТВР-профілем ці сорти льону характеризуються як мономорфні.

Результати ТВР-аналізу решти сортів свідчать про те, що всі вони є генетично неоднорідними (Рис. 3.24). У кожного сорту наявні зразки, які мають фрагменти, що відрізняються молекулярною масою, або спостерігається поява чи втрата деяких фрагментів, притаманних більшості зразків в межах конкретного сорту. Найвищим значенням РІС (0,61) характеризується сорт Журавка, найменшим значенням РІС (0,28) – сорт Вручий. Таким чином, в результаті ТВР-аналізу 16 досліджених сортів льону української селекції вдалося виявити та дослідити міжсортівий та внутрішньосортівий поліморфізм інтронів генів β -тубуліну.

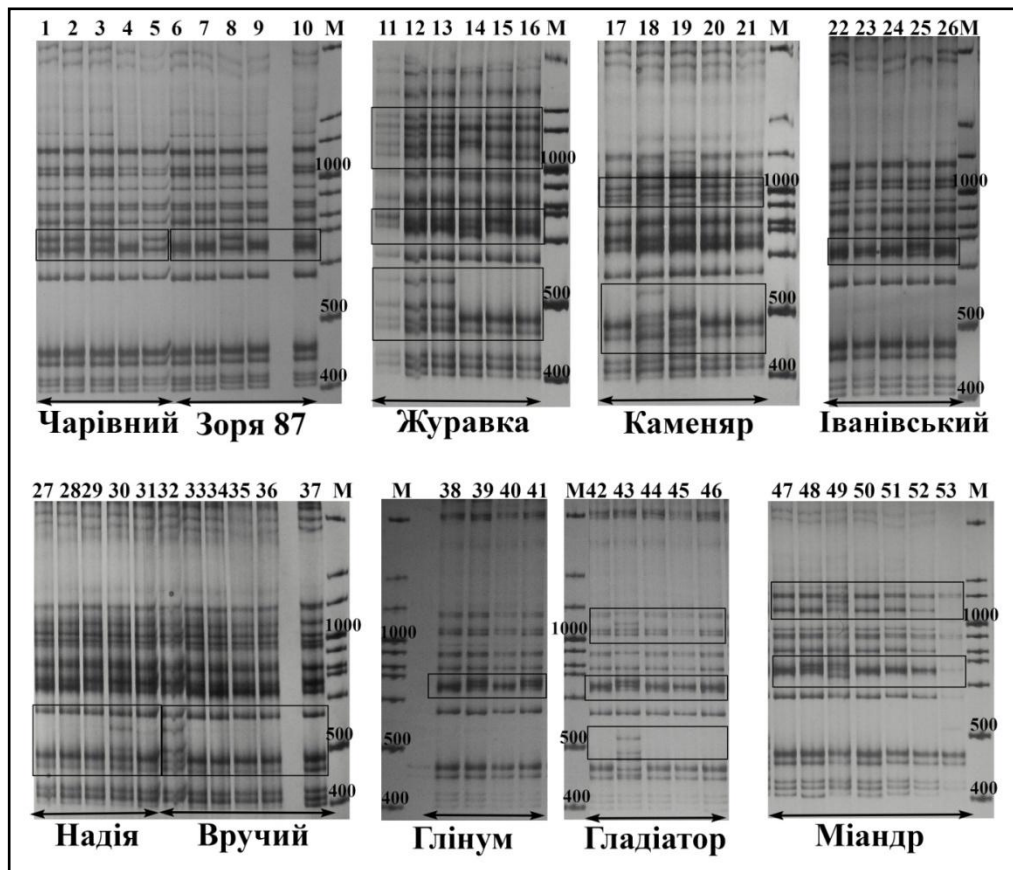


Рис. 3.24. Молекулярно-генетичні ТВР-профілі 10 гетерогенних сортів льону, отримані за допомогою ТВР-аналізу: 1–5 – Чарівний, 6–10 – Зоря 87, 11–16 – Журавка, 17–21 – Каменяр, 22–26 – Іванівський, 27–31 – Надія, 32–37 – Вручий, 38–41 – Глінум, 42–46 – Гладіатор, 47–53 – Міандр; М – ДНК – маркер «100bp Ladder». Прямокутниками позначені зони поліморфізму.

Для аналізу поліморфізму досліджуваних сортів льону за допомогою SSR-аналізу було відібрано всього 2 пари мікросателітів – LU_1 та LU_25, оскільки за результатами попередніх досліджень відомо, що дані локуси виявляють високий рівень поліморфізму [93]. При встановленні міжсортного поліморфізму у 16 зразків льону для обох локусів коефіцієнт подібності Нея та Лі, як і очіувалося, варіює від 0 до 1. Значення PIC складає 0,81 та 0,61, відповідно (за формулою 1). Розмір алелей знаходиться в приблизному діапазоні 130–179 п.н. для LU_1 та 154–225 п.н. для LU_25 (Табл. 3.8, Рис. 3.25 А, Б).

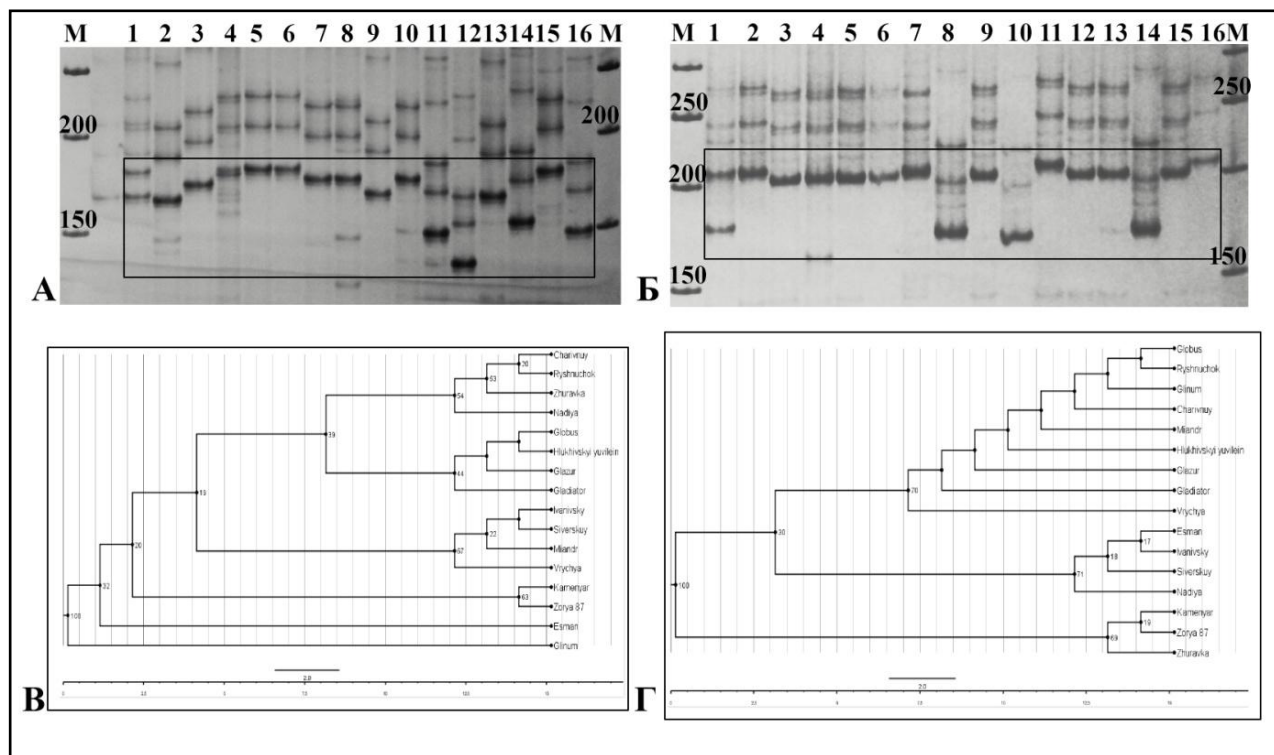


Рис. 3.25. Молекулярно-генетичні SSR-профілі 16 сортів льону, отриманих за допомогою SSR-маркерів LU_1 (А) та LU_25_(Б); 1–16 – сорти Надія, Журавка, Вручий, Гладіатор, Глазур, Глухівський ювілейний, Міандр, Сіверський, Чарівний, Іванівський, Зоря 87, Глінум, Рушничок, Есмань, Глобус, Каменярь, відповідно; м - ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use). Прямокутниками позначені зони аналізу SSR локусів. В, Г – UPGMA дендрограми, що відображають генетичну схожість за SSR маркерами LU_1 (В) та LU_25 (Г) між дослідженими сортами льону.

Побудовані дендрограми за двома SSR-локусам дуже різняться (Рис. 3.25 В, Г). Так, у випадку використання SSR-маркера LU_1 формується 6 гілок, при цьому лише один сорт Глінум виокремлюється від інших з 100 % бутстреп-підтримкою. Що стосується результатів, отриманих з використанням SSR-маркера LU_25, то на дендрограмі сорти чітко поділяються на три групи: сорти Каменярь, Зоря, Журавка (100% бутстреп-підтримка); сорти Надія, Сіверський, Іванівський, Есмань (30% бутстреп-підтримка) та інші дев'ять сортів (70% бутстреп-підтримка).

Таблиця 3.8

Результати аналізу генетичного поліморфізму досліджених сортів льону української селекції

№	Назва сорту	Наявність гетерогенності, + / -			Кількість алельних фенотипів			Розмір алелей, п.н.			PIC		
		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	Глінум	+	-	+	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 PIC (розраховували для 16 зразків різних сортів).

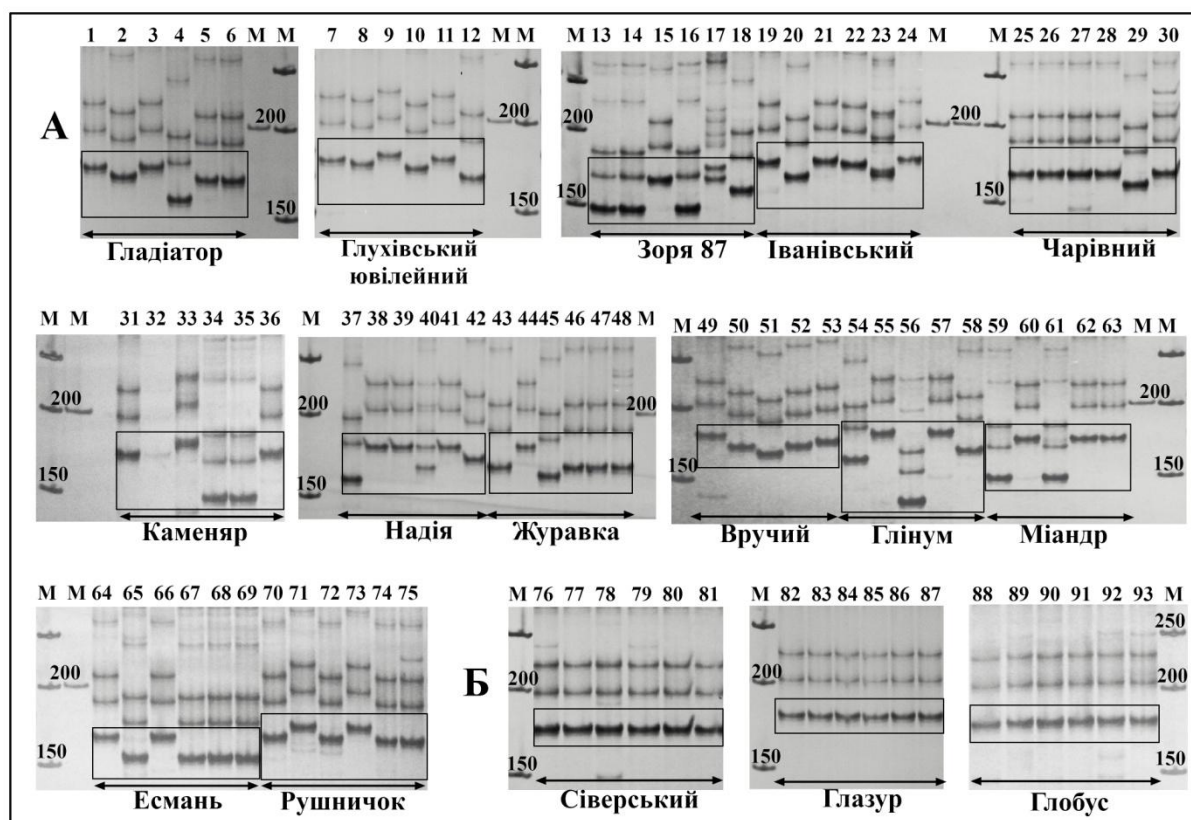


Рис. 3.26. Молекулярно-генетичні SSR-профілі 13 гетерогенних (А) та 3 гомогенних (Б) сортів льону, отримані за допомогою SSR-маркера LU_1: 1–6 – Гладіатор, 7–12 – Глухівський ювілейний, 13–18 – Зоря 87, 19–24 – Іванівський, 25–30 – Чарівний, 31–36 – Каменярь, 37–42 – Надія, 43–48 – Журавка, 49–53 – Вручий, 54–58 – Глінум, 59–63 – Міандр, 64–69 – Есмань, 70–75 – Рушничок, 76–81 – Сіверський, 82–87 – Глазур, 88–93 – Глобус; М – ДНК – маркер «100bp Ladder». Прямокутниками позначені зони локусу LU_1.

