

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПОСТОВОЙТОВА АНАСТАСІЯ СЕРГІЇВНА

УДК 575.2:577.2

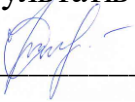
ДИСЕРТАЦІЯ
ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ АКТИНУ ЯК
ЕФЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ ВНУТРІШНЬО- ТА МІЖВИДОВОЇ
ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ РОСЛИН

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. С. Постовойтова

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

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Постовойтова А.С. Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний інструмент внутрішньо- та міжвидової 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 дисертаційній роботі проведений біоінформатичний пошук генів актину в геномах різних видів однодольних та дводольних рослин, у загальнодоступних базах даних GeneBank та Phytozome v 9.1. Як модельні рослинні об'єкти для пошуку генів актину було обрано п'ять видів вищих рослин, геноми яких повністю секвеновані, серед них різушка Таля (*Arabidopsis thaliana* L.), рис посівний (*Oryza sativa* L.), льон-довгунець (*Linum usitatissimum* L.), картопля (*Solanum tuberosum* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L.). Спираючись на дані, отримані під час аналізу особливостей екзон-інтронної структури генів актину вищих рослин, здійснено дизайн та синтез вироджених праймерів для оцінки поліморфізму довжини II-го інтрону генів актину у вищих рослин. Оцінена можливість використання розробленого підходу для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину для генотипування, ДНК-профілювання та диференціації різних таксономічних груп рослин на видовому, популяційному, сортовому та внутрішньосортному рівнях. Окрім того, на прикладі внутрішньосортного аналізу льону-довгунця підтверджена ефективність оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з популярними SSR-маркерами та TBP-методом.

На сьогодні в базі даних GeneBank наявні 8 анотованих послідовностей генів актину *A. thaliana* з встановленою екзон-інтронною структурою.

Одночасно, в результаті пошуку в базі даних Phytozome v 9.1 в геномі *O. sativa* знайдено 9 нуклеотидних послідовностей генів актину, у *L. usitatissimum* – 15 генів актину, а в геномах *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* закодовано по 11 генів актину.

Проведений аналіз особливостей екзон-інтронної структури генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. Продемонстровано, що більшість генів актину вищих видів рослин містили по чотири екзони та три інтрони. Однак існують деякі виключення, зокрема були проаналізовані гени актину, які містили по три екзони та два інтрони. Окрім того, показана певна системність в кількісному складі екзонів, у переважній більшості випадків, I-й екзон містив 60 п. н., II-й екзон – 394 п. н., III-й екзон – 614 п. н. та IV-й екзон – 66 п.н. відповідно. Інтрони генів актину мають різну кількість нуклеотидів, яка варіює в широких межах.

На наступному етапі роботи оцінили ступінь ідентичності кодуючих ділянок (екзонів) генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* та амінокислотних послідовностей, що з них транслюються з використанням програми UGENE. Попередньо проводили множинне вирівнювання кодуючих ділянок всіх відібраних генів актину вищих видів рослин, а також амінокислотних послідовностей актину, що з них транслюються. Було встановлено, що ступінь ідентичності кодуючих ділянок генів актину в середньому складає 77 %, а ступінь ідентичності амінокислотних послідовностей актину, що з них транслюються – близько 92 %. Отримані результати свідчать про те, 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.

Оскільки на попередніх етапах дослідження підтверджена висока консервативність екзонів генів актину та одночасна гіперваріабельність

інтронних ділянок, надалі здійснено дизайн та синтез праймерів для подальшої оцінки поліморфізму довжини II-го інтрону генів актину у вищих рослин. Зокрема, було синтезовано три пари ген-специфічних праймерів для окремих генів актину *L. usitatissimum*, а також пара вироджених універсальних праймерів (ActIn) потенційно придатних для оцінки поліморфізму II-го інтрону генів актину у всіх видів вищих рослин. Тестування новорозробленої ДНК-маркерної системи для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, проводили на різних вибірках однодольних та дводольних рослин.

Проведено генотипування та диференціація сортів деяких господарськоцінних видів родини Злакових (*Poaceae*) з використанням оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, а саме у пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячміню (*Hordeum vulgare* L.) та рису (*O. sativa*). Загалом, вдалося отримати ДНК-профілі з видоспецифічним набором фрагментів, що містили інтрони генів актину, для всіх проаналізованих зразків. Виявлено поліморфізм довжини інтронів генів актину серед сортів пшениці та ячміню, сорти рису були генетично мономорфними.

