

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

ПОСТОВОЙТОВА АНАСТАСІЯ СЕРГІЇВНА



УДК 575.2:577.2

**ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ АКТИНУ
ЯК ЕФЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ ВНУТРІШНЬО- ТА МІЖВИДОВОЇ
ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ РОСЛИН**

03.00.22 – молекулярна генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертація є рукописом

Робота виконана у відділі геноміки та молекулярної біотехнології і у відділі популяційної генетики Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Кунах Віктор Анатолійович,
Інститут молекулярної біології і
генетики НАН України, завідувач
відділу генетики клітинних популяцій

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

Захист відбудеться «23» січня 2020 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» за адресою: 04123, м. Київ-123, вул. Осиповського, 2а, тел./факс: (044) 434-37-77, e-mail: d26.254.01@ukr.net

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

Автореферат розіслано «___» грудня 2019 року.

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



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. ДНК-маркери є незамінним інструментом в сучасній генетиці та селекції рослин. Вони широко використовуються для генотипування та встановлення філогенетичних відстаней тощо (Nadeema et al., 2017), саме тому абсолютно передбачуваним є вдосконалення вже існуючих та пошук нових, більш ефективних ДНК-маркерів. В останні роки запропоновано використання багатьох нових перспективних молекулярних маркерів, що значною мірою обумовлено переходом від довільних ДНК-маркерів (Random DNA markers (RDMs)) до ген-специфічних маркерів (Gene-targeted markers (GTM)) (Andersen and Lübberstedt, 2003; Poczai et al., 2013). На сьогодні доступність геномних баз даних та покращення методик секвенування значно спрощують пошук нових ген-специфічних ДНК-маркерних систем (Poczai et al., 2013).

Одним з багатообіцяючих напрямів у цьому плані є використання поліморфізму довжини інтронів різних генів (Intron Length Polymorphism, ILP) (Wang et al., 2005, He et al., 2015). Відомо, що екзони є висококонсервативними ділянками генів, а більшість мутацій відбувається саме в інтронах. За рахунок цього інтрони, як гіперваріабельні ділянки генів, потенційно можуть бути джерелом генетичного поліморфізму, який можливо оцінити шляхом підбору відповідних праймерів до консервативних ділянок екзонів (Väli, 2008). На сьогодні однією з таких успішних ILP-маркерних систем є оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, так званий метод ТВР (Tubulin Based Polymorphism) – (Bardini et al., 2004, Galasso et al., 2015, Rabokon et al., 2018). ТВР-маркери є універсальною системою, яка дозволяє провести генотипування та генетичну диференціацію різних видів, сортів та генотипів рослин, базуючись на знанні екзон-інтронної структури генів β -тубуліну (Bardini et al., 2004, Rabokon et al., 2018; Pirko, 2011, Gavazzi et al., 2016). Однак існує ряд питань щодо чутливості таких ДНК-маркерів та правильності інтерпретації отриманих даних, що мотивує подальший пошук ефективних ДНК-маркерних систем.

Загалом, крім β -тубуліну, для створення ДНК-маркерних систем потенційно також можуть використовуватися інші гени цитоскелетних білків (Пірко та ін., 2018, Пірко та ін., 2018). Зокрема відомо, що гени актину є висококонсервативними генами зі сталою екзон-інтронною структурою (McDowell et al., 1996), тому ДНК-маркерні системи, які базуються на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів актину, потенційно можуть стати якісним інформативним джерелом для генотипування та диференціювання різних генотипів рослин. Саме розвитком цього підходу і визначається актуальність даного дисертаційного дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертація виконувалась в рамках бюджетних науково-дослідних робіт «Створення молекулярно-генетичних маркерів для диференціації різних генотипів рослин на основі вивчення поліморфізму інтронів генів їх цитоскелетних білків» (2015–2019 рр., номер держреєстрації 0115U005025), «Диференціація різних генотипів та сортів рослин шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів актину» (2018–2019 рр., номер держреєстрації 0118U006867).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було обґрунтувати розробку методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для подальшого його використання у генетичній диференціації та генотипуванні рослин.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Провести біоінформатичний пошук генів актину в геномах вищих рослин та дослідити особливості екзон-інтронної структури генів актину арабідопсису (*Arabidopsis thaliana* L.), рису (*Oryza sativa* L.), льону (*Linum usitatissimum* L.), картоплі (*Solanum tuberosum* L.) і томату (*Solanum lycopersicum* L.).

2. Здійснити дизайн та синтез праймерів для подальшої оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у видів вищих рослин.

3. Провести генотипування та диференціацію різних сортів пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.) та рису (*O. sativa*) за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.

4. Диференціювати представників природних популяцій егілопсу двухдуюмowego (*Aegilops biuncialis* Vis.) шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.

5. Дослідити поліморфізм довжини II-го інтрону генів актину у різних сортів льону-довгунця (*L. usitatissimum*) з використанням ген-специфічних праймерів.

6. Оцінити поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних представників роду *Linum* на міжвидовому та міжсортівному рівнях з використанням універсальних вироджених праймерів і проаналізувати однорідність сортів льону-довгунця (*L. usitatissimum*) української селекції з використанням оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.

7. Порівняти ефективність роботи запропонованого методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину з SSR-маркерами (Simple Sequence Repeats) та ТВР-методом на прикладі аналізу внутрішньосортівного поліморфізму у льону-довгунця (*L. usitatissimum*).

8. Оцінити поліморфізм довжини інтронів генів актину у сортів томату та картоплі.

9. Дослідити можливість використання ДНК-маркерів, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів актину, для ідентифікації міжвидових гібридів ріпаку (*Brassica napus* L.) та дикорослих видів з флори України.

Об'єкт дослідження: нуклеотидні послідовності генів актину в геномах різних видів однодольних та дводольних рослин.

Предмет дослідження: поліморфізм довжини інтронів генів актину.

Методи дослідження. Пошук генів актину в геномах вищих рослин, множинне вирівнювання послідовностей, визначення ступеня ідентичності кодуєчих ділянок генів актину (екзонів) та їх трансльованих амінокислотних послідовностей і дизайн праймерів здійснювали за допомогою біоінформатичних методів. Для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у різних рослин використовувалися молекулярно-генетичні методи: екстракція та очищення тотальної геномної ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофорез продуктів ампліфікації в поліакриламідному гелі. Для аналізу рівня поліморфізму у різних рослинних зразках використовували

статистичний метод (оцінка значення *PIC* (Polymorphism Information Content)).

Наукова новизна отриманих результатів. Запропонована ДНК-маркерна система, що дозволяє виявляти поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних видів рослин. Проаналізовано ефективність оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у однодольних і дводольних рослин на різних таксономічних рівнях, а саме на видовому, популяційному, сортовому та внутрішньосортному. Вперше за допомогою визначення поліморфізму довжини інтронів генів актину проведено генотипування та диференціація сортів таких господарсько-цінних культур як рис, пшениця, ячмінь, льон-довгунець, томат та картопля. Завдяки оцінці поліморфізму довжини інтронів генів актину продемонстрована значна різниця між генотипами природних популяцій егілопсу двухдьюмового (*A. biuncialis*) з Кримського півострову. Оцінений міжсортний та внутрішньосортний поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних сортів льону-довгунця з використанням як ген-специфічних, так і універсальних ДНК-маркерів, що дозволяють виявити поліморфізм довжини інтронів генів актину. Окрім того, на прикладі внутрішньосортного аналізу сортів льону-довгунця доведена висока ефективність оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з використаними ТВР-методом та SSR-маркерами. Вперше із застосуванням цього підходу ідентифіковано міжвидові гібриди ріпаку з дикорослими видами з флори України.

Практичне значення отриманих результатів. Запропонований підхід для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину рослин може бути використаний для генотипування та диференціації різних видів, сортів та популяцій рослин під час популяційно-генетичних та селекційних досліджень. Аналіз сортів рису, пшениці, ячменю, льону, томату та картоплі з використанням оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволяє рекомендувати його для ДНК-профілювання сортів, визначення їх генетичної однорідності та чистоти сортового матеріалу. Окрім того, запропонована ДНК-маркерна система може бути застосована для встановлення гібридної природи рослин та для аналізу відмінностей різних популяцій рослин.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем спільно з науковим керівником обрано ідею та тему дослідження, сформульовано основну мету та завдання роботи, сплановано порядок експериментів, а в подальшому – інтерпретовано отримані результати та опубліковано ряд наукових публікацій. Здобувачем особисто виконані основні експериментальні дослідження, опрацьовані літературні джерела за темою дисертаційної роботи. Окрім того, автором підготовлено експериментальну частину, обґрунтовано основні положення та узагальнення дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень представлені на II-й конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія» (Київ, 2013), III-й Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2014), Міжнародній науковій конференції «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин» (Одеса, 2017), X-му з'їзді УТГіС ім. М.І. Вавилова та XII-й Міжнародній науковій конференції «Фактори

експериментальної еволюції» (Умань, 2017), III-й конференції молодих учених «Біологія рослин і біотехнологія» (Київ, 2017), Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин» (Харків, 2018).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, з них 8 статей в українських та зарубіжних наукових виданнях та 6 тез у збірниках матеріалів всеукраїнських та міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів, результатів експериментальних досліджень, узагальнення результатів, висновків, списку використаної літератури та додатку. Повний обсяг становить 185 сторінок машинописного тексту, включаючи 13 таблиць та 26 рисунків. Список використаної літератури включає 245 джерел.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляд літератури) узагальнені літературні дані стосовно характеристики, класифікації, а також використання найбільш розповсюджених ДНК-маркерів у генетиці рослин. Охарактеризовано особливості застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів різних генів як перспективного напрямку для розроблення молекулярно-генетичних маркерів. Окрему увагу зосереджено на принципі методів оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та їх верифікації. Узагальнено дані щодо особливостей організації генів актину рослин. В ході аналізу літератури доведено перспективність використання генів актину для подальшої розробки ДНК-маркерів, що базуються на оцінці поліморфізму довжини їх інтронів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Біоінформатичний пошук та аналіз генів актину вищих рослин. Повні анотовані послідовності генів актину *A. thaliana* було взято з бази даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), а послідовності білка актину – з бази даних UniProt (www.uniprot.org/). Біоінформатичний пошук потенційних генів актину рису, льону-довгунця, картоплі та томату в базі даних Phytozome v 9.1 (www.phytozome.net) (Goodstein et al., 2012) проведено з використанням онлайн інструменту BLASTN версії 2.2.26+. Як матрицю для пошуку таких генів актину було використано повну анотовану послідовність гену актину *act1* *A. thaliana*.