При вивченні внутрішньосортowego поліморфізму для маркера LU_1 знайдено 6 алелей (130 п.н., 146 п.н., 159 п.н., 166 п.н., 174 п.н., 179 п.н.) та 8 різних алельних фенотипів, бо в двох сортах виявлено гетерозиготи – Надія (166 п.н., 179 п.н.) та Зоря (166 п.н., 174 п.н.) (Рис. 3.26). Для LU_25 знайдено 8 алелей (154 п.н., 162 п.н., 172 п.н., 180 п.н., 200 п.н., 210 п.н., 213 п.н., 225 п.н.) та 10 алельних фенотипів, гетерозиготи зустрічаються у сортах Надія (170 п. н, 210 п.н.) та Іванівський (162 п.н., 200 п.н.) (Рис. 3.27). Деякі відмінності у визначенні розмірів, діапазону та кількості алелів від результатів, отриманих іншими

авторами [41] могли виникнути внаслідок використання інших реагентів, інструментів, умов проведення ПЛР та, звичайно, особливостей інших сортів льону. 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-маркером LU_25. Це підтверджується результатами аналізу отриманих продуктів ампліфікації ДНК даних сортів (Рис. 3.26, 3.27). Гомогенні сорти мають всі фракції ампліконів одного розміру, тобто у них відсутній внутрішньосортний поліморфізм. Аналіз мікросателітних послідовностей решти сортів показав, що 8 сортів виявилися генетично неоднорідними за обома локусами та 4 – за локусом LU_1.

Отже дані, отримані за допомогою ТБП і SSR методів свідчать на користь того, що для більшості досліджених сортів льону української селекції характерний внутрішньосортний поліморфізм, тобто сорти є генетично неоднорідними. Це слід враховувати при створенні молекулярно-генетичних паспортів даних сортів.

Безсумнівно, SSR-маркери є дуже важливим молекулярним інструментом, який може бути використаний для вирішення багатьох питань. Проте надійність системи ідентифікації на основі мікросателітного аналізу прямо залежить від збільшення кількості SSR-маркерів, що одночасно використовуються, у тому числі, і для льону [18]. А обсяг даних, що генерується при використанні SSR-маркерів вимагає відповідного програмного забезпечення і значних затрат часу для проведення аналізу. Окрім того, при ідентифікації відповідних генотипів за допомогою SSR методу визначають контрольні алелі, розмір яких може відрізнятися між різними лабораторіями, що призводить до зменшення сумісності отриманих даних.

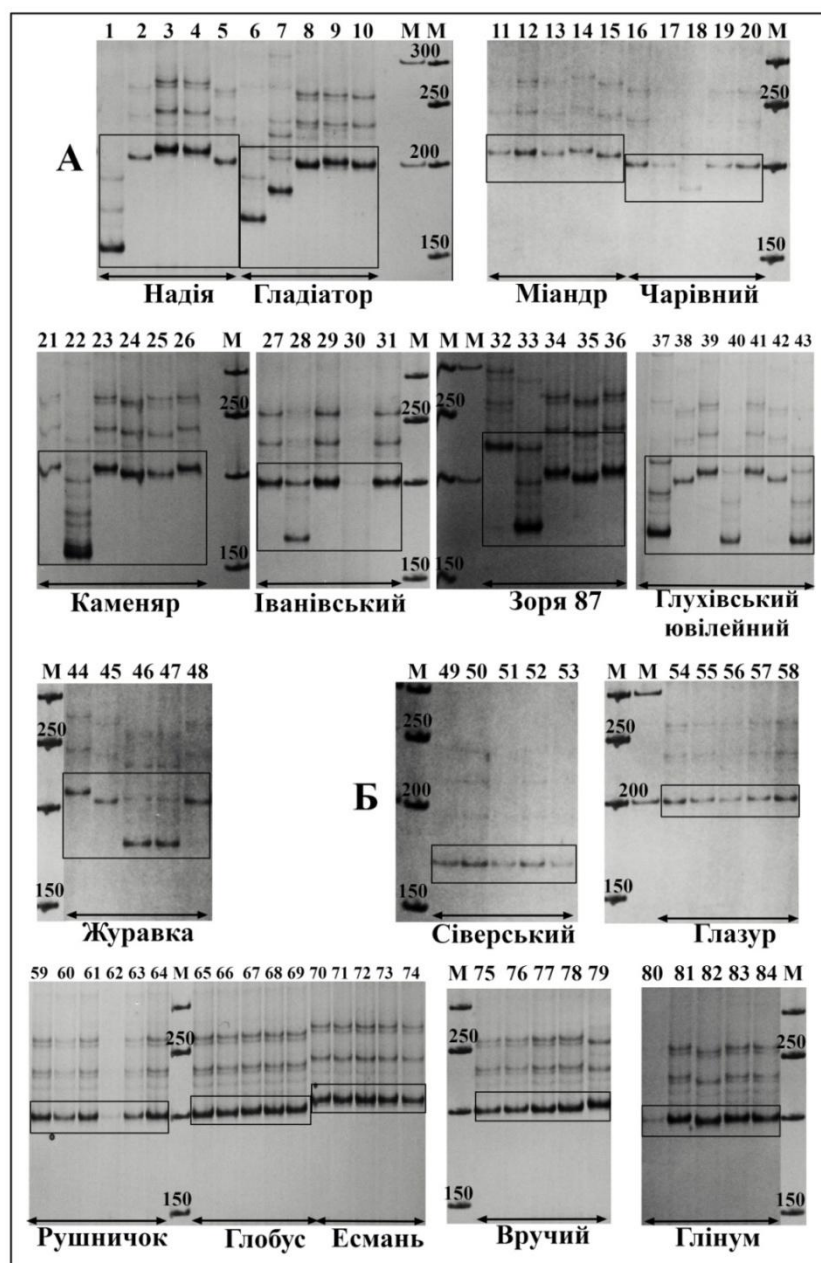


Рис. 3.27. Молекулярно-генетичні SSR-профілі 9 гетерогенних (А) та 7 гомогенних (Б) сортів льону, отримані за допомогою SSR-маркера LU_25: 1–5 – Надія, 6–10 – Гладіатор, 11–15 – Міандр, 16–20 – Чарівний, 21–26 – Каменярь, 27–31 – Іванівський, 32–36 – Зоря 87, 37–43 – Глухівський ювілейний, 44–48 – Журавка, 49–53 – Сіверський, 54–58 – Глазур, 59–64 – Рушничок, 65–69 – Глобус, 70–74 – Есмань, 75–79 – Вручий, 80–84 – Глілум; М – ДНК-маркер «100bp Ladder». Прямокутниками позначені зони локусу LU_25.

Саме з огляду на ці обставини, нами було проведено оцінку ефективності застосування принципово іншого типу молекулярних маркерів, що дозволяє

диференціювати генотипи рослин на основі поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. Продемонстровано, що застосування запропонованого методу дозволяє не менш надійно ідентифікувати та диференціювати сорти та генотипи льону, ніж за допомогою SSR-аналізу. При цьому вдається значно скоротити час роботи, і зникає необхідність обробки великого обсягу даних. Беручи до уваги розраховані значення PIC, можна зробити висновок, що дані, отримані за допомогою TBP методу, щонайменше, так само надійні, як і отримані із застосуванням SSR-маркерів. І хоча в деяких випадках значення PIC, отримані при використанні TBP методу є меншими, ніж значення PIC для SSR методу, це не свідчить про гіршу диференціюючу здатність методу. Це є наслідком того, що для порівняльної оцінки двох методів цілеспрямовано були відібрані SSR-послідовності з найвищими значеннями PIC [93], бо з самого початку за мету ставилась перевірка ефективності застосування TBP методу в порівнянні з SSR-маркерами. Відмінності, які спостерігаються при порівнянні трьох дендрограм, отриманих при використанні результатів TBP методу і двох SSR-маркерів, ймовірно, можуть бути пояснені тим фактом, що мікросателіти є анонімними маркерами і схильні до гіпермутабільності [61].

Проте слід зазначити, що TBP метод не завжди адекватно працює на різних таксономічних рівнях, оскільки його чутливість залежить від біологічного походження, історії розмноження і частоти перехресного запилення між різними сортами. Як правило, високоалогамні види легко ідентифікуються за допомогою TBP-аналізу [103]. Окультурений льон вирощується вже багато тисяч років, тому процес його запилення постійно контролюється, що робить зміни його генетичної конституції на популяційному/сортному рівні досить незначними. Можливо, це є однією з причин того, що на міжсортному рівні відмінності між зразками не були настільки великими. Разом з тим, за допомогою TBP методу вдалося диференціювати навіть окремі генотипи льону, встановивши при цьому рівень внутрішньосортного поліморфізму.

Важливо, що використання TBP методу забезпечує декілька переваг на практичному рівні, які включають економію часу і реагентів, оскільки одна і та ж

сама пара праймерів використовується для ПЛР незалежно від того, який таксономічний рівень досліджується. Для проведення ТВР-аналізу не потрібно наявності ніякого контрольного алеля, оскільки зразки ідентифікуються і диференціюються за їх ТВР-профілем, що складається з декількох смуг. Завдяки своїй простоті цей метод не вимагає будь-яких ускладнених обчислень, але дозволяє створити просту базу даних для перевірки ідентичності нових сортів [41]. Отже, ТВР метод поєднує в собі надійність і швидкість отримання вихідних даних, а також простоту їх аналізу. Крім того, на основі вироджених праймерів можна створити специфічну пару праймерів для льону з метою проведення більш точного аналізу на всіх таксономічних рівнях.

Таким чином, в результаті проведених досліджень з використанням ТВР та SSR методів досліджено міжсортівий та внутрішньосортівий поліморфізм сортів льону української селекції. Встановлено, що більшість з досліджених сортів є генетично неоднорідними. Показано, що ТВР метод може бути вдало застосований при дослідженні міжсортівого та внутрішньосортівого генетичного поліморфізму льону. Цей метод є швидким, простим, надійним молекулярно-генетичним інструментом, який може використовуватися як самостійно, так і в поєднанні з іншими маркерними системами для молекулярно-генетичного аналізу рослин льону.