Вперше здійсено аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у 14 природних популяцій егілопсу двухдьюмового (*Aegilops biuncialis* Vis.) з Кримського півострову (Україна). Новорозроблена ДНК-маркерна система дозволила якісно генотипувати та диференціювати досліджені популяції *Ae. biuncialis*, виявивши значну кількість поліморфних ампліконів інтронів генів актину. Таким чином, була показана висока гетерогенність та генетична неоднорідність досліджених природних популяцій егілопсу. В цілому новорозроблена ДНК-маркерна система для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину виявилася ефективним інструментом для дослідження генетичної гетерогенності різних представників родини *Poaceae*.

В подальшому було проведено оцінку поліморфізму довжини II-го інтрону окремих генів актину у сортів льону-довгунця зарубіжної та

української селекції з використанням ген-специфічних праймерів, що були підібраних до генів актину Lus10021057, Lus10029286, Lus10040826 та Lus10016259 льону-довгунця. За допомогою цих праймерів вдалося виявити поліморфізм інтронів генів актину Lus10021057, Lus10029286 та Lus10016259 у досліджених сортів льону.

Вперше генотиповано та диференційовано сорти льону-довгунця української селекції та білоруських ландрас з використанням універсальних праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Отримано видоспецифічні ДНК-профілі льону, які містили поліморфні амплікони інтронів генів актину. Показано, що більш генетично гетерогенними виявилися білоруські ландраси льону-довгунця. Продемонстрована доцільність використання розробленого підходу для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для генотипування та диференціації льону на міжсортівному рівні. Окрім того, під час аналізу двох видів льону (*Linum bienne* Mill. та *Linum angustifolium* Huds.) не вдалося встановити відмінностей між ДНК-профілями цих видів. Також продемонстровано їх схожість з ДНК-профілем льону-довгунця, що свідчить про високу генетичну спорідненість досліджених видів.

Надалі була проведена внутрішньосортова оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів льону-довгунця української селекції з використанням специфічних праймерів до генів актину Lus10016259 та Lus10040826, а також універсальних ДНК-маркерів. Продемонстровано, що переважна більшість сортів льону-довгунця (12 з 16 сортів) виявилися генетично неоднорідними. Лише сорти 'Есмань', 'Сіверський', 'Глазур' та 'Чарівний' охарактеризовані як генетично мономорфні. Одночасно встановлено, що для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину більш інформативними виявилися універсальні ДНК-маркери.

Окрім того, на прикладі аналізу внутрішньосортowego поліморфізму у льону-довгунця української селекції проведено порівняння ефективності розробленого підходу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину з SSR-маркерами та TBP-методом. Проведений аналіз внутрішньосортowych вибірок 16 сортів льону-довгунця української селекції за двома мікросателітними локусами (LU 7 та LU 21), а також TBP-аналіз тих самих зразків льону-довгунця продемонстрував генетичну гетерогенність більшості сортів льону-довгунця. Порівнюючи отримані результати з використанням трьох різних ДНК-маркерних систем можна зазначити, що оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину проявила таку ж саму ефективність як і мікросателітні маркери, а також виявилася більш інформативною у порівнянні з TBP-методом.

В подальшому було оцінено поліморфізм довжини інтронів генів актину та проведено генотипування сортів томату (*S. lycopersicum*) і картоплі (*S. tuberosum*) як найбільш поширених сільськогосподарських культур серед представників родини Пасльонових (*Solanaceae*). Отримано специфічні ДНК-профілі сортів томату та картоплі, що значно відрізнялися на міжвидовому рівні, однак містили низку спільних фрагментів, що свідчить про генетичну спорідненість та спільне філогенетичне походження даних видів. Сорти томату були охарактеризовані як низькополіморфні, в той час як вибірка сортів картоплі виявилася більш гетерогенною, оскільки встановлено значно більшу кількість поліморфних ампліконів інтронів генів актину. Загалом підхід оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволив якісно генотипувати сорти томату та картоплі та дослідити їх міжсортowy генетичний поліморфізм.

Також була оцінена доцільність використання ДНК-маркерної системи для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину для ідентифікації та генотипування міжвидових гібридів ріпаку олійного (*Brassica napus* L.) з

деякими докорослими видами родини Капустяних (*Brassicaceae*), а саме: рогачкою міловою (*Erucastrum cretaceum* Kotov.), дворядником тонколистим (*Diplotaxis tenuifolia* L.) та гірчицею сизою (*Brassica juncea* L.). ДНК-профілі міжвидових гібридів та батьківських видів містили велику кількість ампліконів інтронів генів актину, що є характерною ознакою для представників родини *Brassicaceae* в цілому. Окрім того показано 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.

Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину виявилась достатньо ефективною, простою та інформативною ДНК-маркерною системою, що дозволяє якісно генотипувати та диференціювати різні види, сорти, популяції та окремі генотипи видів вищих рослин.

В роботі проведений біоінформатичний пошук генів актину у однодольних та дводольних видів рослин та детальний аналіз особливості їх екзон-інтронної структури. Підтверджена висока консервативність екзонних ділянок генів актину рослин. На підставі результатів біоінформатичного аналізу генів актину, здійснений дизайн та синтез праймерів для аналізу поліморфізму довжини II-го інтрону генів актину.

Наукова новизна дисертаційної роботи полягає в тому, що вперше розроблено універсальний підхід для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у вищих видів рослин, а також продемонстровано доцільність його використання для генотипування, ДНК-профілювання та диференціації різних однодольних та дводольних рослин на видовому, популяційному,

сортів та внутрішньосортів рівнях. Вперше генотиповано та диференційовано різні сорти господарчо цінних культур таких як пшениця, ячмінь, рис, льон-довгунець, томати та картопля з використанням поліморфізму довжини інтронів генів актину. Вперше оцінено міжпопуляційний поліморфізм довжини інтронів генів актину та показані значні відмінності між природними популяціями егілопсу двухдуюмового. Проведений внутрішньосортів аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів льону-довгунця української селекції та оцінена генетична однорідність їх сортів матеріалу. Вперше, продемонстрована висока ефективність методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з широко поширеними SSR-маркерами та TBP-методом на прикладі внутрішньосортів аналізу льону-довгунця української селекції. Крім того, досліджена можливість використання поліморфізму довжини інтронів генів актину для ідентифікації міжвидових гібридів між ріпаком (*B. napus*) та дикорослими видами родини *Brassicaceae*.

Загалом, застосування оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину може широко використовуватися в різноманітних генетичних дослідженнях для генотипування та встановлення молекулярно-генетичних особливостей різних сільськогосподарських культур, для оцінки генетичної однорідності та чистоти сортів матеріалу в різноманітних селекційних програмах, а також для дослідження філогенетичних зв'язків між популяціями та для ідентифікації генотипів міжвидових гібридів і їх батьківських форм.

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.

Список публікацій за темою дисертаційної роботи

Статті:

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. Анализ гомологов генов основных белков цитоскелета у различных видов высших растений / **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).*

Тези:

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-интронной 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.

SUMMARY

Posovoitova 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 on a speciality 03.00.22 – molecular genetics. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The bioinformatic search of actin genes in genomes of different monocotyledonous and dicotyledonous plant species in the public databases GeneBank and Phytozome v 9.1 was carried out in the dissertation. Five species of higher plants have been selected as model plant objects for the search for actin genes, the genomes of which are completely sequenced, among them the thale cress (*Arabidopsis thaliana* L.), rice (*Oryza sativa* L.), flax (*Linum usitatissimum* L.), potatoes (*Solanum tuberosum* L.), tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). Based on the data obtained during the analysis of exon-intron structure features of higher plant actin genes, the design and synthesis of degenerate primers was performed to evaluate second intron length polymorphism of actin genes in higher plants. The possibility of using the developed approach for the detection of actin length intron polymorphism for genotyping, DNA profiling and differentiation of different taxonomic groups of plants at species, population, varietal and intravarietal levels was evaluated. In addition, the example of intravarietal analysis of flax-liqueur confirmed the effectiveness of estimating the intron length polymorphism of actin genes in comparison with the popular SSR markers and TBP method.

Today 8 annotated *A. thaliana* actin gene sequences are available in the GeneBank database. At the same time 9 nucleotide sequences of *O. sativa* actin genes were found in the Phytozome v 9.1 database, 15 actin genes were found in

L. usitatissimum, and per 11 actin genes were encoded in the *S. tuberosum* and *S. lycopersicum* genomes.

The features of the actin gene exon-intron structure of *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* and *S. lycopersicum* were analyzed. Most actin genes of higher plant species have been shown to contain four exons and three introns. However, there are some exceptions, in particular the actin genes containing three exons and two introns were analyzed.

In addition, consistency in the quantitative composition of exons was shown, in the vast majority of cases, the 1st exon contained 60 bp, the 2nd exon contained 394 bp, the 3rd exon contained 614 bp and the 4th exon –66 bp in accordance. Introns of actin genes have different nucleotides that vary widely.