Для множинного вирівнювання кодуючих ділянок (екзонів) генів актину, а також їх поліпептидних продуктів використано програму Clustal X 2.0 (Larkin et al., 2007). Ступінь ідентичності кодуючих ділянок генів актину та їх трансльованих амінокислотних послідовностей визначали за допомогою програми UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Візуалізацію екзон-інтронної структури генів проводили за допомогою програми Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>). Підбір вироджених та специфічних праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину здійснювали

за допомогою програми FastPCR (Kalendar et al., 2017) та онлайн-інструменту Oligo Analyzer V. 3.1. 1. (www.idtdna.com/calc/Analyzer/).

Як рослинний матеріал використовували представників однодольних та дводольних рослин з родин *Poaceae*, *Linaceae*, *Solanaceae* та *Brassicaceae*. Був оцінений поліморфізм довжини інтронів генів актину кримських популяцій егілопсу двохдюймового (люб'язно надані Н.О. Козуб та І.О. Созіновим); сортів рису посівного, пшениці м'якої та ячменю; різних видів льону – льон вузьколистий (*Linum angustifolium* Huds.), льон дворічний (*Linum bienne* Mill.); різних сортів льону-довгунця зарубіжної і української селекції, а також білоруських ландрас (люб'язно надані В.О. Лемеш); сортів томату та картоплі; міжвидових гібридів ріпаку олійного з деякими дикорослими видами родини *Brassicaceae*: рогачка мілова (*Erucastrum cretaceum* Kotov.), дворятник тонколистий (*Diplotaxis tenuifolia* L.) та гірчиця сиза (*Brassica juncea* L.), а також їх батьківських форм.

Тотальну ДНК з рослинних зразків виділяли за допомогою ЦТАБ-методу (Doyle and Doyle, 1987; Rogers and Bendich, 1985) з певними методичними доповненнями. Як вихідний матеріал використовували проростки, насіння або листки досліджуваних зразків рослин. Концентрацію та чистоту отриманого генетичного матеріалу перевіряли спектрофотометрично за допомогою біофотометру «Eppendorf» (США), а також з використанням електрофорезу в 6%-ному агарозному гелі. Зразки ДНК зберігали при – 20°C.

ПЛР аналіз проводили, використовуючи чотири пари праймерів. Було синтезовано три пари специфічних праймерів до окремих генів льону-довгунця, що дозволяють оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону генів Lus10016259, Lus10040826 і Lus10016259 та Lus10040826 одночасно. Для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у різних видів вищих рослин було синтезовано універсальні виродженні праймери ActIn (табл. 1).

Таблиця 1

Праймери для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину за допомогою ПЛР

Назва праймеру	Послідовність 5'--> 3'	Кількість нуклеотидів (п. н.)	Температура відпалу (°C)
ActIn (вироджені, універсальні)	F:TGG CAT CAY ACN TTY TAC AAY GA	23	59
	R:CCM CCA CTT DAG VAC RAT GTT	20	59
Lus10016259	F:GGA TGA CAT GGA GAA AAT CTG GCAT	25	63
	R:GAG TTG TAA GTG GTT TCG TGG AT	23	63
Lus10040826	F:GGA CGA TAT GGA GAA AAT TTG GCAT	25	64
	R: GAG TTG TAG GTA GTT TCG TGG AT	23	64
Lus (Lus10016259 та Lus10040826)	F:GGA TGA CAT GGA GAA AAT CTG GCAT	25	63
	R: GAG TTG TAC GTG GTC TCG TGG AT	23	63

Для дослідження внутрішньосортової гетерогенності сортів льону-довгунця української селекції були використані два SSR-маркери LU 7 та LU 21 (Pali et al., 2014):

LU 7-F: 5'-CAT CCA ACA AAG GGT GGT G-3';

LU 7-R: 5'-GGA ACA AAG GGT AGC CAT GA-3';

LU 21- F: 5'-AAG GGT GGT GGT GGG AAC-3';

LU 21- R: 5'-GTT GGG GTG AAG AGG AAC AA-3'.

Ампліфікацію інтронів генів актину та мікросателітних повторів проводили на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Кожна реакційна суміш об'ємом 10 мкл містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 ммоль $MgCl_2$, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 ммоль кожного дНТФ (дАТФ, дТТФ, дГТФ та дЦТФ), 0,5 од. Таq полімерази («Fermentas», Литва).

Для виявлення поліморфізму довжини II-го інтрону генів актину використовували наступний протокол ампліфікації: початкова денатурація (95 °C) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 95 °C – 45 с, відпал праймерів (для ActIn – 59 °C, Lus та Lus10016259 – 63 °C та Lus10040826 – 64 °C) – 45 с, елонгація 72 °C – 1 хв), фінальна елонгація 72 °C – 7 хв, 10 °C – утримання.

Для SSR-аналізу ампліфікацію проводили з використанням наступного протоколу: початкова денатурація (95 °C) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 95 °C – 1 хв, відпал праймерів 58 °C – 1хв, елонгація 72 °C – 1 хв), фінальна елонгація 72 °C – 7 хв, 10 °C – утримання (Pali et al., 2014). З метою виключення можливості утворення продуктів неспецифічної ампліфікації кожену ПЛР здійснювали щонайменше в триразовій повторності.

Розділення продуктів ПЛР проводили за допомогою вертикального електрофорезу в 6 %-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі (ПААГ) в однократному ТВЕ-буфері (Sambrook and David, 2001). Фрагменти, що містили інтрони генів актину, розділені в ПААГ, візуалізували шляхом фарбування нітратом срібла (Venbouza et al., 2006). Для визначення довжини інтронів генів актину та мікросателітів використовували набори маркерів молекулярної маси з кроком 100 п. н. (O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва) та з кроком 50 п. н. (O'GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва). Пофарбовані гелі фотографували у видимому світлі з використанням цифрової фотокамери Olympus XZ-1. Зображення аналізували за допомогою програми GelAnalyzer (www.gelanalyzer.com/).

Статистичний аналіз даних проводили шляхом визначення індексу поліморфного інформаційного змісту – *PIC* (Polymorphism Information Content) за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

де p_i – частота i -го алельного фенотипу у вибірці, n – загальна кількість різних алельних фенотипів у вибірці.

В зв'язку зі складністю визначення частот алелів в конкретних локусах при обрахунку даних, отриманих в результаті оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, при розрахунку *PIC* замість частот алелів, використовували показник частоти алельних фенотипів (унікальний розподіл та кількість фрагментів в ДНК-профілі) (Kondratyuk et al., 2005).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Біоінформатичний пошук та аналіз структури генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*. Попередньо з бази даних GeneBank було взято 8 анотованих послідовностей генів актину *A. thaliana*, а саме: *act 1*, *act 2*, *act 3*, *act 4*, *act 7*, *act 8*, *act 11* та *act 12*. В результаті пошуку в базі даних Phytozome v 9.1 в геномі *O. sativa* було відібрано та проаналізовано 9 нуклеотидних послідовностей, визначених як гени актину: LOC_Os03g61970, LOC_Os03g50885, LOC_Os11g06390, LOC_Os01g73310, LOC_Os05g36290, LOC_Os05g01600, LOC_Os10g36650, LOC_Os12g06660, LOC_Os01g64630 (рис. 1А). В геномі *L. usitatissimum* виявлено 15 генів актину: Lus10005163, Lus10006783, Lus10006784, Lus10005819, Lus10005820, Lus10029286, Lus10004169, Lus10021057, Lus10016259, Lus10016558, Lus10005457, Lus10001694, Lus10040826, Lus10004956, Lus10001693 (рис. 1Б).

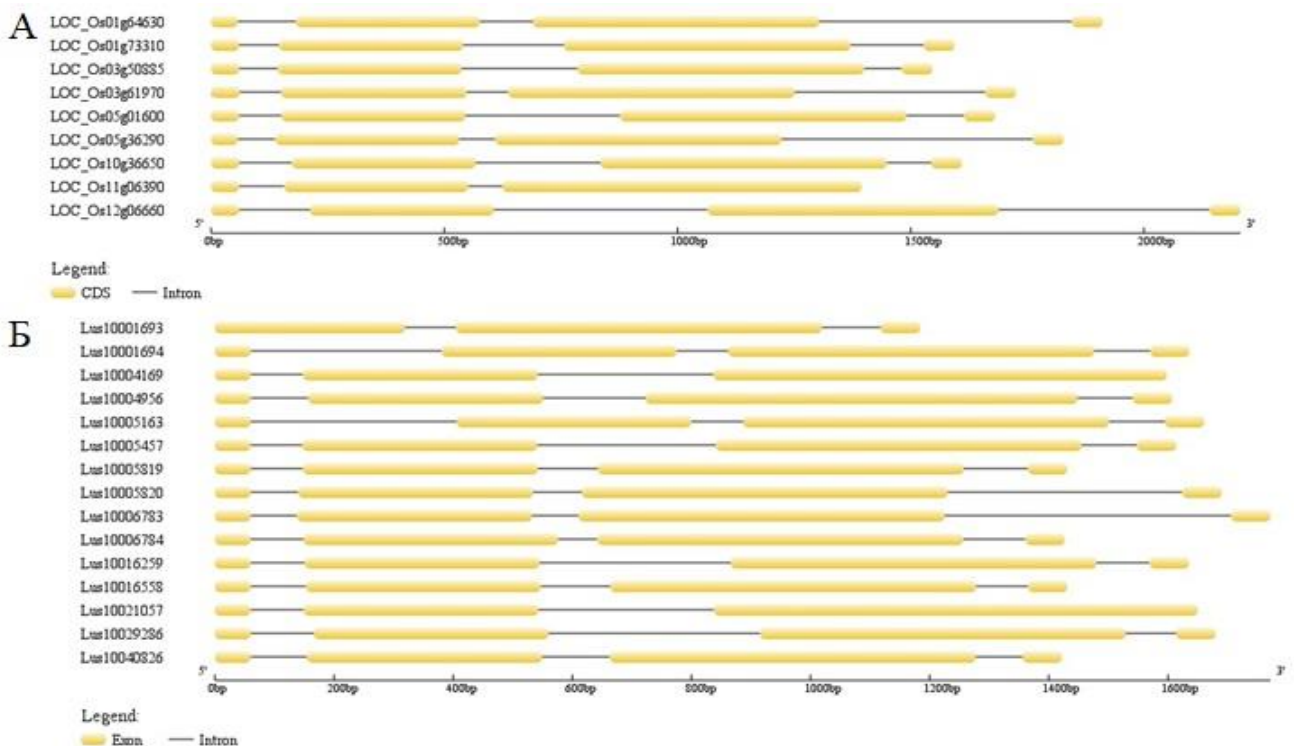


Рис. 1. Екзон-інтронна структура генів актину *O. sativa* (А) та *L. usitatissimum* (Б)

В геномі *S. tuberosum* було відібрано 11 послідовностей генів актину: PGSC0003DMG400003985, PGSC0003DMG400000439, PGSC0003DMG40001849, PGSC0003DMG400027746, PGSC0003DMG400023708, PGSC0003DMG4000192, PGSC0003DMG400008912, PGSC0003DMG400036865, PGSC0003DMG400029121, PGSC0003DMG400008619, PGSC0003DMG400008618.