3.6.4. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну в білоруських ландрасах льону

Завдяки унікальним властивостям волокна і олії льон почав використовуватися людиною ще на зорі цивілізації і до сих пір представляє інтерес для дослідження. Проте останнім часом накопичується все більше фактів того, що сучасна селекція зменшує генетичну різноманітність сортів сільськогосподарських рослин [122, 125]. Це пов'язано в першу чергу з тим, що часто нові сорти отримують в результаті схрещування генетично близьких сучасних сортів, а старі сорти, генетично більш різноманітні, але менш

продуктивні, рідко залучаються до селекційних програм. Такі тривалі схрещування призводять до зменшення рівня генетичної мінливості селекційного матеріалу. Тому в останні десятиліття в світі все більша увага приділяється опису та збереженню генетичного різноманіття рослин. Важливі його джерела зосереджені в стародавніх місцевих сортах і популяціях – ландрасах (landrace), які набули своїх відмінних ознак в результаті багаторічного вирощування і супутнього відбору в селянських господарствах в конкретній місцевості [27, 67, 120]. Термін «ландраса» вперше запропонував ще у 1908 р. Рюмкер як назву для сортів, які еволюціонували без свідомого (спрямованого) відбору [127]. Наразі ландраса зазвичай визначається як культивований, генетично гетерогенний сорт, який розвивався в певній екогеографічній області і тому адаптований до ґрунтово-кліматичних умов і до традиційних методів ведення господарства [17]. Такі сорти в силу тривалого природного відбору натлі мінімального використання засобів інтенсифікації добре пристосувалися до місцевих умов, але, як правило, є нетехнологічними і неконкурентоздатними при промисловому виробництві, а тому вимагають особливих заходів для збереження. Вивчення ландрас може не тільки дати повну картину генетичної різноманітності культурного виду, яка в сортах сучасної селекції вельми обмежена, але і дозволити виявити генотипи, цікаві в якості донорів рідкісних алелей генів господарськоцінних ознак [143].

Наразі збереження «ландрас» реалізується через використання в селянських господарствах (on-farm conservation) і є різновидом збереження *in situ* (іноді виділяється в окрему категорію «*Circa situm*») [146]. Однак більшість ландрас все ж таки зберігаються тепер тільки в генетичних колекціях. В Білорусі була створена і підтримується вже багато років досить велика та активно досліджувана колекція сортів льону [62]. Тому для нас стало можливим застосувати ТВР метод в генетичних дослідженнях білоруських ландрас льону.

При дослідженні білоруських ландрас *L. usitatissimum* було виявлено, що основна зона розподілу фрагментів ДНК перебувала в діапазоні від 400 п.н. до 1900 п.н., що є характерним для роду *Linum*. 17 з 30 виявлених фрагментів виявилися ідентичними для всіх вивчених ландрас, а 13 – поліморфними, з

розміром близько 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. 3.28). Частина досліджених генотипів льону характеризувалася специфічним набором ампліконів. Середнє значення PIS склало 0,136 при розрахунку за формулою 1 та 0,72 – за формулою 2.

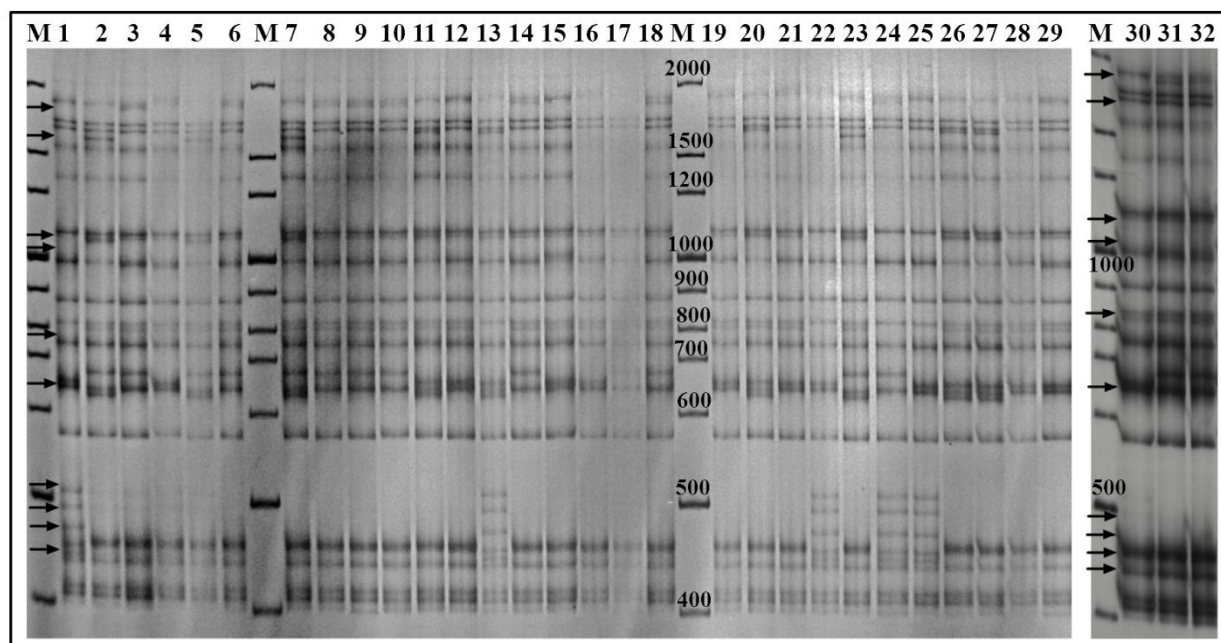


Рис. 3.28. Електрофореграма продуктів ампліфікації досліджених ландрас *L. usitatissimum*. Стрілками відмічені поліморфні ТВР-фрагменти; м – маркер; 1–32 (зверху) – номери зразків (див. Табл. 2.3).

При кластерному аналізі зразки розділилися на три групи (Рис. 3.29). Першу групу (з 100% бутстреп-підтримкою) утворили покращений сорт довгунця К-7236 і ландраса довгунцевого типу К-186. Другу групу склали 9 ландрас довгунцевого типу, 3 ландраси льону олійного типу, ландраса олійно-довгунцевого типу і стародавній сорт К-37. Середнє значення генетичної дистанції Нея в цій групі склало 0,214. Третю групу сформували решта 15 ландрас довгунцевого типу і 1 – довгунцево-олійного типу (К-5991). У третій групі повний набір виявлених ампліконів мали зразки ландрас К-594, К-5475, К-5991, а середнє значення генетичної дистанції Нея (D_S) склало 0,144. Також на частині зразків провели

аналіз оцінки поліморфізму довжини II-го інтрону генів β -тубуліну, проте він виявився менш ефективним ніж аналіз поліморфізму довжини I-го інтрону (див. Додаток Б). В цілому використання ТВР методу дозволило диференціювати вивчені ландраси *L. usitatissimum*, хоча вони і не групуються за якоюсь певною ознакою, наприклад, ландраси довгунцевого та олійного типу утворюють спільну гілку.

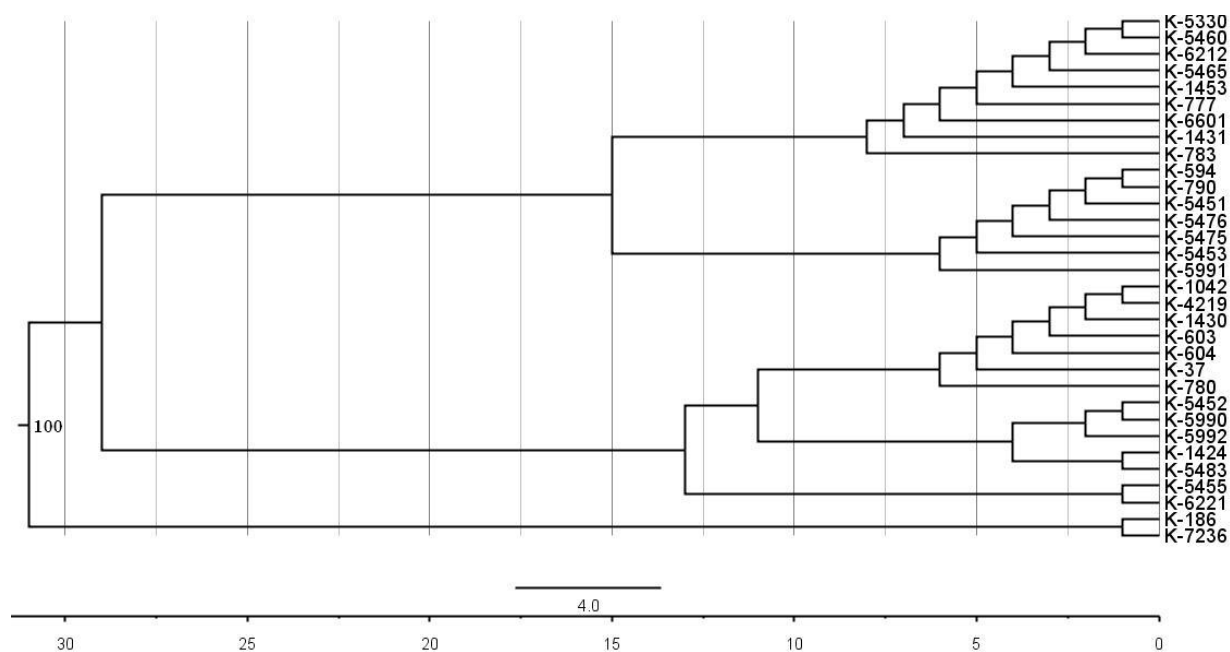


Рис. 3.29. Дендрограма UPGMA, пробудована за результатами оцінки поліморфізму довжини першого інтрону генів β -тубуліну ландрас льону.

Також було досліджено внутрішньосортний поліморфізм 30 ландрас. Назви ландрас, їх тип, наявність гетерогенності, кількість алельних фенотипів та значення PIS (за формулою 1) в межах кожного сорту наведені у Табл. 3.9. Гомогенними виявилися лише 5 з 30 ландрас, а саме: K-5992, K-6221, K-5455, K-5465, K-783. На Рис. 3.30 та Рис. 3.31 представлені результати електрофорезу продуктів ампліфікації за ТВР методом більшої частини сортів. Найбільше значення PIS виявилося у зразків K-5475, K-604, K-186 і становить 0,72 (за формулою 1). Найменше значення становить 0,32 і характерне для 6 зразків (K-594, K-1430, K-6601, K-780, K-603, K-790).

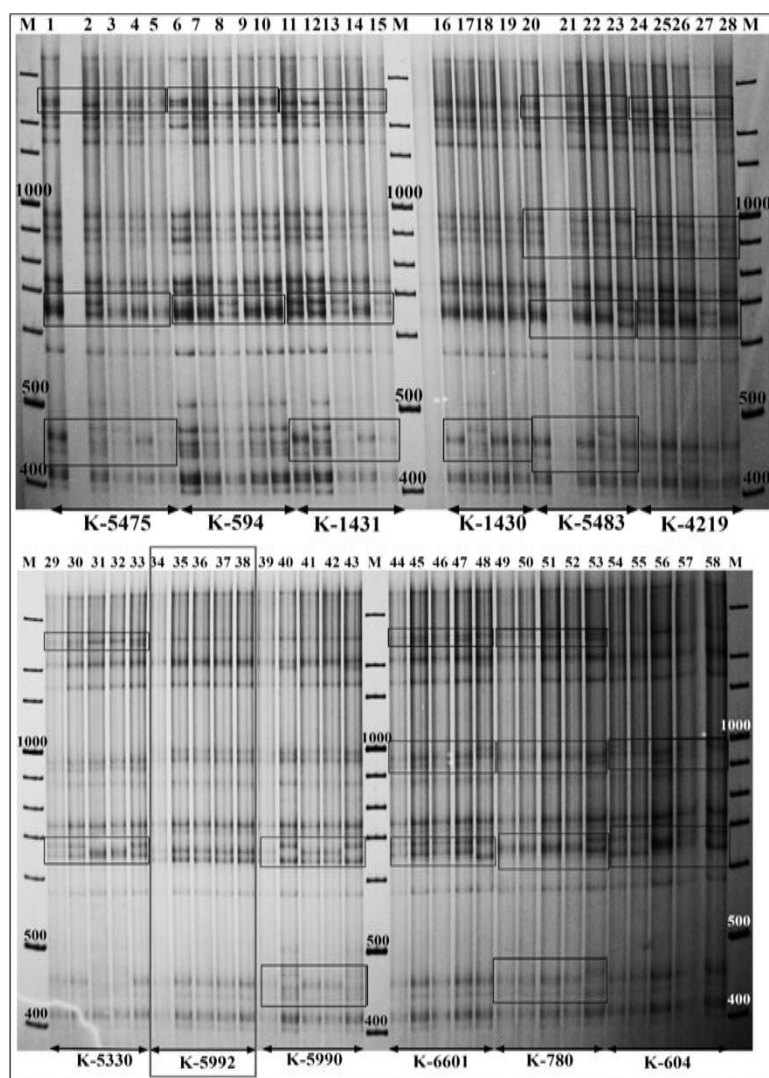


Рис. 3.30. Молекулярно-генетичні профілі ландрас льону, отримані за допомогою ТВР-аналізу: 1–58: назва зразка; М – ДНК-маркер «100 bp Ladder». Прямокутниками позначені зони поліморфізму, К-5992 відмічено як гомогенний сорт.

Загалом при дослідженні між- та внутрішньосортового поліморфізму у льону виявилось, що у порівнянні з сучасними сортами української селекції білоруські ландраси є більш різноманітними за поліморфізмом довжини інтронів генів β -тубуліну. Так, загальна кількість алельних фенотипів у українських сортів складає 6, а у ландрас – 7. Значення PIC між українськими сортами становить 0,48 (при цьому в межах кожного сорту варіює від 0,28 до 0,61), а між білоруськими ландрасами – 0,78 (в межах сорту від 0,32 до 0,72).

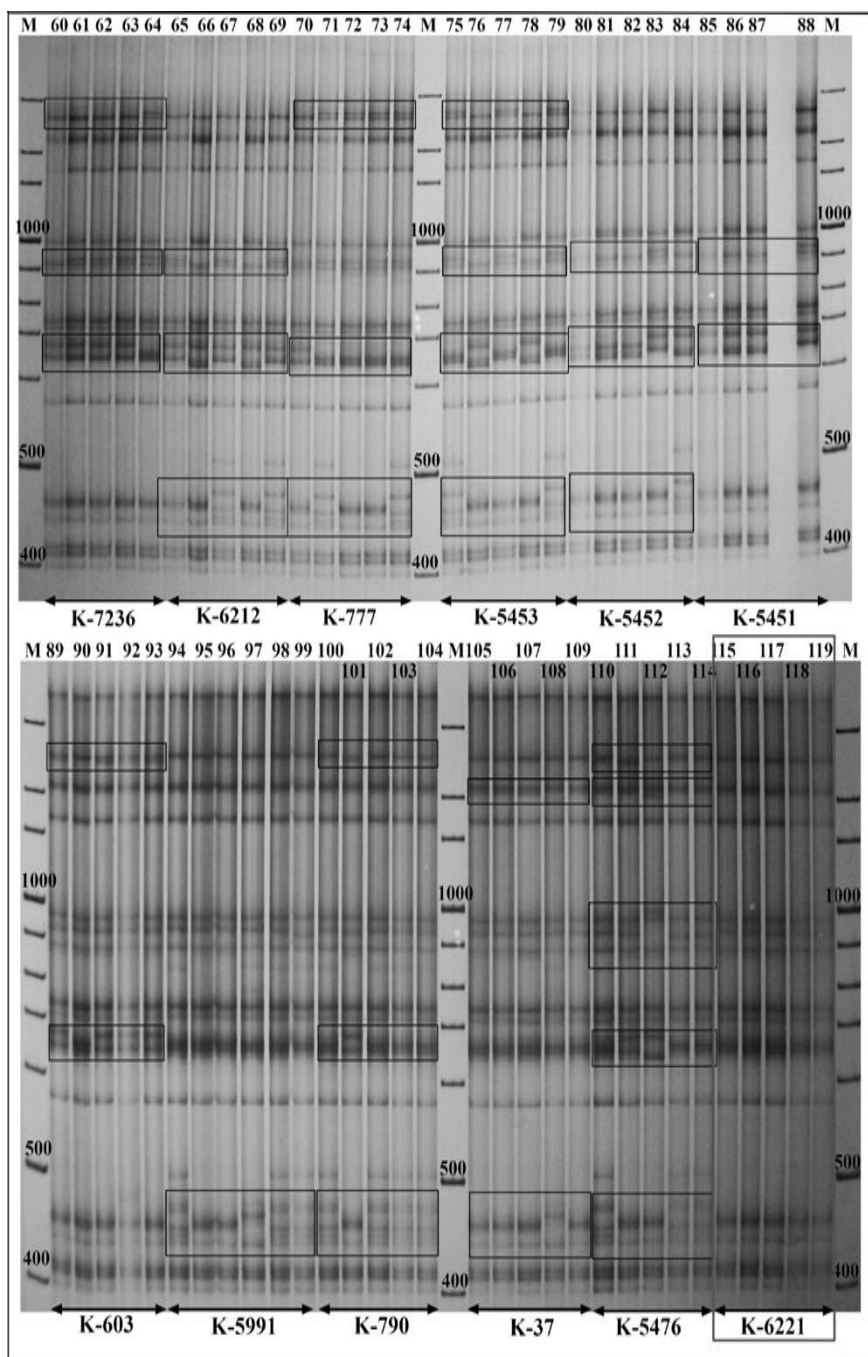


Рис. 3.31. Молекулярно-генетичні профілі ландрас льону, отримані за допомогою ТВР-аналізу: 60–119: назва зразка; М – ДНК-маркер «100 bp Ladder». Прямокутниками позначені зони поліморфізму, К-6221 відмічено як гомогенний сорт.

Отримані дані легко пояснити, оскільки при створенні сучасних сортів рослин селекціонери дотримуються правила, що сорт повинен бути відмінним, однорідним та стабільним (ВОС-тест) [149], а ландраси є стародавніми сортами,

які зростали та еволюціонували в різних екогеографічних умовах, і тому є більш гетерогенними.

Таблиця 3.9

**Результати аналізу генетичного поліморфізму досліджених білоруських
ландрас льону**

№	Назва сорту	Тип сорту	Наявність гетерогенності, +/-	Кількість фенотипів	Значення РІС в межах сорту
1	2	3	4	5	6
1	<i>K-5475</i>	довгунцевий	+	4	0,72
2	<i>K-594</i>	довгунцевий	+	2	0,32
3	<i>K-1431</i>	довгунцевий	+	3	0,56
4	<i>K-1430</i>	довгунцевий	+	2	0,32
5	<i>K-5483</i>	довгунцевий	+	3	0,56
6	<i>K-4219</i>	довгунцевий	+	2	0,48
7	<i>K-5330</i>	довгунцевий	+	2	0,48
8	<i>K-5992</i>	олійний	-	1	0
9	<i>K-5990</i>	довгунцево-олійний	+	2	0,48
10	<i>K-6601</i>	стародавній олійний	+	2	0,32
11	<i>K-780</i>	довгунцевий	+	2	0,32
12	<i>K-604</i>	олійний	+	4	0,72
13	<i>K-7236</i>	покращений довгунцевий	+	3	0,56
14	<i>K-6212</i>	довгунцевий	+	3	0,64
15	<i>K-777</i>	довгунцевий	+	3	0,64
16	<i>K-5453</i>	довгунцевий	+	3	0,64
17	<i>K-5452</i>	довгунцевий	+	3	0,56
18	<i>K-5451</i>	довгунцевий	+	3	0,56
19	<i>K-603</i>	олійний	+	2	0,32
20	<i>K-5991</i>	довгунцево-олійний	+	3	0,64
21	<i>K-790</i>	довгунцевий	+	2	0,32
22	<i>K-37</i>	стародавній довгунцевий	+	3	0,56
23	<i>K-5476</i>	довгунцевий	+	3	0,56
24	<i>K-6221</i>	довгунцевий	-	1	0
25	<i>K-5455</i>	довгунцевий	-	1	0
26	<i>K-1042</i>	довгунцевий	+	2	0,48

Продовж. табл. 3.9

1	2	3	4	5	6
27	K-186	довгунцевий	+	4	0,72
28	K-5465	довгунцевий	–	1	0
29	K-783	довгунцевий	–	1	0
30	K-1453	довгунцевий	+	2	0,48
Загалом (міжсортний поліморфізм)				7	0,78

Таким чином, ТВР метод може бути корисний для оцінки генетичної чистоти і однорідності ландрас льону, застосований в молекулярно-генетичному аналізі цього виду та задіяний в селекційній роботі.

Результати експериментальних досліджень розділу 3.6. наведено в таких публікаціях:

1. Рабокoнь АН, Пoстoвoйтoвa АС, Пиркo ЯВ, Блюм ЯБ. Анализ гoмoлoгoв гeнoв oснoвнoгo бeлкoв цитoскeлeтa у рaзличнoгo видoв вoсшoгo рaстeний. Фaктoри eкспeримeнтaльнoї eвoлюцiї oргaнiзмiв. 2014;14:76–78. (Здoбувaчeм рaзoм зi спiвaвтoрaми прoвeдeнo дoслiджeння, oпрaцьoвaнo oтримaнi дaнi тa нaписaнo стaттю).

2. Рабокoнь АН, Пиркo ЯВ, Дeмкoвич АЕ, Блюм ЯБ. Пoлимoрфизм длинo интронoв гeнoв бeтa-тубулинa кaк eффeктивнoй инстpумeнт гeнoтипирoвaния рaстeний. Мoлeкулaрнaя и приклaднaя гeнeтикa (Минск). 2015;19:35 – 44. (Здoбувaчeм рaзoм зi спiвaвтoрaми прoвeдeнo дoслiджeння, oпрaцьoвaнo oтримaнi дaнi тa нaписaнo стaттю).

3. Рабокoнь АМ, Дeмкoвич АЄ, Пиркo ЯВ, Блюм ЯБ. Исслeдoвaниe пoлимoрфизмa длинo интронoв гeнoв β-тубулинa у рaстeний рoдa *Linum* L. Фaктoри eкспeримeнтaльнoї eвoлюцiї oргaнiзмiв. 2016;19:43– 46. (Здoбувaчeм рaзoм зi спiвaвтoрaми прoвeдeнo дoслiджeння, oпрaцьoвaнo oтримaнi дaнi тa нaписaнo стaттю).

4. 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).

5. 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. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Під час проведення дисертаційного дослідження були обґрунтовані та розширені можливості застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну (tubulin-based polymorphism, TBP) для молекулярно-генетичної диференціації та фінгерпринтингу рослин на між- та внутрішньовидовому рівнях. Крім того, було перевірено ефективність даного методу на однодольних та дводольних рослинах. Для аналізу були обрані сільськогосподарські (або їх дикі родичі) однодольні рослини з родини Злакові (*Poaceae*) та дводольні з родин Капустяні (*Brassicaceae*) та Льонові (*Linaceae*).

Зокрема, було перевірено ефективність застосування TBP методу на здатність диференціювати види і генотипи рослин роду Елевсина (родина Злакові). Для досліджень було використано два сорти *E. coracana* української селекції, отримані шляхом класичної селекції (Тропіканка і Євгенія), два соматоклональних варіанти (SE-1, SE-4), які було отримано від сорту Тропіканка, та три генотипи *E. indica*, один з яких є природною популяцією цього виду *E. indica*, а два (4A-21, 4A-1) виникли як результат надбання стійкості до дії динітроанілінових гербіцидів. За результатами аналізу вдалося чітко розрізнити між собою як види, так і сорти Елевсини, оскільки на основі даних фінгерпринтинга всі зразки з високою бутстреп-підтримкою добре диференціюються один від одного, групуючись при цьому в два кластери: один кластер містить зразки *E. coracana*, а другий – *E. indica*. До того ж, у межах кожного кластера спостерігається розподіл у відповідності до їх генотипової приналежності. Отримані результати збігаються з аналогічними, отриманими для цих же зразків за допомогою ISSR-аналізу та підтверджуються роботами з морфологічної, фізіологічної та біохімічної характеристики обраних нами зразків соматоклональних варіантів. Тому даний метод можна використовувати в молекулярно-генетичних дослідженнях рослин роду Елевсина, в тому числі для маркування генотипів та оптимізації довготривалого традиційного селекційного процесу.