В геномі *S. lycopersicum* було виявлено 11 генів, що кодують актин: Solyc00g017210, Solyc01g104770, Solyc03g078400, Solyc04g011500, Solyc04g071260, Solyc05g054480, Solyc06g076090, Solyc10g080500, Solyc10g086460, Solyc11g005330, Solyc11g065990.

Окрім повних генних послідовностей актину з бази даних Phytozome v 9.1 в наступних етапах дослідження були використані дані про нуклеотидні послідовності кодуючих ділянок генів та амінокислотні послідовності актину.

В результаті аналізу екзон-інтронної структури генів актину встановлено, що в переважній більшості випадків вони мають 4 екзони та 3 інтрони. Однак, як виключення, гени актину рису LOC_Os03g50885, LOC_Os11g06390 та ген актину картоплі PGSC0003DMG400029121 мають по 3 екзони та 2 інтрони; а ген актину томату Solyc00g017210 – 5 екзонів та 4 інтрони тощо. Довжини екзонів генів актину складали від 57 до 1077 п. н., а інтронів – 68-860 п. н. Спостерігається сталість в кількісному складі екзонів, які переважно мають однакову довжину: 60 п. н. (I-й екзон), 394 п. н. (II-й екзон), 614 п. н. (III-й екзон) та 66 п. н. (IV-й екзон). Жодної сталості в будові інтронів не виявлено, оскільки некодуючі ділянки генів актину мають різну кількість нуклеотидів, яка варіює в широких межах.

Наступним етапом дослідження було порівняння ступеня ідентичності екзонів генів актину та амінокислотних послідовностей, що з них транслюються. Встановлено, що ступінь ідентичності кодуючих ділянок генів та амінокислотних послідовностей, що транслюються з них, складає в середньому 77% та 92 % відповідно. Це є свідченням того, що саме екзони є найбільш консервативними ділянками генів актину. Отримані результати підтверджують доцільність використання генів актину у подальшій розробці ДНК-маркерної системи для оцінки поліморфізму довжини інтронів.

Дизайн праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у вищих рослин. Створення ген-специфічної ДНК-маркерної системи для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину передбачає підбір та синтез праймерів для проведення ПЛР. Такі праймери відпалюються на консервативних ділянках екзонів та дають можливість ампліфікувати інтрони актину та частини фрагментів сусідніх екзонів. В даному випадку джерелом поліморфізму є саме інтронна ділянка гена актину.

Було підібрано три пари ген-специфічних праймерів до консервативних ділянок екзонів генів актину *L. usitatissimum* (Lus10016259, Lus10040826, Lus10021057 та Lus10029286) таким чином, щоб у подальшому отримати багатократну ампліфікацію II-го інтрону (табл. 1). Окрім того, були побудовані та синтезовані універсальні вироджені праймери ActIn, які дозволяють комплексно оцінювати поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних видів рослин одночасно (табл. 1). Попередньо було проведено множинне вирівнювання кодуючих ділянок всіх відібраних генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. Прямий (форвардний) праймер ActIn-F відпалювався на ділянках II-го екзону генів актину (рис. 2). Зворотній (реверсний) праймер ActIn-R відпалювався в ділянках III-го екзону генів актину (рис. 3).

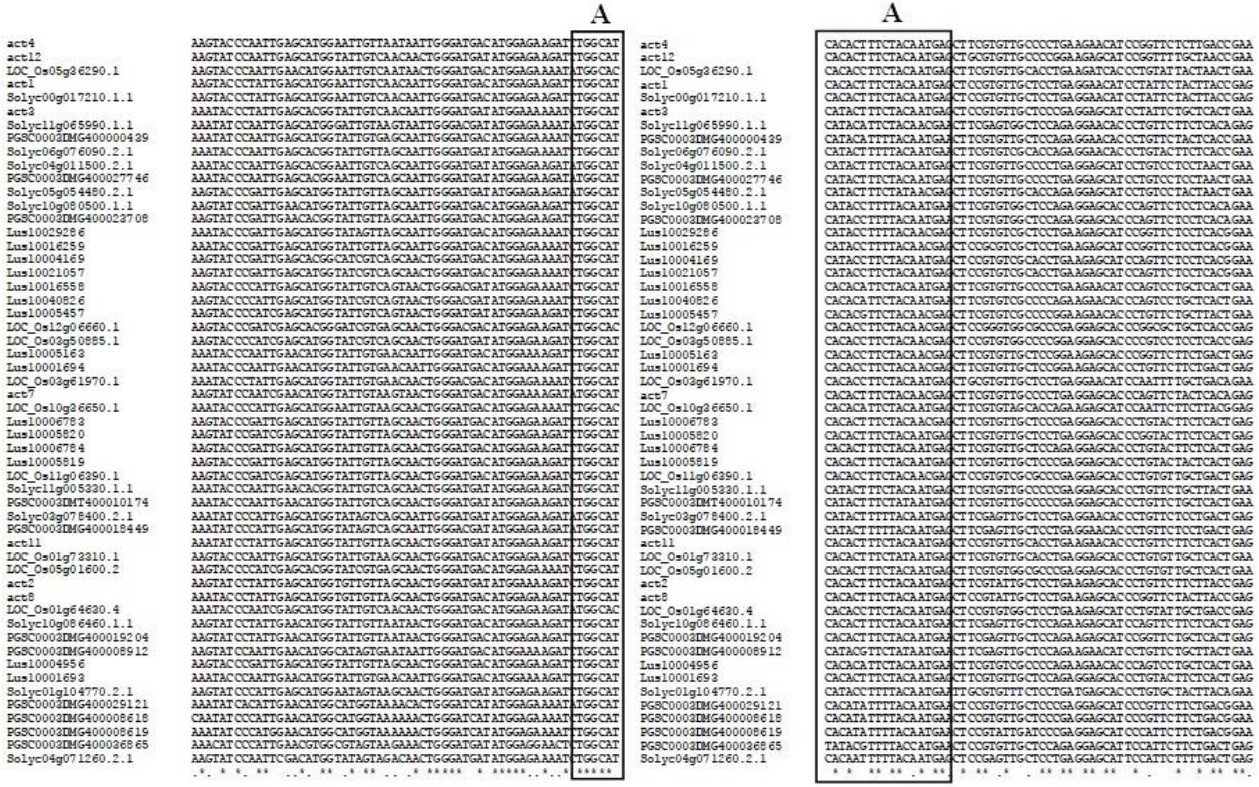


Рис. 2. Фрагменти множинного вирівнювання екзонних ділянок генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. А – ділянки відпапу прямого праймеру (ActIn-F)

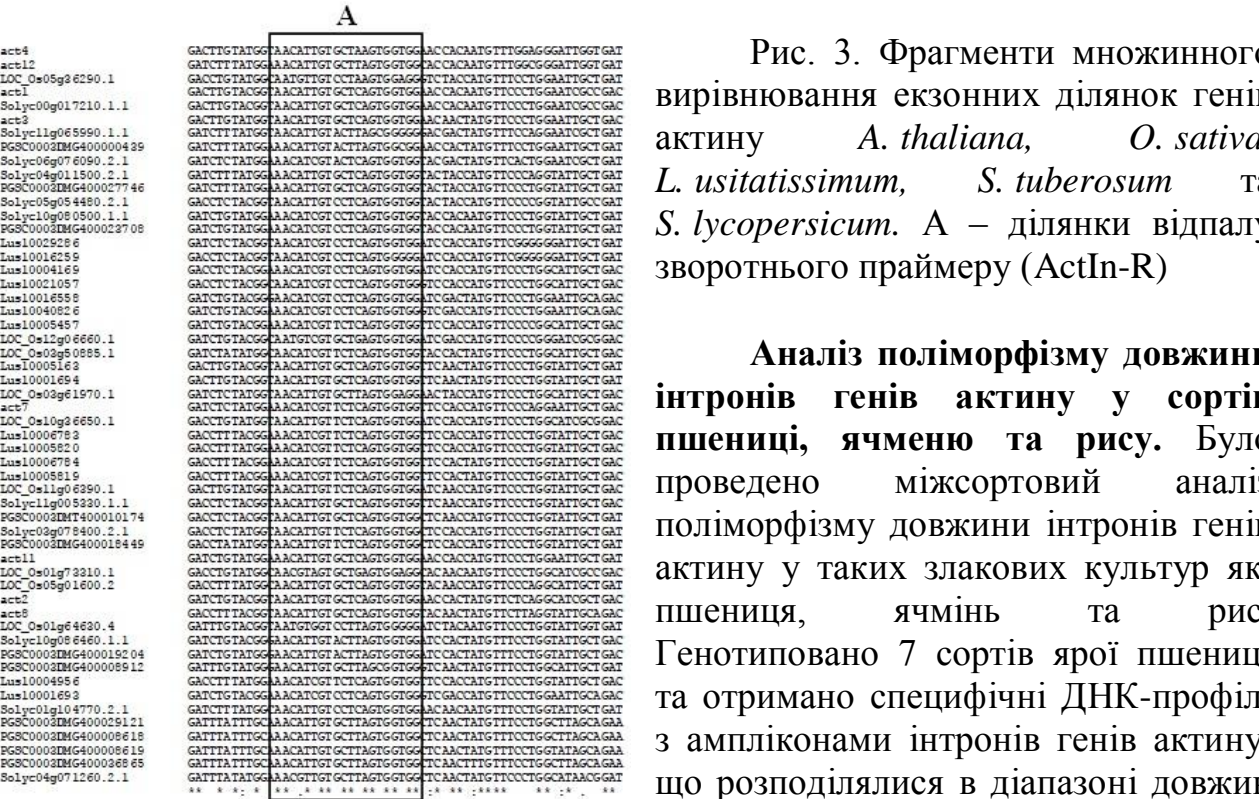


Рис. 3. Фрагменти множинного вирівнювання екзонних ділянок генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. А – ділянки відпапу зворотного праймеру (ActIn-R)

Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів пшениці, ячменю та рису. Було проведено міжсортівий аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у таких злакових культур як: пшениця, ячмінь та рис. Генотиповано 7 сортів ярої пшениці та отримано специфічні ДНК-профілі з ампліконами інтронів генів актину, що розподілялися в діапазоні довжин від 600 п. н. до 1500 п. н. (рис. 4).