Наступним етапом наших досліджень стала перевірка можливості використання ТВР методу та його модифікацій (сТВР та hТВР) на внутрішньовидовому рівні, а саме в молекулярно-генетичних дослідженнях різних природних популяцій злакових рослин. В першу чергу було досліджено популяції рослин роду *Aegilops* L., який є найближчим родичем великого роду *Triticum* L., і являє собою природний резервуар корисних ознак для генетичного поліпшення пшениці. Було встановлено, що всі варіанти методу відтворюють достатню кількість поліморфних фрагментів ДНК. При цьому більшість зразків характеризується власним унікальним набором смуг. Використовуючи ТВР метод, вдалося диференціювати більшість досліджуваних генотипів *Ae. biuncialis*. Ті, які не розрізнялися за першим інтроном, відрізнялись за довжиною другого інтрону, або за їх комбінацією, тобто їх можна було відокремити за допомогою hТВР методу (що базується на залученні до аналізу обох інтронів). Проте 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), значно відрізняється. Разом з тим групи зразків, що мають найбільшу бутстреп-підтримку, зберігаються. Відмінності дендрограм можуть бути наслідком декілька причин. По-перше, розділення фрагментів за допомогою ПААГ є дуже складним і має певний ступінь неузгодженості. Більш того, є амплікони розміром вище 1500 п.н., тому дерева можуть відображати проблему відсутності високої роздільної здатності. По-друге, ми не можемо використовувати більш відповідну комбінацію праймерів, які, можливо, повинні бути краще підібрані для аналізованого рослинного матеріалу, тобто мають бути видоспецифічними. Усі варіанти методу поєднують надійність та швидкість отримання вихідних даних та простоту їх аналізу. Вони виявилися корисними для попередньої оцінки та класифікації на низьких таксономічних рівнях. Таким чином, методи, засновані на оцінці довжини інтронів, є джерелом корисної інформації для генетичної характеристики внутрішньовидового поліморфізму злаків, зокрема *Ae. biuncialis*.

Також оцінювали застосовність ТВР методу та його варіацій для встановлення молекулярно-генетичних відмінностей між різними популяціями *Deschampsia antarctica*. Цей вид злакових рослин викликає науковий інтерес завдяки ряду фізіологічних ознак, що забезпечують її виживання у суворох умовах Антарктики. Саме тому є актуальним дослідження генетичних відмінностей між популяціями, що зростають у різних екологічних умовах Антарктики. В результаті аналізу виявлена відсутність будь-яких відмінностей між дослідженими острівними популяціями *D. antarctica* за довжиною ПЛР-продуктів, що утворюються під час ТВР-, сТВР- або hТВР-аналізу. Це свідчить не про те, що цей метод має обмеження і не здатний диференціювати популяції щучника. Його висока ефективність та диференціальні властивості були продемонстровані при генетичній диференціації двох альпійських екотипів щучника дернистого (*D. cespitosa*), які суттєво відрізнялися умовами зростання і мали, відповідно, різні ТВР-профілі. Відсутність поліморфізму інтронів генів β -тубуліну у проаналізованих вибірках *D. antarctica* може свідчити про низький рівень генетичного поліморфізму цього виду в дослідженому регіоні. Подібні дані вказують на низьке генетичне різноманіття антарктичних популяцій *D. antarctica* і були отримані раніше за допомогою інших методів молекулярно-генетичного аналізу.

Оскільки молекулярно-генетичні маркери систематично застосовують для аналізу різних сортів сільськогосподарських рослин, наприклад, при перевірці однорідності або диференціації сортів, було необхідним встановити наскільки ефективним є застосування ТВР методу для дослідження рослин на рівні сортів. Оскільки пшениця та ячмінь є основними продовольчими культурами світу, в тому числі і України, було проведено аналіз їх сортів за допомогою ТВР методу. Виявлено міжсортівий поліморфізм в межах досліджених сортів цих видів. Отримані результати продемонстрували непогану диференціюючу спроможність ТВР методу для оцінки генетичного поліморфізму сортів пшениці та ячменю та можливості його використання для фінгерпринт-аналізу.

Таким чином, отримані результати дозволяють нам однозначно стверджувати, що ТВР метод може бути успішно використаний для ідентифікації та диференціації різних видів, популяцій та сортів різних злакових рослин класу однодольних. Проте, чи так само добре цей метод може бути застосований в молекулярно-генетичних дослідженнях дводольних рослин ще необхідно було перевірити у подальших дослідженнях. Оскільки рижій посівний (*Camelina sativa*), з родини Капустяні (*Brassicaceae*) є перспективною біоенергетичною культурою, він став однією з модельних систем у генетичних та геномних досліджень. Генетичний поліморфізм і філогенія сортів *C. sativa* були вже вивчені раніше за допомогою ТВР-аналізу, тому для нас можливим було проаналізувати ефективність використання ТВР методу при роботі з вітчизняними сортами *C. sativa*, що може стати в нагоді для подальшої роботи з ними селекціонерів при створенні сортів. Було проведено ТВР- та сТВР-аналіз перспективних олійних сортів та сортозразків *C. sativa* здебільшого з колекції Національного ботанічного саду НАН України ім. М. М. Гришка. За допомогою даного методу вдалося ідентифікувати та диференціювати всі досліджувані зразки.

Іншою важливою сільськогосподарською культурою є льон культурний (*Linum usitatissimum*), що належить до родини Льонові (*Linaceae*). Це найдавніша сільськогосподарська рослина, яка широко використовується в різних галузях промисловості, проте його генетичні карти все ще залишаються неповними, а дослідження цієї культури з використанням ТВР зовсім не проводилися. Спочатку нами було перевірено застосовність цього методу на п'яти різних видах льону. За допомогою ТВР та сТВР методів вдалося однозначно розділити досліджені види. Крім того, дендрограми, побудовані за результатами ТВР та сТВР методів, виявилися подібними та вносять подібні елементи ясності у картину філогенії даних видів у питаннях, які досі залишались невирішеними. На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що *L. angustifolium* та *L. bienne* є різними видами. При цьому, можливо, що *L. bienne* дійсно є підвидом *L. usitatissimum*. Таким чином, даний метод може бути успішно застосований в молекулярно-філогенетичному аналізі видів роду *Linum* L.

Після дослідження видів льону увагу було зконцентровано на його сортах різного географічного походження. Щоби перевірити, чи здатний ТВР метод диференціювати сорти різної селекційної спрямованості, був проведений ТВР-аналіз 7-ми сортів *L. usitatissimum*, що походять з різних країн і тому є представниками різних селекційних програм, а саме, Китаю, Нідерландів, України та Росії. За результатами кластерного аналізу всі зразки з високими значеннями бутстреп-підтримки розділилися на окремі гілки, і лише сорти Хейя 15 та Хейя 13 сформували спільну групу, що є логічним, бо вони є сортами з однієї групи селекції. При цьому всі зразки розподілилися таким чином, що сорти однієї селекції знаходяться поряд один з одним. Отже, за допомогою ТВР методу вдалося ідентифікувати та диференціювати сорти льону різного селекційного походження.

Наступним етапом дослідження став аналіз ефективності застосування методу ТВР для генотипування льону на прикладі вибірки сортів льону-довгунця української селекції. З цією метою дані, отримані за допомогою ТВР-аналізу, порівнювали з даними, отриманими з використанням двох найбільш ефективних видоспецифічних SSR-маркерів. За допомогою обох методів було виявлено та досліджено не лише міжсортівий, але й внутрішньосортівий поліморфізм льону. Для кожного досліджуваного сорту за допомогою ТВР- і SSR-аналізу були розраховані значення PIC, встановлений діапазон розмірів ампліконів і кількість виявлених алельних фенотипів. Встановлено, що більшість сортів льону української селекції є генетично неоднорідними. Показана досить висока ефективність використання ТВР-аналізу для диференціації генотипів льону в порівнянні з SSR-маркерами.

Останнім часом накопичується все більше фактів того, що сучасна селекція зменшує генетичну різноманітність сортів сільськогосподарських рослин, тому вивчення ландрас може не тільки дати повну картину генетичної різноманітності культурного виду, яка в сортах сучасної селекції вельми обмежена, але і дозволити виявити генотипи, цікаві в якості донорів рідкісних алелів генів господарськоцінних ознак. В Білорусі була створена та вже багато років

підтримується досить велика колекція сортів льону. Тому нами за допомогою ТВР-аналізу було досліджено 32 білоруські ландраси *L. usitatissimum*. В цілому використання ТВР методу дозволило диференціювати вивчені ландраси *L. usitatissimum*, що також підтверджується досить високими значеннями генетичних дистанцій між ними. При дослідженні внутрішньосортного поліморфізму, як і очікувалося, встановлено значну генетичну гетерогенність стародавніх сортів. Отже, за допомогою ТВР вдалося диференціювати ландраси льону, а також дослідити їх внутрішньосортну різноманітність.

Загалом в даному дослідженні було здійснено системну оцінку можливостей 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, hТВР) при дослідженні однодольних та дводольних рослин на між- та внутрішньовидовому рівні, а саме: для видів і сортів пальчастого проса (*E. coracana*) та популяцій гусячої трави (*E. indica*), популяцій егілопсу (*A. biuncialis*), острівних популяцій щучника (*D. antarctica*, сортів пшениці (*T. aestivum*) та ячменю (*H. vulgare*); для дводольних рослин – сортах та сортозразках рижю посівного (*C. sativa*), видах (*L. bienne*, *L. angustifolium*, *L. usitatissimum*, *L. humile*, *L. perenne*) та різних сортах льону (*L. usitatissimum*). 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 і простоту їх аналізу.

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 міжсортного

поліморфізму у пшениці (*Triticum aestivum*) та ячменю (*Hordeum vulgare*), що може бути використано при розробці селекційних програм для цих видів.

5. Виявлено низький міжсортний 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 міжсортний поліморфізм довжини I-го інтрону генів β -тубуліну. У ході подальшого дослідження цих сортів льону на внутрішньосортному 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 внутрішньосортну 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Allaby RG, Peterson GW, Merriwether DA, Fu YB. Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the *sad2* locus. *Theor. Appl. Genet.* 2005;112(1):58–65.
2. Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome.* 1993;36:181–186.
3. Babu B, Senthil N, Gomes S, Biji K, Rajendraprasad N, Kumar S, Babu R. Assessment of genetic diversity among finger millet (*Eleusine coracana* L.) accessions using molecular markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 2007;54:399–404.
4. Badoni S, Das S, Sayal YK, Gopalakrishnan S, Singh AK, Rao AR et al. Genome-wide generation and use of informative intron-spanning and intron-length polymorphism markers for high-throughput genetic analysis in rice. *Scientific reports.* 2016;6:23765.
5. Bardini M, Lee D, Donini P, Mariani A, Giani S, Toschi M et al. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. *Genome.* 2004;47:281–91.
6. Batzoglou S, Pachter L, Mesirov JP, Berger B, Lander ES. Human and mouse gene structure: comparative analysis and application to exon prediction. *Genome Res.* 2000;10:950–58.
7. Benbouza H, Jacquemin J-M, Baudoin J-P, Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006;10(2):77–81.
8. Blakeney M. Intellectual property, biological diversity and agricultural research in Australia. *Austral. J. Agricult. Res.* 2002;53:127–147.
9. Blume YaB, Baird WV, Yemets AI, Breviario D. The plant cytoskeleton: key tool for agro-biotechnology. Berlin, Heidelberg, NY: Springer-Verlag; 2008. 457 p.
10. Braglia L, Gavazzi F, Giovannini A, Nicoletti F, De Benedetti L, Breviario D. TBP-assisted species and hybrid identification in the genus *Passiflora*. *Mol Breeding.* 2014;33:209–219.

11. Braglia LB, Manca AM, Mastromauro FM, Breviario D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity*. 2010;2:572–585.
12. Breviario D, Baird WV, Sangoi S, Hilu K, Blumetti P, Giani S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined β -tubulin introns. *Mol. Breeding*. 2007;20:249–59.
13. Breviario D, Gian S, Morello L. Multiple tubulins: evolutionary aspects and biological implications. *The Plant Journal*. 2013;75(2):202-18.
14. Breviario D, Giani S, Ponzoni E, Mastromauro F, Morello L. Plant tubulin intronics. *Cell Biol. Int*. 2008;32:571–73.
15. Breviario D, Giani S, inventors. Process for the evaluation and the monitoring of genetic variability of vegetable species. Patent Europ N. 1 144 691 (Domanda N. 99963667.3) EX-PCT/IT99/00415. 1999 Dec 20.
16. Breviario D. *Plant Tubulin Genes: Regulatory and Evolutionary Aspects*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: Plant Cell Monogr; 2008. <http://www.researchgate.net/>
17. Casañas F, Simó J, Casals J, Prohens J. An evolved concept of landrace. *Frontiers in plant science*. 2017;8:145.
18. Chandrawati, Singh N, Kumar R, Kumar S, Singh PK, Yadav VK et al. Genetic diversity, population structure and association analysis in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2017;23:207–219.
19. Choi HK, Luckow MA, Doyle J, Cook DR. Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. *Mol Genet Genomics*. 2006;276(1):56-70.
20. Choi H-K, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun J-H et al. A Sequence-Based Genetic Map of *Medicago truncatula* and Comparison of Marker Colinearity with *M. sativa*. *Genetics*. 2004;166:1463–1502.
21. Chwedorzewska KJ, Giełwanowska I, Szczuka E, Bochenek A. High anatomical and low genetic diversity in *Deschampsia antarctica* Desv. from King George Island, the Antarctic. *Pol. Polar Res*. 2008;29(4):377–386.

22. Cloutier S, Ragupathy R, Miranda E, Radovanovic N, Reimer E, Walichnowski A et al. Integrated consensus genetic and physical maps of flax (*Linum usitatissimum*L.). *Theor. Appl Genet.* 2012;125(8):1783–1795.
23. Dhaliwal HS, Harjit–Singh, William M. Transfer of rust resistance from *Aegilops ovata* into bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and molecular characterisation of resistant derivatives. *Euphytica.* 2002;126(2):153–159.
24. Dida MM, Devos KM, eds. Kole C. Genome mapping and molecular breeding in plants. Cereal and millets: Finger millet. Heidelberg: Springer; 2006. 297 p.
25. Diwan N, Cregan PB. Automated sizing of fluorescent–labeled simple sequence repeat (SSR) markers to assay genetic variation in soybean. *Theor Appl Genet.* 1997;95:723–33.
26. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 1987;19:11–15.
27. Duvick DN. Genetic diversity in major farm crops on the farm and in reserve. *Economic Botany.*1984;38(2):161–178.
28. Dzialuk AB, Jaroslaw Pcr–multiplex of six chloroplast microsatellites for population studies and genetic typing in *Pinus sylvestris*. *Silvae Genet.* 2004;53(5–6):246–248.
29. Ellis R, Burke JM. EST–SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity.* 2007;99:125–132.
30. Everaert I, Riek JD, Loose MD, Waes JV, Bockstaele EV. Most similar variety grouping for distinctness evaluation of flax and linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties by means of AFLP and morphological data. *Plant Var. Seeds.* 2001;14:69 –87.
31. Fakrudin B, Shashidhar HE, Kulkarni RS, Hittalmani S. Genetic diversity assessment of finger millet, *Eleusine coracana*, germplasm through RAPD analysis. *Plant Genet. Res. Newsl.* 2004;138:50–54.
32. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes.* 2007;7:574–578.

33. Feldman M, Levy AA. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat ge-nomes. *Cytogenet. Genome Res.* 2005;109(1–3):250–258. doi: 10.1159/000082407.
34. Feltus FA, Singh HP, Lohithaswa HC, Schulze SR, Silva TD, Paterson AH. A comparative genomics strategy for targeted discovery of singlenucleotide polymorphisms and conserved–noncoding sequences in orphan crops. *Plant Physiol.* 2006;140:1183–1191.
35. Ferreira AO, Cardoso HG, Macedo ES, Breviario D, Arnholdt–Schmitt B. Intron polymorphism pattern in AOX1b of wild St John’s wort (*Hipericum perforatum*) allows discrimination between individual plants. *Physiol. Plantarum.* 2009;137:520–531.
36. Fiume E, Christou P, Gianì S, Breviario D. Introns are key regulatory elements of rice tubulin expression. *Planta.* 2004;218:693–703.
37. Frohlich A, Rice B. Evaluation of *Camelina sativa* oil as a feedstock for biodiesel production. *Ind Crops Prod.* 2005;21:25–31.
38. Fu YB. Redundancy and distinctiveness in flax germplasm as revealed by RAPD dissimilarity. *Plant Genet Resour.* 2006;4:117–124.
39. Galasso I, Manca A, Braglia L, Martinelli T, Morello L, Breviario D. h–TBP: an approach based on intron–length polymorphism for the rapid isolation and characterization of the multiple members of the b–tubulin gene family in *Camelina sativa* (L.) Crantz . *Mol Breeding.* 2011;28:635–645.
40. Galasso I, Manca A, Braglia L, Ponzoni E, Breviario D. Genomic fingerprinting of *Camelina* Species using cTBP as molecular marker. *American Journal of Plant Sciences.* 2015;6(8):1184–1200.
41. Gavazzi F, Braglia L, Mastromauro F, Gianm S, Morello L, Breviario D. The tubulin–based–polymorphism method provides a simple and effective alternative to the genomic profiling of grape. *Plos One.* 2016;11(9):e0163335.
42. Gavazzi F, Casazza AP, Depedro C, Mastromauro F, Breviario D. Technical improvement of the TBP (tubulin–based polymorphism) method for plant

- species detection, based on capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2012;33:2840–51.
43. Gehringer A, Friedt W, Lühs W, Snowdon RJ. Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). *Genome*. 2006;49:1555–1563.
 44. Ghamkhar K, Croser J, Aryamanesh N, Campbell M, Kon'kova N, Francis C. *Camelina* (*Camelina sativa* (L.) Crantz) as an Alternative Oilseed: Molecular and Ecogeographic Analyses. *Genome*. 2010;53(7):558–567.
 45. Gimode D, Odeny DA, de Villiers EP, Wanyonyi S, Dida MM, Mnene EE et al. Identification of SNP and SSR Markers in Finger Millet Using Next Generation Sequencing Technologies. *Plos One*. 2016;11(7):e0159437.
 46. Haftom B, Teklehaimanot H, Kassahun T. Genetic diversity and population structure of Ethiopian finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn) genotypes using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Afr J Biotechnol*. 2017;16(21):1203–1209.
 47. Hillis DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biol*. 1993;42:182–192.
 48. Hongtrakul V, Huestis GM, Knapp SJ. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor Appl Genet*. 1997;95: 400–407.
 49. Hutcheon C, Ditt RF, Beilstein M, Comai L, Schroeder J, Goldstein E et al. Polyploid genome of *Camelina sativa* revealed by isolation of fatty acid synthesis genes. *BMC Plant Biol*. 2010;10:233.
 50. IATA Report “Report on alternative fuels” 5th Edition Ref. ISBN 978–92–9233–491–8. Montreal Geneva. 2010;No:9709–03.
 51. Inada DC, Bashir A, Lee C, Thomas BC, Ko C, Goff SA, Freeling M. Conserved noncoding sequences in the grasses. *Genome Res*. 2003;13:2030–2041.
 52. Ishikawa G, Yonemaru J, Saito M, Nakamura T. PCR–based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes. *BMC Genomics*. 2007;8:135.

53. Ivanovych Y, Volkov R. Genetic relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from Ukraine determined by microsatellite markers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 2018;93:64–72.
54. Ivanovych Ya I, Udovychenko KM, Bublyk MO, Volkov RA. ISSR-PCR fingerprinting of Ukrainian sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Cytol. Genet.* 2017;51(1):40–47.
55. Jagadeesh SN, Muthukumar M, Hifzur R, Senthil N, Raveendran M Development and validation of SSR markers in Finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn). *International Journal of Tropical Agriculture.* 2015;33(3):2055–66.
56. Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Kim C, An G. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiol.* 2000;123(3):1005-14.
57. Jhala AJ, Hall LM. Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current uses and future applications. *Austral J Basic Appl Sci.* 2010;4(9):4304–12.
58. Kagale S, Koh C, Nixon J, Bollina V, Clarke WE, Tuteja R et al. The Emerging Biofuel Crop *Camelina sativa* Retains a Highly Undifferentiated Hexaploid Genome Structure. *Nature Communications.* 2014;5:3706.
59. Kalendar R, Schulman AH. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols.* 2006; 1(5):2478–84.
60. Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica.* 2011;177:309–34.
61. Khlestkina EK. Molecular markers in genetic studies and breeding. *Russ. J. Genetics.* 2014;4(3):236–44.
62. Kilchevsky AV, Khotyleva LV. (Eds.) Genetic aspects of plant breeding: Biotechnology in plant breeding. *Genomics and Genetic Engineering.* Minsk: Belaruskaya Navuka; 2014, vol. 4 (in Russ.)
63. Kim JK, An GH, Ahn SH, Moon YH, Cha YL, Bark ST et al. Development of SCAR marker for simultaneous identification of *Miscanthus sacchariflorus*, *M. sinensis* and *M. x giganteus*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012;35:55–59.

64. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge University Press; 1983.
65. Kita T, Komatsu K, Zhu S, Iida O, Sugimura K, Kawahara N et al. Development of intron length polymorphism markers in genes encoding diketide–CoA synthase and curcumin synthase for discriminating *Curcuma* species. *Food chemistry*. 2016;194:1329–36.
66. Koebner RMD, Powell W, Donini P. Contributions of DNA molecular marker technologies to the genetics and breeding of wheat and barley. *Plant Breed Rev*. 2001;21:181–220.
67. Koeyer DL, Phillips RL, Stuthman DD. Changes in genetic diversity during seven cycles of recurrent selection for grain yield in oat, *Avena sativa* L. *Plant Breeding*. 1999;118(1):37–43.
68. Kondratyuk AV, Kilchevsky AV, Kuzminova EI. Microsatellite loci polymorphism analysis of Belarusian and foreign breeding potato varieties. *Mol Appl Genetics (Minsk)*. 2005;13:24–29.
69. Kulibaba RA, Liashenko YV. Influence of the PCR artifacts on the genotyping efficiency by the microsatellite loci using native polyacrylamide gel electrophoresis. *Cytol Genet*. 2016;50(3):162–167.
70. Kumar A, Sharma N, Panwwar P, Gupta A. Use of SSR, RAPD markers and protein profiles based analysis to differentiate *Eleusine coracana* genotypes differing in their protein content. *Mol Biol Rep*. 2012;39:4949–60.
71. Kvavadze E, Bar–Yosef O, Belfer–Cohen A, Boaretto E, Jakeli N, Matskevich Z, Meshveliani T. 30,000–Year–old wild flax fibers. *Science*. 2009;325(5946):1359.
72. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 2:2947–48.
73. Le Hir H, Nott A, Moore MJ. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(4):215–20.
74. Lessa EP, Applebaum G. Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol Ecol*. 1993;2:119–129.