Виявлено, що більшість утворених фрагментів інтронів генів актину пшениці є мноморфними, однак при цьому зафіксована поява трьох зон ампліконів, де встановлено поліморфізм (на рис. 4 зони виділені прямокутниками). Для даних сортів пшениці характерним є утворення чотирьох різних алевних фенотипів, а у сортів пшениці ‘X 12’ та ‘Selkirk’

виявлені унікальні алельні фенотипи. Значення *PIC* для сортів пшениці склало 0,69, що свідчить про досить високий рівень поліморфізму в проаналізованій вибірці.

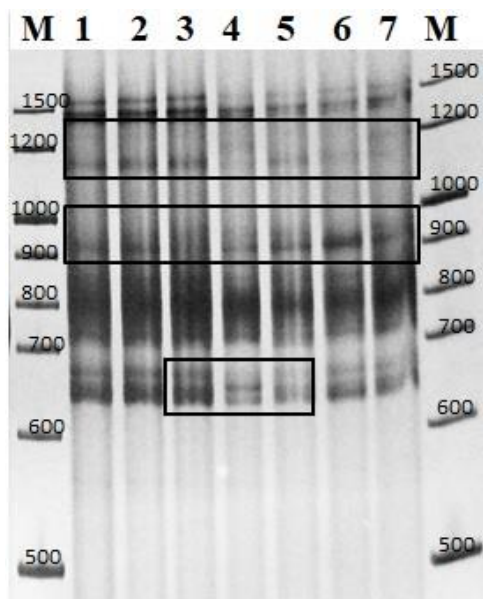


Рис. 4. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів пшениці: 1 – ‘Черемшина’, 2 – ‘Елегія’, 3 – ‘Етюд’, 4 – ‘Х 12’, 5 – ‘Retown’, 6 – ‘Недра’, 7 – ‘Selkirk’ (Канада). М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

Проведено оцінку поліморфізму довжини інтронів генів актину 29 сортів ячменю. Отримані результати свідчать про стабільне утворення ДНК-профілів зі специфічними фрагментами інтронів генів актину в діапазоні від 700 п. н. до 1000 п. н.

(рис. 5). Фрагменти довжиною 769 п. н. та 884 п. н. є мономорфними. Виявлено поліморфізм довжини інтронів генів актину лише в межах верхньої смуги, яка містила фрагменти 938 п. н. та 908 п. н. Для проаналізованої сортової вибірки ячменю характерна поява двох різних алельних фенотипів, а *PIC* дорівнює 0,43, що свідчить про середній рівень поліморфізму у проаналізованій вибірці сортів ячменю.

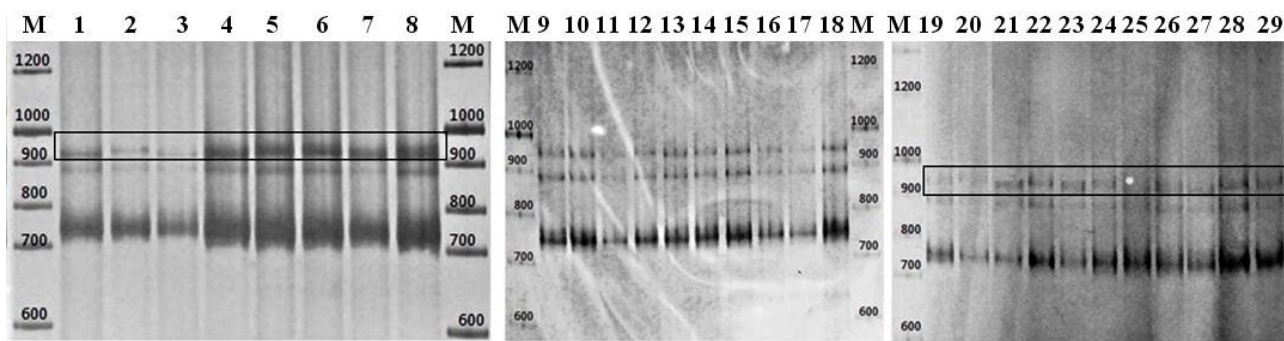


Рис. 5. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у сортів ячменю: 1 – ‘Паллідум 32’, 2 – ‘Медікум 46’, 3 – ‘Одеський 9’, 4 – ‘Одеський 14’, 5 – ‘Одеський 18’, 6 – ‘Южний’, 7 – ‘Степовий’, 8 – ‘Нутанс 106’, 9 – ‘Південний’, 10 – ‘Гетьман’, 11 – ‘Оболонь’, 12 – ‘Чудовий’, 13 – ‘Чарівний’, 14 – ‘Чорноморець’, 15 – ‘Нутанс 244’, 16 – ‘Славутич’, 17 – ‘Одеський 70’, 18 – ‘Нутанс 518’, 19 – ‘Незалежний’, 20 – ‘Едем’, 21 – ‘Престиж’, 22 – ‘Одеський 131’, 23 – ‘Итиль’, 24 – ‘Одеський 82’, 25 – ‘Одеський 69’, 26 – ‘Одеський 36’, 27 – ‘Романтик’, 28 – ‘Тайфун’, 29 – ‘Одеський 115’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

Здійснено аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину 6 сортів рису посівного та його підвиду *O. sativa* spp. *japonica* (рис. 6). Продемонстровано утворення видоспецифічних ДНК-профілів з ампліконами

інтронів генів актину рису. У всіх сортових зразках рису утворювалося по 6 чітких відтворюваних фрагментів інтронів генів актину, розміри яких склали 560 п. н., 708 п. н., 770 п. н., 840 п. н., 963 п. н. та 1191 п. н. Серед досліджуваних сортів рису не виявлено жодних поліморфних фрагментів інтронів генів актину, що свідчить про їх генетичну гомогенність за цим типом ДНК-маркерів.

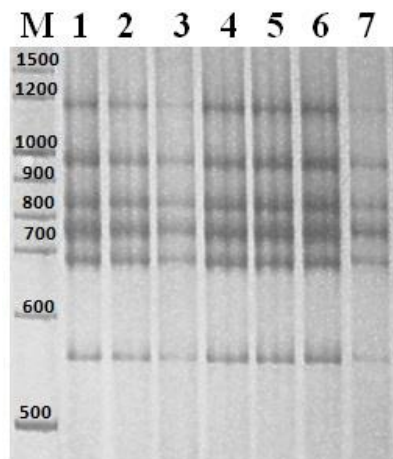


Рис. 6. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів рису посівного: 1 – *O. sativa* spp. *japonica*; 2 – ‘YIP-4970’, 3 – ‘YIP-4558’, 4 – ‘Лазурит’, 5 – ‘Віконт’, 6 – ‘Преміум’, 7 – ‘Консул’. М – маркер молекулярної маси

Загалом ДНК-маркерна система для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволила генотипувати сорти рису, пшениці та ячменю і в подальшому може бути використана для проведення генотипування інших злаків.

Диференціація природних популяцій *Aegilops biuncialis* за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Проведено аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників природних популяцій егілопсу (*Ae. biuncialis*), який є важливим джерелом корисних ознак для покращення сучасних сортів пшениці. ДНК-профілі 14 популяцій егілопсу містили цільові фрагменти інтронів генів актину, які розподілялися в діапазоні від 600 до 2000 п. н. (рис. 7).

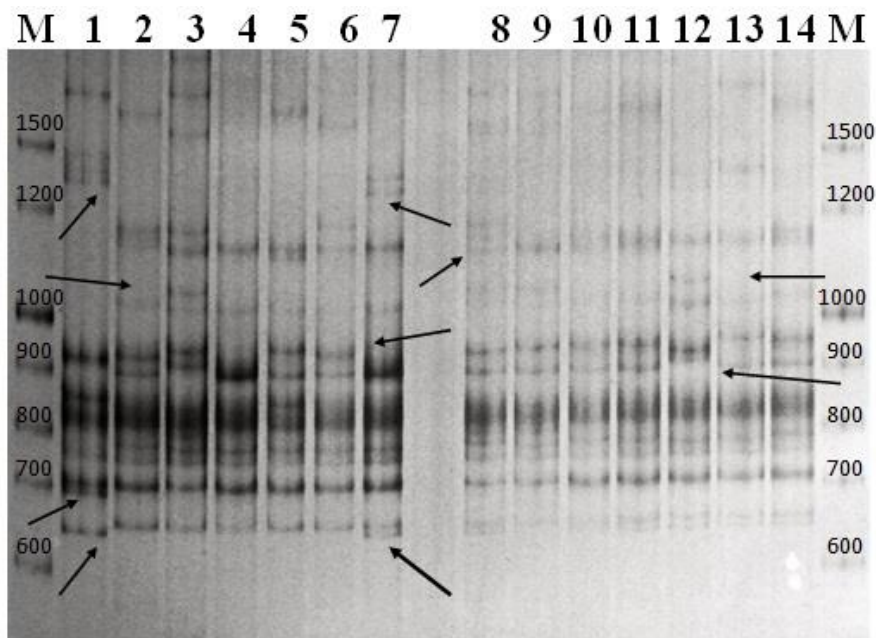


Рис. 7. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину природних популяцій *Ae. biuncialis* з півострову Крим (Україна): 1 – NK 02, 2 – NK 010, 3 – NK B1-1, 4 – NK 11-2, 5 – NK MM7-3, 6 – NK MMB-1, 7 – NK 13-1, 8 – NK 6-2, 9 – NK 4N2, 10 – NK 1-I, 11 – NK OZ-2, 12 – NK 10-3, 13 – NK MM2-1, 14 – NK 14-12. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

В кожному проаналізованому зразку *Ae. biuncialis* спостерігалось утворення від 10 до 14 фрагментів інтронів генів актину. Виявлено 4 мономорфні амплікони, які свідчать про приналежність зразків до одного виду. Загалом, виявлено 14 унікальних алельних фенотипів, а розраховане значення *PIC* становить 0,97, що характеризує дану популяційну вибірку *Ae. biuncialis* як високогетерогенну. Таким чином, підхід, який базується на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів актину, дозволяє якісно генотипувати та диференціювати *Ae. biuncialis* на міжпопуляційному рівні.

Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів льону-довгунця з використанням ген-специфічних праймерів. На електрофореграмі (рис. 8) представлені результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину льону Lus10021057 та Lus10029286 у 10 сортів льону-довгунця зарубіжної та вітчизняної селекції, проведеного з використанням ген-специфічних ПЛР-праймерів Lus-F та Lus-R (табл. 1).

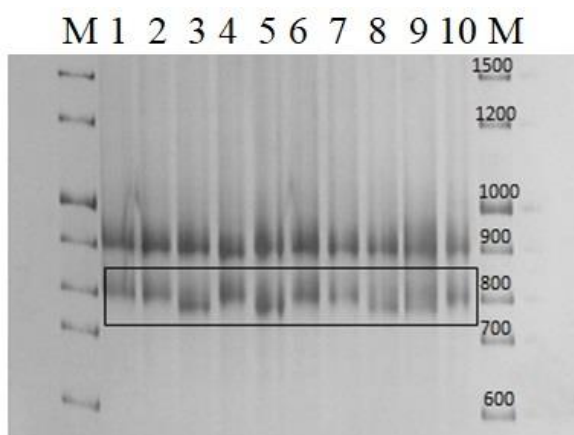


Рис. 8. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину Lus10021057 та Lus10029286 у сортів льону-довгунця: 1 – ‘Глазур’, 2 – ‘Зенга’, 3 – ‘Ескаліна’, 4 – ‘Електра’, 5 – ‘Антей’, 6 – ‘Світанок’, 7 – ‘Светоч’, 8 – ‘Л-1120’, 9 – ‘Хейя 13’, 10 – ‘Хейя 15’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутником виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

В результаті проведеного аналізу продемонстровано утворення двох смуг ампліконів інтронів генів актину. Верхня смуга ампліконів інтронів генів актину містить фрагменти однакової довжини 913 п. н., які, ймовірно, відповідають II-му інтрону гену Lus10029286 льону-довгунця, однак поліморфізму довжини інтронів для даного гена не було виявлено. В межах нижньої поліморфної смуги фрагментів інтронів актину льону містяться амплікони інтронів гена актину Lus10021057, довжини яких складають 820 п. н. та 780 п. н. Значення *PIC* склало 0,48.

На наступному етапі проведено оцінку поліморфізму довжини інтронів генів актину 16 сортів льону-довгунця української селекції з використанням трьох пар ген-специфічних праймерів до генів актину Lus10021057 та Lus10029286 (рис. 9А), Lus10040826 (рис. 9Б), Lus10016259 (рис. 9В). Для сортів льону, проаналізованих з використанням ген-специфічних праймерів до генів Lus10021057 та Lus10029286, середнє значення *PIC* дорівнювало 0,32, Lus10040826 – 0, Lus10016259 – 0,22. Загалом, показана стабільна ампліфікація II-го інтрону генів актину Lus10021057, Lus10029286, Lus10040826, Lus10016259. Встановлено поліморфізм довжини інтронів у генів актину льону-довгунця Lus10021057, Lus10029286 та Lus10016259.

Результати аналізу зразків льону-довгунця різної селекції з використанням ген-специфічних ПЛР праймерів засвідчили придатність методу оцінки

поліморфізму довжини інтронів генів актину для диференціації різних генотипів льону.

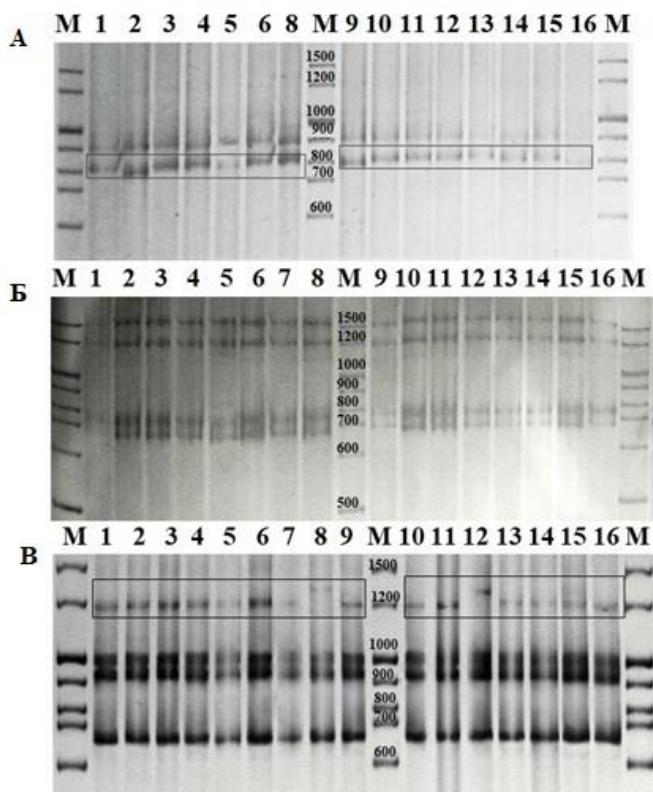


Рис. 9. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів льону-довгунця, отриманих за допомогою праймерів до генів актину Lus10021057 та Lus10029286 (А), Lus10040826 (Б) та Lus10016259 (В): 1 – ‘Есмань’, 2 – ‘Чарівний’, 3 – ‘Зоря 87’, 4 – ‘Сіверський’, 5 – ‘Каменярь’, 6 – ‘Журавка’, 7 – ‘Глухівський ювілейний’, 8 – ‘Іванівський’, 9 – ‘Вручий’, 10 – ‘Глазур’, 11 – ‘Міандр’, 12 – ‘Рушничок’, 13 – ‘Гладіатор’, 14 – ‘Надія’, 15 – ‘Глобус’, 16 – ‘Глінум’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину з

використанням вироджених праймерів у видів льону та сортів льону-довгунця української селекції та білоруських ландрас. Результати аналізу 28 сортів льону-довгунця української селекції та білоруських ландрас, а також двох видів льону – льону дворічного (*L. bienne*) та льону вузьколистого (*L. angustifolium*) – з використанням універсальних вироджених праймерів свідчать про утворення видоспецифічних ДНК-профілів, що містили мінімум 10 ампліконів інтронів генів актину, довжини яких варіювали в межах від 700 п. н. до 1200 п. н. (рис. 10, 11).

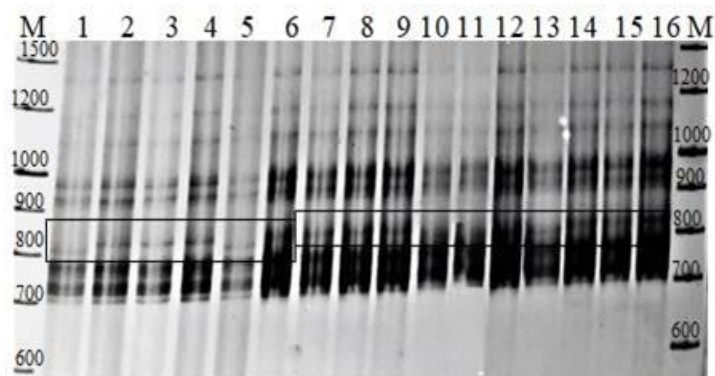


Рис. 10. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів льону-довгунця української селекції: 1 – ‘Надія’, 2 – ‘Гладіатор’, 3 – ‘Вручий’, 4 – ‘Сіверський’, 5 – ‘Міандр’, 6 – ‘Чарівний’, 7 – ‘Глазур’, 8 – ‘Журавка’, 9 – ‘Глухівський ювілейний’, 10 – ‘Глобус’, 11 –

‘Каменярь’, 12 – ‘Есмань’, 13 – ‘Іванівський’, 14 – ‘Зоря 87’, 15 – ‘Глінум’, 16 – ‘Рушничок’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

Загалом, проаналізовані зразки льону-довгунця характеризувались наявністю поліморфних фрагментів інтронів в діапазоні довжин від 800 п. н. до 900 п. н., що дало можливість диференціювати їх між собою. У зразку ландраси

льону-довгунця 'К-604' (рис. 11, зразок 8) виявлений унікальний амплікон довжиною 1127 п. н. Для білоруських ландрас льону-довгунця характерна поява трьох різних унікальних алельних фенотипів ($PIC=0,57$), а у сортів льону-довгунця української селекції виявили два алельні фенотипи ($PIC=0,43$).

Також за допомогою запропонованого методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину проведено генотипування різних видів льону, зокрема льону дворічного (*L. bienne*) та льону вузьколистого (*L. angustifolium*) (рис. 11, зразки 13, 14). Зважаючи на характерні особливості розподілу ампліконів інтронів актину не вдалося встановити відмінності між ДНК-профілями *L. bienne* та *L. angustifolium*, а також продемонстрована їх ідентичність з ДНК-профілем льону-довгунця. Загалом, отримані дані підтверджують високу генетичну спорідненість представників роду *Linum*. Зокрема, опубліковані раніше результати молекулярно-генетичних досліджень свідчать про те, що *L. bienne* є спорідненим видом з *L. usitatisimum* (Vromans, 2006), так само як продемонстрована і висока спорідненість саме *L. bienne* та *L. angustifolium* (Tutin et al., 1968, Zohary and Hopf, 1993).