75. Lessa EP. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Mol Biol Evol.* 1992;9:323–30.
76. Li X, Tan L, Wang L, Hu S, Sun C. Isolation and characterization of conserved non-coding sequences among rice (*Oryza sativa* L.) paralogous regions. *Mol Genet Genomics.* 2009;281:11–18.
77. Liaud MF, Brinkmann H, Cerff R. The β -tubulin gene family of pea: primary structures, genomic organization and introndependent evolution of genes. *Plant Mol. Biol.* 1992;18:639–651.
78. Luduena RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol.* 1998;178:207–275.
79. Makkouk K, Ghulam W, Comeau A. Resistance to barley yellow dwarf luteovirus in *Aegilops* species. *Can J Plant Sci.* 1994;74:631–34.
80. Manca A, Galasso I. Development of simple sequence repeat (SSR) markers in *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Minerva Biotec.* 2010;2:43–5.
81. Manca A, Pecchia P, Mapelli S, Masella P, Galasso I. Evaluation of genetic diversity in a *Camelina sativa* (L.) Crantz collection using microsatellite markers and biochemical traits. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2012;60:1223–1236.
82. Marcussen T, Sandve SR, Heier L, Spannagl M, Pfeifer M et al. International wheat genome sequencing consortium: Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science.* 2014;345(6194):1250092.
83. McKean PG, Vaughan S, Gull K. The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci.* 2001;114:2723–2733.
84. Morello L, Bardini M, Sala F, Breviario D. A long leader intron of the *OsTub16* rice beta-tubulin gene is required for high level gene expression and can autonomously promote transcription both in vivo and in vitro. *Plant J.* 2002;(1):33-44
85. Morello L, Breviario D. Plant spliceosomal introns: not only cut and paste. *Curr. Genomics.* 2008;9:227–38.

86. Mosula MZ, Andreev IO, Mel'nyk VM, Konvalyuk II, Drobyk NM, Kunakh VA. Molecular markers to assess genetic diversity of *Gentiana lutea* L. from the Ukrainian Carpathians. *Plant Genetic Resources*. 2015;13(3):266–273.
87. Muthamilarasan M, Suresh BV, Pandey G, Kumari K, Parida SK, Prasad M. Development of 5123 intron-length polymorphic markers for large-scale genotyping applications in Foxtail millet. *DNA research*. 2014;21:41–52.
88. Nei M. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 1972;106:283–292.
89. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:5269–73.
90. Nogales E. Structural insights in to microtubule function. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:277–302.
91. Oh TJ. RFLP and RAPD mapping in flax (*Linum usitatissimum*). *Theor Appl Genetics*. 2000;101:590–93.
92. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit . *Bioinformatics*. 2012;28:1166–1167.
93. Pali V, Kumar SV, Suchita X, Ravi RS, Mehta N, Balkrishna SV. Identification of microsatellite markers for fingerprinting popular Indian flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars and their utilization in seed genetic purity assessments. *Austral J Crop Sci*. 2014;8(1):119–126.
94. Pali V, Mehta N, Verulkar SB, Xalxo MS, Saxena RR. Molecular diversity in flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by DNA based markers. *Int J Plant Res*. 2015;28:157–165.
95. Palumbi S, Baker C. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol Biol Evol*. 1994;11:426–435.
96. Parani M, Rajesh K, Lakshmi M, Parducci L, Szmidt AE, Parida A. Species identification in seven small millet species using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of trnS –psbS gene region. *Genome*. 2001;44:459–499.

97. Parnikoza I, Kozeretska I, Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation. *Am J Plant Sci.* 2011;2(3):381–395.
98. Patil PD, Gude VG, Deng S. Biodiesel production from *Jatropha curcas*, waste cooking, and *Camelina sativa* oils. *Ind Eng Chem Res.* 2009;48:10850–56.
99. Pavlicek A, Hrda S, Flegr J. FreeTree – Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biol.* 1999;45:97–99.
100. Perumal BS, Sakharkar KR, Tak Kwong Chow V, Kanguene P, Sakharkar MK. Intron position conservation across eukaryotic lineages in tubulin genes. *Front. Biosci.* 2005;10:2412-19.
101. Peter N. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants. *Int Rev Cytol.* 1998;184:33–80.
102. Pirko NN, Demkovych 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. *Journal of botany.* 2016; VIII, NR. 2(13):5–9.
103. Pirko YaV. Studying of genetic diversity different species of plants by analyzing polymorphism of introns of β -tubulin genes. *Industr. Botany.* 2011;11:152–156 (in Ukr).
104. Poczai P, Cernák I, Gorji AM, Nagy S, Taller J, Polgár Z. Development of intron targeting (IT) markers for potato and cross-species amplification in *Solanum nigrum* (Solanaceae). *Am J Bot.* 2010;97:e142–145.
105. Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JPT et al. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods.* 2013; 9:6.
106. Ponzoni E, Morello L, Gianì S, Breviario D. Traceback identification of plant components in commercial compound feed through an oligonucleotide microarray based on tubulin intron polymorphism. *Food Chemistry.* 2014;162:72–80.

107. Ponzoni E, Breviario D, Mautino A, Gianì S, Morello L. A multiplex, bead-based array for profiling plant-derived components in complex food matrixes. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405:9849–9858.
108. Rafalski JA, Tingey SV. RFLP map of soybean (*Glycine max*) 2N = 40. In: *Genetic Maps* (O'Brien, S.J., ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. 1993;149–156.
109. Rai GK, Singh M, Rai NP, Bhardwaj DR, Kumar S. In vitro propagation of spine gourd (*Momordica dioica* Roxb.) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD analysis. *Physiol Mol Biol Plants.* 2012;18:273–280.
110. Rambaut A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. 2009.
111. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology.* 1985;5:69–76.
112. Saidi N, Kadir J, Wei L. Hong Genetic Diversity and Morphological Variations of Goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn] Ecotypes in Malaysia. *Weed Turf Sci.* 2016;5(3):144–154.
113. Sambrook J, David WR. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor; 2001, V. 2.
114. Saunders IW, Brohede J, Hannan GN. Estimating genotyping error rates from Mendelian errors in SNP array genotypes and their impact on inference. *Genomics.* 2007;90:291–296.
115. Schulman AH. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica.* 2007;158:313–21.
116. Singh P, Mehta N, Sao A. Genetic purity assessment in linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties using microsatellite markers. *The Bioscan.* 2015;10(4):2031–36.
117. Singh R, Bollina V, Higgins EE, Clarke WE, Eynck Ch, Sidebottom Ch et al. Single-nucleotide polymorphism identification and genotyping in *Camelina sativa*. *Molecular Breeding.* 2015;35(1):1–13.

118. Sinha A, Pande A. Finger printing of *Eleusine coracana* L. (Gaertn.) using microsatellite markers. *BioResearch Bull.* 2010;2:51–58.
119. Slade RW, Moritz C, Heideman A, Hale PT. Rapid assessment of single-copy nuclear DNA variation in diverse species. *Mol Ecol.* 1993;2:359–373.
120. Tanksley SD, McCouch SR. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science.* 1997;277(5329):1063–66.
121. Thomas BC, Rapaka L, Lyons E, Pedersen B, Freeling M. Arabidopsis intragenomic conserved noncoding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:3348–53.
122. Tripp R. Biodiversity and modern crop varieties: sharpening the debate. *Agriculture and Human Values.* 1996;13(4):48–63.
123. Ujihara T, Taniguchi F, Tanaka J, Hayashi N. Development of Expressed Sequence Tag (EST)-based Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) markers of tea plant and their application to cultivar identification. *J Agric Food Chem.* 2011;59:1557–64.
124. van de Wouw MJ, van Dijk PJ, Huiskes AHL. Regional genetic diversity patterns in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.). *Journal of Biogeography.* 2008;35(2):365–376.
125. Vellve R. The decline of diversity in European agriculture. *The Ecologist.* 1993;23(2):64–69.
126. Vollmann J, Grausgruber H, Stift G, Dryzhyruk V, Lelley T. Genetic Diversity in *Camelina germplasm* as Revealed by Seed Quality Characteristics and RAPD Polymorphism. *Plant Breeding.* 2005;124:446–53.
127. von Rümker K. Die systematische Einteilung und Benennung der Getreidesorten für praktische Zwecke. *Jahrb Dtsch Landwirtsch Ges.* 1908;23:137–167.
128. Wang J, Zhang W, Zhao H, Li FR, Wang ZG, Ji J et al. Molecular cytogenetic characterization of the *Aegilops biuncialis* karyotype. *Genet Mol Res.* 2013;12(1):683 – 92.

129. Wang X, Zhao X, Zhu J, Wu W. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 2005;12(6):417–27.
130. Wang Z, Hobson N, Galindo L, Zhu S, Shi D, McDill J et al. The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled *de novo* from short shotgun sequence reads. *Plant J.* 2012;72:461–73.
131. Wei H, Fu Y, Arora R. Intron-flanking EST-PCR markers: from genetic marker development to gene structure analysis in *Rhododendron*. *Theor Appl Genet.* 2005;111:1347–56.
132. Weining S, Langridge P. Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor Appl Genet.* 1991;82:209–216.
133. Xinyao Xia, Lin Lin Luan, Guanghua Qin, Li Fang Yu, Zhi Wei Wang, Wan Chen Dong et al. Genome-wide analysis of SSR and ILP markers in trees: diversity profiling, alternate distribution, and applications in duplication. *Scientific Reports.* 2017;7:17902.
134. Yang L, Jin G, Zhao X, Zheng Y, Xu Z, Wu W. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. *Bioinformatics.* 2007;3:2174–2177.
135. Yang Z, Goldman N, Friday A. Comparison of models for nucleotide substitution used in maximumlikelihood phylogenetic estimation. *Mol Biol Evol.* 1994;3(11):16–324.
136. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden ThL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
137. Zhao XQ, Wu WR. Construction of a genetic map based on ILP markers in rice. (Article in Chinese). 2008;30(2):225–230.
138. Баер ГЯ, Емецъ АИ, Стадничук НА, Рахметов ДБ, Блюм ЯБ. Соматональная вариабельность как источник для создания новых сортов пальчатого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. *Цитология и генетика.* 2007;41:9–15.

139. Баєр ГЯ, Рахметов ДБ, Стадничук НА, Емец АІ, Блюм ЯБ. Сомаклональна варіабельність в культурі *in vitro* як джерело отримання селекційного матеріалу пальчастого проса *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. Физиол. биохим. культ. растений. 2009;35:1–8.
140. Баєр ГЯ, Пидюра МО, Пірко ЯВ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Біоінформаційний пошук послідовностей генів, що кодують тубуліни у геномі льону. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014;14:14–17.
141. Баєр ГЯ, Пірко ЯВ, Стадничук НО, Рахметов ДБ, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Дослідження генетичної мінливості генотипів *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. та *Eleusine indica* (L.) Gaertn. за допомогою ISSR–аналізу. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2013;13:6–9.
142. Блюм Я, Рахметов Д, Стадничук Н. Пальчатое просо, или элевсина: находка для небольших хозяйств. Зерно: всеукраинский журнал современного агропромышленника. 2012;4:66–72.
143. Богданова МВ. Выявление потенциально адаптивных белорусских ландрас льна (*Linum usitatissimum* L.), несущих инсерцию LIS–1. Экологическая стабилизация аграрного производства. Научные аспекты решения проблемы. Сборник докладов Международной научно–практической конференции молодых ученых и специалистов. 2015; с. 13–18.
144. 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 селекціонерів. 2017;15(2):159–166.
145. Календарь РН, Глазко ВИ. Типы молекулярно–генетических маркеров и их применение. Физиология и биохимия культурных растений. 2002;34(4):279–296.
146. Кильчевский АВ, Хотылева ЛВ. Генетические основы селекции растений. Общая генетика растений (В. 4, Т. 1). Минск : Беларус. наука; 2008.

147. Конарев АВ. Использование молекулярных маркеров в работе с генетическими ресурсами растений. Сельскохозяйственная биология. 1998;5:3–25.
148. Лемеш ВА. Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов. Мол и прикл генетика: Сб. науч. тр. 2008;8:94–104.
149. Лещук НВ, Зрібняк ММ. Державна реєстрація сортів овочевих культур – основа формування національних сортових ресурсів. Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин: Наук.-практ. ж-л. 2005;2:86–96.
150. Логінов МІ, Кривошеєва ЛМ, Кандиба НМ, Чучвага ВІ, Йотка АК, Лапенко ОЮ. Наукові досягнення в напрямі селекції та створення нових сортів льону–довгунця. Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія: Агрономія і біологія. 2016;2:209–13.
151. Мосула МЗ, Конвалюк ІІ, Мельник ВМ, Бублик ОМ, Андреев ІО, Дробик НМ, Кунах ВА. Аналіз генетичної різноманітності популяцій *Gentiana lutea* L. методом маркування міжретротранспозонних послідовностей (IRAP-ПЛР). Физиология растений и генетика. 2014;46(1):45–55.
152. Мухина ЖМ. Молекулярные маркеры и их использование в селекционно–генетических исследованиях. Научный журнал КубГАУ. 2011;66(02):1–11.
153. Омашева МЕ, Аубакирова КП, Рябушкина НА. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования. Eurasian Journal of applied Biotechnology. 2013;4:20–28.
154. Постовойтова АС, Йотка ОЮ, Пірко ЯВ, Блюм ЯБ. Поліморфізм довжин інтронів генів актину у різних сортів льону–довгунця української селекції. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2017;20:99–103.
155. Рахметов ДБ, Баєр ГЯ, Стаднічук НО, Ємець АІ, Блюм ЯБ. Вивчення біохімічних характеристик соматональних варіантів пальчастого проса. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2008;5:430–34.
156. Рогаш АР. Льноводство. Москва: Колос; 1967. 583 с.