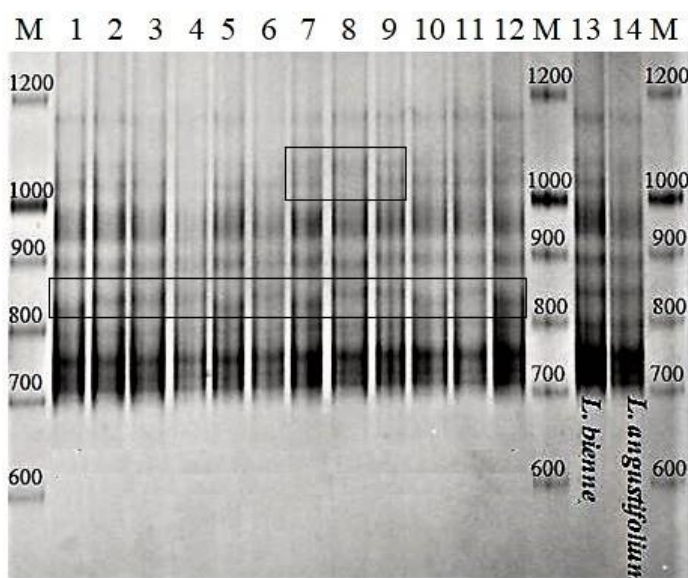


Рис. 11. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину видів льону та білоруських ландрас льону-довгунця: 1 – 'К-790', 2 – 'К-5330', 3 – 'К-5455', 4 – 'К-5451', 5 – 'К-5460', 6 – 'К-5992', 7 – 'К-603', 8 – 'К-604', 9 – 'К-5990', 10 – 'К-6601', 11 – 'К-37', 12 – 'К-7236', 13 – *L. bienne*; 14 – *L. Angustifolium*. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

Внутрішньосортова оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину льону-довгунця української селекції. На наступному етапі роботи було проаналізовано однорідність сортів льону-довгунця української селекції за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Зі сукупності насінневого матеріалу кожного з досліджуваних сортів льону-довгунця (всього 16) випадковим чином було обрано по 5-6 зразків, які надалі аналізували з використанням універсальних праймерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину, а також двох пар праймерів, які є специфічними до інтронів окремих генів актину льону-довгунця Lus10016259 та Lus10040826 (табл. 2).

При використанні специфічних праймерів до гена Lus10016259 у 9-ти сортів льону-довгунця було виявлено поліморфізм довжини інтронів, в той час як при використанні праймерів до гена Lus10040826 лише в одному сорті льону ('Зоря 87') візуалізувалися поліморфні амплікони інтронів актину. Переважна більшість сортів льону-довгунця (12 із 16 сортів) охарактеризовані як генетично неоднорідні за універсальними праймерами для виявлення поліморфізму

довжини інтронів генів актину. Одночасно встановлено, що більш інформативними були саме універсальні праймери для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні зі специфічними праймерами до генів Lus10016259 та Lus10040826 льону. Таким чином, новорозроблені ДНК-маркери для виявлення поліморфізму довжини інтронів можна розглядати як новий підхід для оцінки внутрішньосортового поліморфізму сортів льону-довгунця.

Оцінка ефективності ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з SSR-маркерами та TBP-методом. З цією метою було проведено мікросателітний аналіз внутрішньосортових вибірок 16 сортів льону-довгунця української селекції за двома SSR-локусами (LU 7 та LU 21) та порівняні з отриманими раніше результатами внутрішньосортового TBP-аналізу тих же самих зразків льону-довгунця (Rabokon et al., 2018) (табл. 3). Раніше в результаті оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину було показано неоднорідність більшості сортів льону-довгунця (12 із 16 сортів). Продемонстровано генетичну гетерогенність більшості досліджуваних сортів за обома мікросателітними локусами (12 із 16 сортів), а за допомогою TBP-методу було охарактеризовано 10 сортів льону-довгунця як генетично неоднорідні (табл. 3).

Порівнюючи отримані результати з використанням трьох різних ДНК-маркерних систем (оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, SSR-маркерів та TBP-методу), можна зазначити, що запропонована нами система для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину характеризується аналогічною ефективністю порівняно з мікросателітними маркерами та вищою ефективністю в порівнянні з TBP-маркерами.

Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників родини *Solanaceae*. На Рис. 12 продемонстровані результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину у 4-х сортів картоплі. ДНК-профілі сортів картоплі містили не менше 15 фрагментів інтронів генів актину, довжини яких розподілялися в діапазоні від 780 п. н. до 2000 п. н. Сорти картоплі виявилися генетично гетерогеними, оскільки містили поліморфні фрагменти інтронів генів актину (рис. 12 позначені стрілками). Встановлено 3 різні алельні фенотипи. Значення *PIC* (0,625) вказує на досить високий рівень поліморфізму в даній сортовій вибірці.

На наступному етапі роботи був проведений аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у 12-ти сортів томату (рис. 13). Кожний із досліджених зразків ДНК містив не менше 7 ампліконів інтронів генів актину в діапазоні від 700 п. н. до 1500 п. н., а 11 із 12 проаналізованих сортів томату виявилися генетично мономорфними. У сорту 'Американський Синій' був виявлений амплікон довжиною 1351 п. н. (рис. 13, зразок 10) та показана відсутність фрагменту гена актину довжиною 1486 п. н., що і вирізняє цей сорт з поміж інших.

Таблиця 2

Аналіз сортів льону-довгунця за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину

Назва сорту	Lus10016259			Lus10040826			ActIn		
	Поліморфізм (+/-)	Алельний фенотип (к-ть)	<i>PIC</i>	Поліморфізм (+/-)	Алельний фенотип (к-ть)	<i>PIC</i>	Поліморфізм (+/-)	Алельний фенотип (к-ть)	<i>PIC</i>
‘Есмань’	-	1	0,0	-	1	0,0	-	1	0,0
‘Сіверський’	-	1	0,0	-	1	0,0	-	1	0,0
‘Глухівський ювілейний’	+	2	0,28	-	1	0,0	+	2	0,48
‘Глобус’	-	1	0,0	-	1	0,0	+	2	0,48
‘Глазур’	-	1	0,0	-	1	0,0	-	1	0,0
‘Гладіатор’	-	1	0,0	-	1	0,0	+	4	0,72
‘Чарівний’	-	1	0,0	-	1	0,0	-	1	0,0
‘Глінум’	-	1	0,0	-	1	0,0	+	2	0,32
‘Зоря 87’	+	3	0,61	+	2	0,28	+	2	0,48
‘Каменяр’	+	2	0,5	-	1	0,0	+	2	0,32
‘Міандр’	+	2	0,5	-	1	0,0	+	2	0,48
‘Журавка’	+	2	0,45	-	1	0,0	+	2	0,48
‘Надія’	+	2	0,45	-	1	0,0	+	2	0,28
‘Рушничок’	+	2	0,41	-	1	0,0	+	2	0,32
‘Тванівський’	+	2	0,28	-	1	0,0	+	2	0,32
‘Вручий’	+	2	0,28	-	1	0,0	+	2	0,28

Таблиця 3

Оцінка ефективності ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з SSR-маркерами та TBP-методом на прикладі внутрішньосортового аналізу сортів льону-довгунця

Назва сорту	ДНК-маркери, що оцінюють поліморфізм довжини інтронів генів актину		SSR (LU 7 / LU 21)		TBP*	
	Поліморфізм (+/-)	<i>PIC</i>	Поліморфізм (+/-)	<i>PIC</i>	Поліморфізм (+/-)	<i>PIC</i>
‘Есмань’	-	0,0	-	0,0	-	0,0
‘Сіверський’	-	0,0	-	0,0	-	0,0
‘Глухівський ювілейний’	+	0,48	+	0,56/0,48	-	0,0
‘Глобус’	+	0,48	-	0,0	-	0,0
‘Глазур’	-	0,0	-	0,0	-	0,0
‘Гладіатор’	+	0,72	+	0,32	+	0,32
‘Чарівний’	-	0,0	+	0,32	+	0,32
‘Глінум’	+	0,32	+	0,48	+	0,5
‘Зоря 87’	+	0,48	+	0,64/0,72	+	0,48
‘Каменярь’	+	0,32	+	0,56	+	0,56
‘Міандр’	+	0,48	+	0,64/0,32	+	0,5
‘Журавка’	+	0,48	+	0,32	+	0,61
‘Надія’	+	0,28	+	0,56/0,32	+	0,32
‘Рушничок’	+	0,32	+	0,56/0,32	-	0,0
‘Іванівський’	+	0,32	+	0,56	+	0,32
‘Вручий’	+	0,28	+	0,56	+	0,28

*- дані взяті зі статті Rabokon et al., 2018.

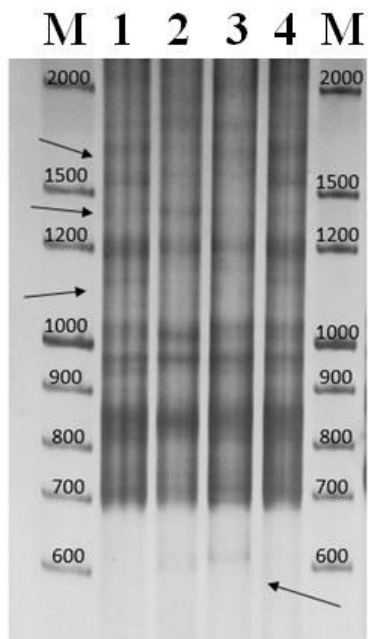


Рис. 12. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів картоплі: 1 – ‘Світанок’, 2 – ‘Левада’, 3 – ‘Зарево’, 4 – ‘Вернісаж’. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

Загалом сортова вибірка томату охарактеризована як низькополіморфна ($PI_C=0,15$). Також вдалося отримати специфічні ДНК-профілі з інтронами генів актину сортів томату та картоплі, що значно відрізнялися на міжвидовому рівні, однак містили ряд спільних фрагментів ДНК, що свідчить про генетичну спорідненість та спільне філогенетичне походження даних видів.

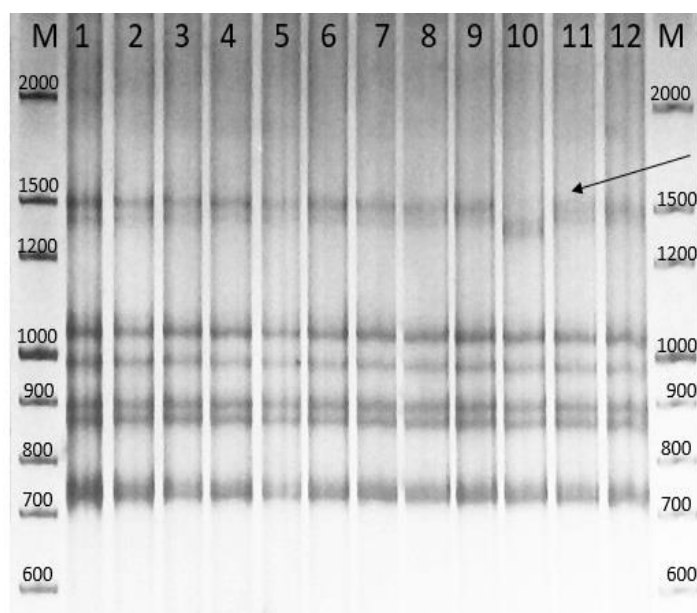


Рис. 13. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів томату: 1 – ‘Money Maker’, 2 – ‘Перлина’, 3 – ‘Волгоградський’, 4 – ‘Балконне Чудо золоте’, 5 – ‘Де Барао чорний’, 6 – ‘Тарасенко рожевий’, 7 – ‘Ефемер’, 8 – ‘Шапка Мономаха’, 9 – ‘Валютній’, 10 – ‘Американський Синій’, 11 – ‘Золотий Горіх’, 12 – ‘Де Барао рожевий’. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначені поліморфні фрагменти інтронів генів актину

Ідентифікація міжвидових гібридів ріпаку з дикорослими видами шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Проведено генотипування ліній ріпаку (*B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-579, *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-515 та *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-460) та дикорослих видів з флори України (*E. cretaceum*, *D. tenuifolia* та *B. juncea*), а також їх міжвидових гібридів, з використанням ДНК-маркерів, які виявляють поліморфізм довжини інтронів генів актину (рис. 14). Продемонстровано утворення специфічних ДНК-профілів проаналізованих зразків, які містили значну кількість фрагментів інтронів генів актину. Основна область розподілення ампліконів інтронів генів актину знаходилась в діапазоні від 595 п. н. до 3000 п. н. Утворені ДНК-профілі з інтронами генів актину *B. napus*, *E. cretaceum*, *D. tenuifolia* та *B. juncea* (рис. 14, зразки 1, 2, 4, 8, 11, 14), значно відрізнялись один від одного за кількістю та розподілом утворених ампліконів. ДНК-профілі міжвидових гібридів ріпаку поєднують в собі фрагменти інтронів генів актину обох батьківських форм одночасно, що дозволяє достовірно ідентифікувати як батьківські генотипи, так

і генотипи міжвидових гібридів. Таким чином, в подальшому метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, може повноцінно використовуватись для молекулярно-генетичного аналізу генотипів та дослідження походження видів і міжвидових рослин.

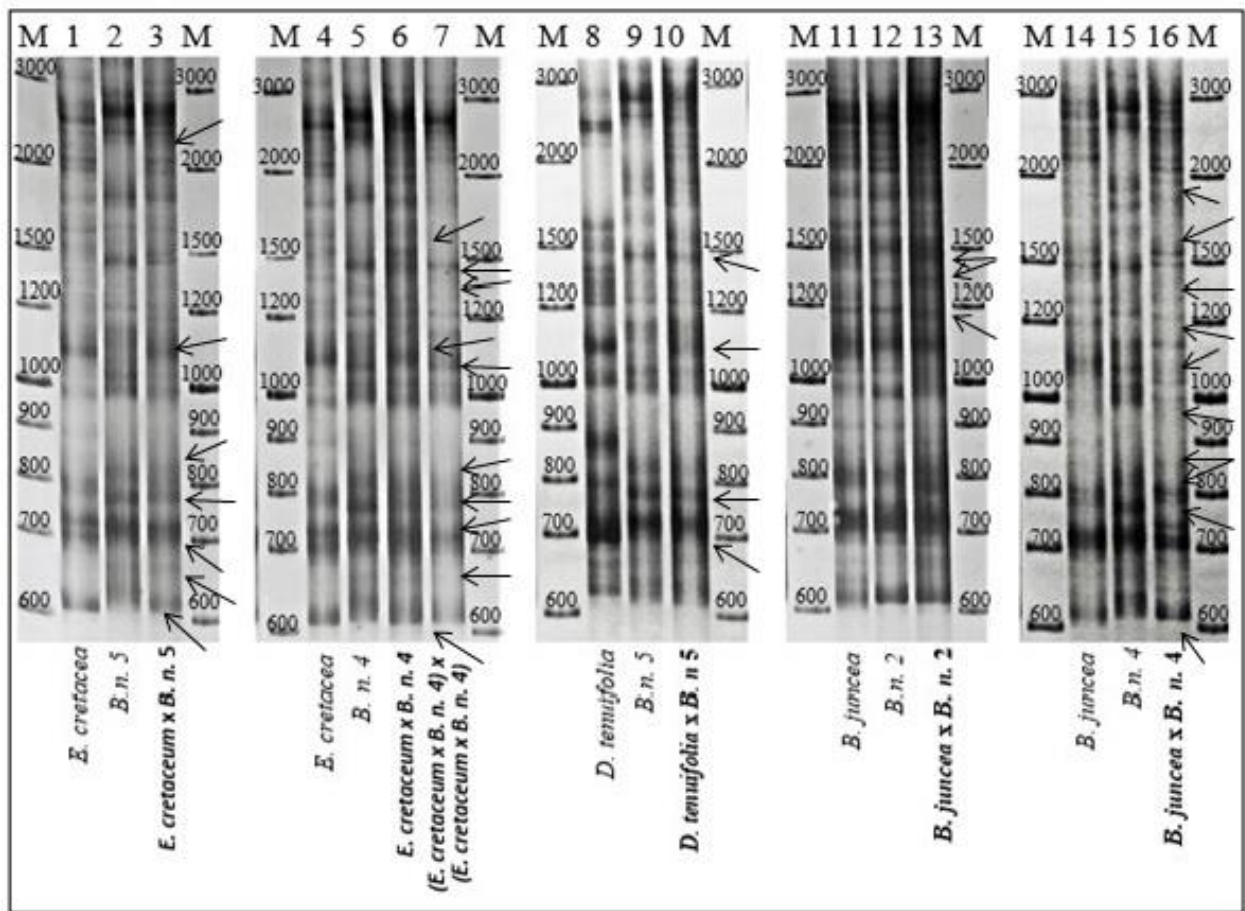


Рис. 14. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину батьківських форм та міжвидових гібридів, отриманих в результаті схрещування ріпаку і дикорослих видів родини *Brassicaceae*: 1 – *E. cretaceum*, 2 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-579 (B.n. 5), 3 – *E. cretaceum* x *B. n. 5*, 4 – *E. cretaceum*, 5 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-515 (B.n. 4), 6 – *E. cretaceum* x *B. n. 4*, 7 – (*E. cretaceum* x *B. n. 4*) x (*E. cretaceum* x *B. n. 4*), 8 – *D. tenuifolia*, 9 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-579 (B.n. 5), 10 – *D. tenuifolia* x *B. n. 5*, 11 – *B. juncea*, 12 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-460 (B.n. 2), 13 – *B. juncea* x *B. n. 2*, 14 – *B. juncea*, 15 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-515 (B.n. 4), 16 – *B. juncea* x *B. n. 4*. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначені фрагменти інтронів генів актину, які дозволяють ідентифікувати генотипи міжвидових гібридів ріпаку

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі проаналізовано та узагальнено можливості застосування розробленого методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для генотипування та диференціації різних таксономічних груп рослин.

В цілому отримані результати дозволяють сформулювати наступні висновки.

1. За результатами біоінформатичного аналізу відібрано 8 анотованих послідовностей генів актину *A. thaliana*, 9 послідовностей генів актину *O. sativa*, 15 генів актину *L. usitatissimum* та по 11 генів актину *S. lycopersicum* та *S. tuberosum*. Відібрано повні нуклеотидні послідовності всіх генів актину, їх кодуєчі ділянки (екзони) та їх трансльовані амінокислотні послідовності, які були використані для подальших досліджень.

2. Результати аналізу екзон-інтронної структури генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* засвідчили, що переважна більшість генів актину має 4 екзони та 3 інтрони. Продемонстровано подібність кількісного складу нуклеотидів екзонних ділянок генів актину, оскільки в переважній більшості I-й екзон містив 60 п. н., II-й екзон – 394 п. н., III-й екзон – 614 п. н., IV-й екзон – 66 п. н. Встановлено, що ступінь ідентичності екзонних ділянок генів актину дорівнює 77 %, а їхніх трансльованих амінокислотних послідовностей – 92 %, що підтверджує високу консервативність кодуєчих ділянок генів актину.

3. Спираючись на результати біоінформатичного пошуку генів актину вищих рослин та аналізу особливостей їх екзон-інтронної структури, проведено дизайн вироджених праймерів для оцінки поліморфізму довжини II-го інтрону всіх генів актину. Здійснено дизайн трьох пар ген-специфічних праймерів для виявлення поліморфізму II-го інтрону окремих генів актину льону-довгунця (Lus10016259, Lus10040826, Lus10021057 та Lus10029286).

4. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволила отримати видоспецифічні ДНК-профілі з інтронами генів актину *T. aestivum*, *H. vulgare* та *O. sativa*. Сортові вибірки пшениці та ячменю охарактеризовано як генетично гетерогенні. В той же час використання підходу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину не дозволило диференціювати між собою сорти рису.

5. Використання ДНК-маркерної системи для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволило якісно генотипувати та диференціювати природні популяції егілопсу двухдюймового (*Ae. biuncialis*), що свідчить про доцільність подальшого використання цього підходу для молекулярно-генетичного аналізу інших видів родини *Poaceae*.