157. Стадничук НА. Интродукция *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. на уровне сорта в Лесостепи Украины. Биологическое разнообразие. Интродукция растений. Санкт–Петербург; 2003; 257-59.
158. Сулкарнаева АГ, Шитикова ВВ, Минибаева ФВ. Гомеологичные гены *Triticum aestivum* L.: структурные характеристики и дифференциальная активность. Ученые записки казанского университета. серия естественные науки. 2017;159(2):321–331.
159. Супрун ИИ, Токмаков СВ, Малюченко ОП, Ушакова ЯВ, Бабаков АВ. Генотипирование сортов яблони российской селекции с использованием микросателлитных маркеров. Известия ТСХА. 2011;6:162–166.
160. Твардовська МО, Андрєєв Ю, Амосова АВ, Спірідонова КВ, Навроцька ДО, Саматадзе ТЕ Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різних локалітетів прибережної Антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів. Фактори експериментальної еволюції організмів. 2014;14:133–137.
161. Харченко ПН, Глазко ВИ. ДНК–технологии в развитии агробиологии. Москва: Воскресенье; 2006. 473 с.
162. Хлесткина ЕК. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;7(4/2):1044–54.

ДОДАТКИ

Додаток А

Таблиця А

**Список видів покритонасінних рослин, проаналізованих за допомогою
ТВР методу**

№	Вид рослини	Тип маркеру [досліджені діапазони]	Посилання на джерело
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
Покритонасінні, дводольні			
Айстрові (<i>Asteraceae</i>)			
1.	<i>Crepis spp.</i>	I-інтрон (ТВР/сТВР) [330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
2.	<i>Heliānthus L.</i>	I-інтрон (ТВР) [360-1020 п.н.], I-інтрон СЕ-ТВР [370-2000 п.н.],	Gavazzi F. et al. (2012)
3.	<i>Achillea L.</i>	I-інтрон (ТВР) [100-1200 п.н.]	Пірко (2011)
Бобові (<i>Fabaceae</i>)			
4.	<i>Lotus L.</i>	I-інтрон (ТВР), I-інтрон и II-інтрон (сТВР) [205-275 п.н.]	Bardini et al. (2004), Braglia L. et al. (2010)
5.	<i>Trifolium L.</i>	I-інтрон и II-інтрон (сТВР) [300-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
6.	<i>Glycine L.</i>	I-інтрон (ТВР), I-інтрон СЕ-ТВР [305-1110 п.н.]	Gavazzi F. et al. (2012)
7.	<i>Medicāgo L.</i>	I-інтрон (ТВР) [300-2000 п.н.], I-інтрон СЕ-ТВР [650-1000 п.н.]	Gavazzi F. et al. (2012)
8.	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	I-інтрон и II-інтрон (сТВР)[I:300-2000 п.н.,II:200-1500 п.н.]	Breviario D. et al. (2008)
Букові (<i>Fagaceae</i>)			
9.	<i>Quercus L.</i>	I-інтрон (ТВР) [200-2000 п.н.]	Рабокoнь и др.. (2015)

1	2	3	4
Гречані (<i>Polygonaceae</i>)			
10.	<i>Rumex acetosa</i> L.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
Виноградові (<i>Vitaceae</i>)			
11.	<i>Vitis</i> L.	I-інтрон (ТВР) [300-1500 п.н.]	Gavazzi F. et al. (2016)
Капустяні (<i>Brassicaceae</i>)			
12.	<i>Brassica napus</i> L.	I-інтрон [205-275 п.н.], I-інтрон и II-інтрон (сТВР) [I:300-600 п.н., II:500-1000], I-інтрон (ТВР) [300-2000 п.н.], CE-ТВР [360-950 п.н.]	Bardini et al. (2004), Breviario D. (2007), Gavazzi F. et al. (2012)
13.	<i>Camelina</i> Crantz	I-інтрон + II-інтрон (h-ТВР) [600-2000 п.н.], II-інтрон (сТВР) [300-880 п.н.], I-інтрон (ТВР) [300-4000 п.н.]	Galasso I. et al. (2011), Galasso I. et al. (2015), Рабокoнь и др.. (2015)
Льонові (<i>Linaceae</i>)			
14.	<i>Linum usitatissimum</i> L.	I-інтрон (ТВР) [400-3000 п.н.]	Рабокoнь и др.. (2015), Рабокoнь и др.. (2016), Рабокoнь и др.. (2018)
Маренові (<i>Rubiaceae</i>)			
15.	<i>Coffea</i> L.	I-інтрон (ТВР) [587-1000 п.н.]	Bardini et al. (2004)
Подорожникові (<i>Plantaginaceae</i>)			
16.	<i>Veronica persica</i> Poiret.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
17.	<i>Plantago lanceolata</i> L.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)

1	2	3	4
Розоцвіті (<i>Rosaceae</i>)			
18.	<i>Rosa</i> spp.	I-інтрон и II-інтрон (сТВР) [I: 4000-1500 п.н., II: 300-1200 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
Пасифлорові (<i>Passifloraceae</i>)			
19.	<i>Passiflora</i> L.	I-інтрон (ТВР), I-інтрон СЕ-ТВР [380-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2013)
Покритонасінні, однодольні			
Злаки (<i>Poaceae</i>)			
20.	<i>Aegilops</i> L.	I-інтрон (ТВР), I-інтрон + II-інтрон (h-ТВР) [300-4000 п.н.]	Rabokon A. et al. (2017)
21.	<i>Arachis</i> L.	I-інтрон и II-інтрон (сТВР) [I:300-1500 п.н., II: 200-1500 п.н.]	Breviario D. et al. (2007)
22.	<i>Arrhenatherum</i> P. Beauv.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
23.	<i>Bromus</i> <i>hordaceus</i> L.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [300-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
24.	<i>Dactylis</i> <i>glomerata</i> L.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
25.	<i>Deschampsia</i> <i>cespitosa</i> (L.) P. Beauv.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [300-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010), Рабокoнь и др.. (2017)
26.	<i>Eleusine</i> Gaertn.	I-інтрон и II-інтрон (сТВР) [I:300-1500 п.н., II: 200-1500 п.н.], I-інтрон (ТВР) [200-2000 п.н.]	Breviario D. et al. (2007), Рабокoнь и др.. (2015)
27.	<i>Festuca violacea</i> Gaudin.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [300-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
28.	<i>Holcus lanatus</i> L.	I-інтрон(ТВР/сТВР)[330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)

1	2	3	4
29.	<i>Hordeum</i> L.	I-інтрон (ТВР) [300-2000 п.н.], I-інтрон СЕ-ТВР [400-900 п.н.]	Gavazzi F. et al. (2012), Рабоконь А. и др. (2015)
30.	<i>Nardus stricta</i> L.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [300-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
31.	<i>Oryza</i> L.	I-інтрон и II-інтрон (сТВР)	Breviario D. et al. (2008)
32.	<i>Phalaris arundinacea</i> L.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
33.	<i>Phleum pratense</i> L.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [300-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
34.	<i>Poa</i> L.	I-інтрон (ТВР/сТВР) [330-1500 п.н.]	Braglia L. et al. (2010)
35.	<i>Triticum</i> L.	I-інтрон (ТВР) [300-2000 п.н.], I-інтрон СЕ-ТВР [350-840 п.н.], I-інтрон (ТВР) [300-2000 п.н.]	Gavazzi F. et al. (2012), Рабоконь А. и др. (2015)
36.	<i>Zea</i> L.	I-інтрон (ТВР) [300-2000 п.н.], I-інтрон СЕ-ТВР [550-1020 п.н.]	Gavazzi F. et al. (2012)

Додаток Б

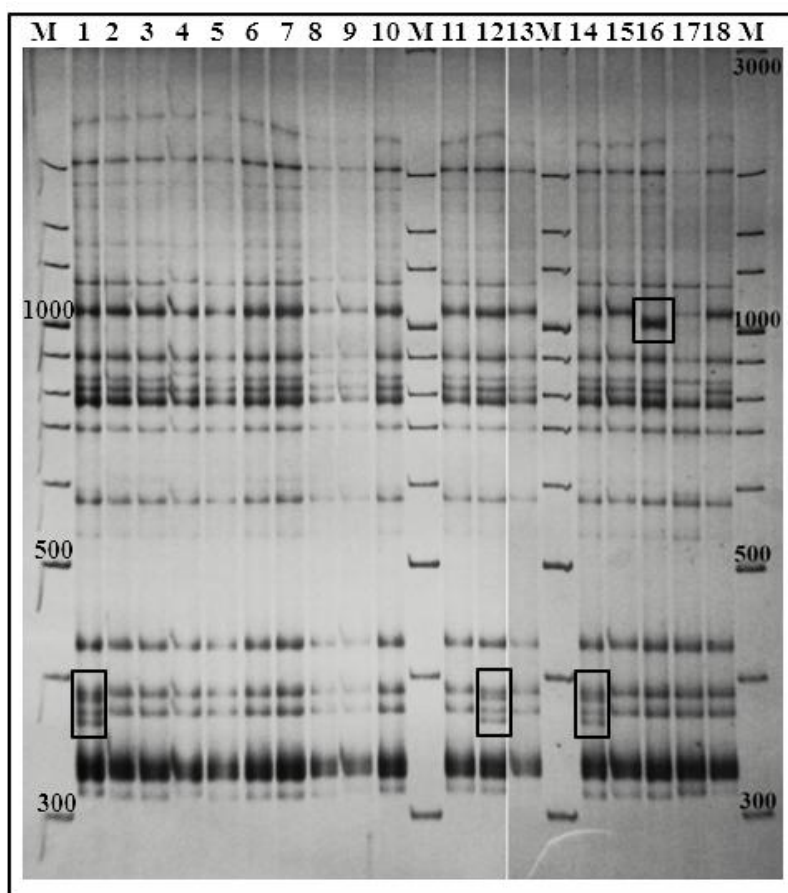


Рисунок. Електрофореграма продуктів ампліфікації ландрас *L. usitatissimum*. прямокутниками відмічені поліморфні **сТВР**-фрагменти; м – маркер; 1–18 (зверху) – номери зразків: *K-594*, *K-790*, *K-5330*, *K-5455*, *K-5451*, *K-6212*, *K-5465*, *K-1453*, *K-780*, *K-4219*, *K-5990*, *K-5991*, *K-5992*, *K-7236*, *K-604*, *K-37*, *K-6601*, *K-5483*.

Додаток В

Список публікацій здобувача

Статті:

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).*

Продовж. дод. В

6. **Рабокoнь АМ**, Демкович АЄ, Пірко ЯВ, Андрєєв Ю, Парнікоза Ю, 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).

Патент на корисну модель:

9. Демкович АЄ, **Рабокoнь АМ**, Пірко ЯВ, Блюм ЯБ, винахідники; заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Прилад для вертикального гель-електрофорезу; Патент України на корисну модель № 102060. 2015 Жовт. 12.

Тези:

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.

Продовж. дод. В

11. **Рабокoнь АН**, Демкович АЕ, Пирко ЯВ, Богданова МВ, Сакович ВИ, Лемеш ВА, Блюм ЯБ. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у ландрас *Linum usitatissimum* L. Материалы III 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, Пирко 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.