6. За допомогою аналізу поліморфізму довжини II-го інтрону генів актину (Lus10021057, Lus10029286, та гену Lus10016259) у сортів льону-довгунця різної селекції виявлено поліморфні фрагменти інтронів генів актину, що дозволило провести диференціацію різних сортів льону-довгунця між собою.

7. Проведено генотипування сортів льону-довгунця з використанням універсальних ДНК-маркерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Продемонстровано вищий рівень поліморфізму у білоруських ландрас льону-довгунця у порівнянні із сортами української селекції. Результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину у льону вузьколистого (*L. angustifolium*) та льону дворічного (*L. bienne*) не виявили значних відмінностей між даними видами, що свідчить про їх високу генетичну спорідненість.

8. Під час аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів льону-довгунця української селекції встановлено, що 12-ть із 16-ти

проаналізованих сортів виявилися генетично неоднорідними та лише в чотирьох із проаналізованих сортів ('Есмань', 'Сіверський', 'Глазур' та 'Чарівний') поліморфізм інтронів генів актину відсутній.

9. На прикладі оцінки внутрішньосортowego поліморфізму льону продемонструвана однакова ефективність застосування ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з SSR-маркерами та вища ефективність у порівнянні з ТВР-методом.

10. Проведено оцінку поліморфізму довжини інтронів генів актину для вибірки сортів томату та картоплі, в результаті чого виявлено, що більш поліморфною виявилася вибірка сортів картоплі.

11. В результаті генотипування міжвидових гібридів ріпаку та дикорослих видів з флори України шляхом виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину продемонстровано, що ДНК-профілі гібридів одночасно містять амплікони інтронів генів актину, притаманні обом батьківським генотипам.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Постовойтова А.С.** Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний засіб генетичного профілювання злакових (*Poaceae* L.) / **А.С. Постовойтова**, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Доповіді Національної академії наук України. – 2019. – Т. 2. – С. 78-83. (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю*).

2. **Postovoitova A.S.** Molecular genetic evaluation of Ukrainian flax cultivars homogeneity based on intron length polymorphism of actin genes and microsatellite loci / **A.S. Postovoitova**, O.Yu. Yotka, Ya.V. Pirko, Ya.B. Blume // Cytol. Genet. – 2018. – Vol. 52(6). – P. 448-460. (*Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю*).

3. Pydiura N. Genome-wide identification, phylogenetic classification, and exon-intron structure characterisation of the tubulin and actin genes in flax (*Linum usitatissimum*) / N. Pydiura, Ya. Pirko, D. Galinousky, **A. Postovoitova**, A. Yemets, A. Kilchevsky, Ya. Blume // Cell Biol. Intl. – 2018. – Vol. 43(9). – P. 1010-1019. (*Здобувачем особисто проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю*).

4. **Постовойтова А.С.** Поліморфізм інтронів генів актину як інструмент генотипування представників родини *Solanaceae* / **А.С. Постовойтова**, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Науковий Вісник НУБІП України. – 2018. – Т. 287 – С.70-78. (*Здобувачем особисто проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю*).

5. **Постовойтова А.С.** Поліморфізм довжин інтронів генів актину у різних сортів льону-довгунця української селекції / **А.С. Постовойтова**, О.Ю. Йотка, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2017. – Т. 20. – С. 99-103. (*Здобувачем особисто проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю*).

6. **Постовойтова А.С.** Поліморфізм довжин другого інтрону генів актину в геномі *Linum usitatissimum* L. / **А.С. Постовойтова**, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2016. – Т. 19. – С. 39-42.

(Здобувачем особисто проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

7. **Постовойтова А.С.** Пошук та аналіз послідовностей генів актину в геномі льону [Електронний ресурс] / **А.С. Постовойтова**, Г.Я. Баєр, М.О. Пидюра, Н.Л. Пастухова, Я.В. Пірко, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // Наукові доповіді НУБіП. – 2015. – 8(57). URL: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/14.pdf. (Здобувачем особисто проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

8. Рабоконь А.Н. Аналіз гомологов генів основних білків цитоскелета у різних видів вищих рослин / А.Н. Рабоконь, **А.С. Постовойтова**, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 14. – С. 76-78. (Здобувачем особисто проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

9. **Постовойтова А.С.** Генотипування сортів рису посівного за допомогою оцінки поліморфізму довжини другого інтрону генів актину / **А.С. Постовойтова**, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні технології підвищення генетичного потенціалу рослин», 4-5 липня 2018, Харків, Україна: тези доп. – Харків, 2018. – С. 231.

10. **Постовойтова А.С.** Поліморфізм довжини інтронів генів актину як новий метод для оцінки генетичного поліморфізму різних природних популяцій *Aegilops biuncialis* / **А.С. Постовойтова**, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Міжнародна наукова конференція «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин», 12 вересня 2017, Одеса, Україна: тези доп. – Одеса, 2017. – С. 61-62.

11. Пірко Н.М. Використання поліморфізму генів актину у дослідженні гібридів між генетично модифікованим ріпаком і його дикими родичами з флори України / Н.М. Пірко, Я.В. Пірко, **А.С. Постовойтова**, Я.Б. Блюм // Міжнародна наукова конференція «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин», 12 вересня 2017, Одеса, Україна: тези доп. – Одеса, 2017. – С. 59-60.

12. **Постовойтова А.С.** Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників роду *LINUM* L. / **А.С. Постовойтова**, О.Ю. Йотка, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Матеріали III конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 16-18 травня 2017, Київ, Україна: тези доп. – Київ, 2017. – С. 41.

13. Пірко Я.В. Аналіз гомологов генів, кодуючих актин, у різних видів вищих рослин / Я.В. Пірко, А.Н. Рабоконь, **А.С. Постовойтова**, Д.А. Самофалова, Я.Б. Блюм // Матеріали III міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології», 24-27 лютого 2014, Донецьк, Україна: тези доп. – Донецьк, 2014. – С. 284-285.

14. Пірко Я.В. Аналіз экзон-интронної структури генів «домашнього хазяйства» у різних видів рослин / Я.В. Пірко, **А.С. Постовойтова**, А.М. Рабоконь, Я.Б. Блюм // Матеріали II конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23-24 грудня 2013, Київ, Україна: тези доп. – Київ, 2013. – С. 34.

АНОТАЦІЯ

Постовойтова А.С. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний інструмент внутрішньо- та міжвидової генетичної диференціації рослин. – 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, 2019.

В дисертації представлено новий підхід для генотипування, що базується на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів актину. Вивчено можливість його використання для ДНК-профілювання та диференціації рослин на видовому, популяційному, сортовому та внутрішньосортному рівнях. Спираючись на результати біоінформатичного пошуку та аналізу генів актину в геномах однодольних та двудольних рослин здійснено дизайн та синтез універсальних ПЛР-праймерів, з використанням яких досліджено поліморфізм довжини інтронів генів актину у представників родин *Poaceae*, *Linaceae*, *Solanaceae* та *Brassicaceae*. Окрім того, на прикладі внутрішньосортного аналізу льону-довгунця підтверджена ефективність оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з популярними SSR-маркерами та ТВР-методом. Отримані дані свідчать про те, що розроблений метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину є інформативним інструментом для проведення молекулярно-генетичного аналізу рослин, який може знайти застосування в селекційних та популяційно-генетичних дослідженнях.

Ключові слова: ДНК-маркери, поліморфізм довжини інтронів, гени актину, генотипування, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Linum usitatissimum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Aegilops biuncialis*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Poaceae*, *Linaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae*.

АННОТАЦИЯ

Постовойтова А.С. Полиморфизм длины интронов генов актина как эффективный инструмент внутри- и межвидовой генетической дифференциации растений. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 – молекулярная генетика. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2019.

Представлен новый подход для генотипирования, основанный на оценке полиморфизма длины интронов генов актина. Изучена возможность его использования для ДНК-профилирования и дифференциации растений на видовом, популяционном, сортовом и внутрисортном уровнях. Опираясь на результаты биоинформатического поиска и анализа генов актина в геномах

однодольных и двудольных растений, осуществлен дизайн и синтез универсальных ПЦР-праймеров, с использованием которых исследованы полиморфизм длины интронов генов актина у представителей семейств *Poaceae*, *Linaceae*, *Solanaceae* и *Brassicaceae*. Кроме того, на примере внутрисортного анализа льна-долгунца подтверждена эффективность подхода оценки полиморфизма длины интронов генов актина в сравнении с популярными SSR-маркерами и TBP-методом. Полученные данные свидетельствуют, что разработанный метод оценки полиморфизма длины интронов генов актина является информативным инструментом для проведения молекулярно-генетического анализа растений, который может найти применение в селекционных и популяционно-генетических исследованиях.

Ключевые слова: ДНК-маркеры, полиморфизм длины интронов, гены актина, генотипирование, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Linum usitatissimum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Aegilops biuncialis*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Poaceae*, *Linaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae*.

SUMMARY

Postovoitova A.S. The intron length polymorphism of actin genes as an effective tool for intraspecific and interspecific genetic differentiation of plants. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences (Ph.D) on a speciality 03.00.22 – molecular genetics. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

A new approach for genotyping based on assessment of the intron length polymorphism of actin genes has been presented in the dissertation. The possibility of its use for DNA profiling and differentiation of plants at the specific, population, varietal and intravarietal levels has been studied. Based on the results of the bioinformation search and actin gene analysis in the genomes of monocotyledonous and dicotyledonous plants, the design and synthesis of universal PCR primers was carried out, using which intron length polymorphism of actin genes in representatives of the families *Poaceae*, *Linaceae*, *Solanaceae* and *Brassicaceae* was studied. In addition, by the example of flax intravarietal analysis the effectiveness of the approach for assess the intron length polymorphism of actin genes was confirmed in comparison with the popular SSR markers and TBP method. The same efficiency of DNA markers that detect the intron length polymorphism of actin genes compared to SSR markers and higher efficiency compared to the TBP method was established. In general, the data obtained indicate that a new approach for evaluation of the intron length polymorphism of actin genes is the informative tool for the plant molecular genetic analysis, which may find application in breeding and population-genetic studies.

Key words: DNA markers, intron length polymorphism, actin genes, genotyping, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Linum usitatissimum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Aegilops biuncialis*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Poaceae*, *Linaceae*, *Solanaceae*, *Brassicaceae*.