In the next stage the degree of identity of the actin gene coding regions (exons) of *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* and *S. lycopersicum* and the degree of identity of the amino acid sequences transmitted using the UGENE program were evaluated. The multiple alignment of the coding regions of all selected actin genes, as well as the actin amino acid sequences transmitted from them, were previously performed. It was found that the degree of identity of the actin gene coding regions is on average 77%, and the degree of identity of the actin amino acid sequences is about 92%. The results obtained indicate that exons are the most conserved regions of actin genes. The results confirm the feasibility of using actin genes in the further development of the DNA marker system for the intron length polymorphism evaluation.

Since the previous stages of the study confirmed the high conservativeness of actin gene exons and the simultaneous hypervariability of intron regions, the design and synthesis of primers were further refined to further evaluate the second intron length polymorphism of actin genes in higher plants. In particular, three pairs of gene-specific primers were synthesized for individual actin genes of *L. usitatissimum*, as well as a pair of degenerate universal primers (ActIn)

potentially suitable for evaluating the second intron polymorphism of actin genes in all higher plant species. Testing of the developed DNA marker system to assess the intron length polymorphism of actin genes was performed on different samples of monocotyledonous and dicotyledonous plants.

Genotyping and differentiation of varieties of some economically valuable *Poaceae* family species were conducted using the estimation of the intron length polymorphism of actin genes, namely wheat (*Triticum aestivum* L.), barley (*Hordeum vulgare* L.) and rice (*O. sativa*). In general, it was possible to obtain DNA profiles with a specific fragment set containing actin gene introns for all analyzed samples. The intron length polymorphism of actin genes was found among wheat and barley varieties, and rice varieties were genetically monomorphic.

For the first time, an analysis of the intron length polymorphism of actin genes was performed in 14 natural populations of *Aegilops biuncialis* Vis. from the Crimean Peninsula (Ukraine). The newly developed DNA marker system allowed qualitatively genotyping and differentiation of the studied *Ae. biuncialis* populations, revealing a significant number of polymorphic actin gene intron amplicons. Thus the high genetic heterogeneity of the investigated *Ae. biuncialis* natural populations were shown. In general the developed DNA marker system for evaluating the intron length polymorphism of actin genes has proven to be an effective tool for investigating the genetic heterogeneity of various members from the *Poaceae* family.

Subsequently the second intron length polymorphism of individual actin genes in the foreign and Ukrainian flax varieties was evaluated using gene-specific primers matched to the actin genes Lus10021057, Lus10029286, Lus100408269 and Lus100408269. The intron length polymorphism of actin genes Lus10021057, Lus10029286 and Lus10016259 in the tested flax varieties was detected using these primers.

For the first time, flax varieties of Ukrainian breeding and Belarusian landraces were genotyped and differentiated using universal primers to evaluate the intron length polymorphism of actin genes. Specific flax DNA profiles containing polymorphic intron amplicons of actin genes were obtained. It is shown that Belarusian landraces of flax were more genetically heterogeneous. The expediency of using the developed approach to estimate the intron length polymorphism of actin genes for genotyping and differentiation of flax at the intervarietal level was demonstrated. In addition the analysis of the two flax species (*Linum bienne* Mill. and *Linum angustifolium* Huds.) failed to distinguish between these flax species DNA profiles. They also demonstrated their similarity to the DNA profile of flax, which indicates the high genetic affinity of the species studied.

In the following an intravarietal evaluation of the intron length polymorphism of actin genes in Ukrainian flax cultivars was performed using specific primers for the actin genes Lus10016259 and Lus10040826, as well as universal DNA markers. It has been demonstrated that the vast majority of flax varieties (12 of 16 varieties) were genetically heterogeneous. Only the cultivars 'Esman', 'Siverskyi', 'Glazur' and 'Charivnyi' were genetically homogeneous. At the same time universal DNA markers were found to be more informative in order to evaluate the intron length polymorphism of actin genes.

In addition, on the example of intravarietal analysis in Ukrainian flax the efficiency of the developed approach for estimating the intron length polymorphism of actin genes with SSR markers and TBP method was compared. The intravarietal analysis of 16 Ukrainian flax varieties by two microsatellite loci (LU 7 and LU 21), as well as TBP analysis of the same flax samples showed the genetic heterogeneity of the majority flax cultivars. Comparing the results with the use of three different DNA marker systems, it can be noted that the evaluation of the actin gene intron length polymorphism showed the same efficiency as the

microsatellite markers and also proved to be more informative compared to the TBP method.

Subsequently, the evaluation of the actin gene intron length polymorphism and genotyping of tomato (*S. lycopersicum*) and potato (*S. tuberosum*) varieties as the most common crops among representatives of the *Solanaceae* family were conducted. Specific DNA profiles of tomato and potato varieties were obtained, which differed significantly between species, but contained a number of common fragments indicating the genetic affinity and common phylogenetic origin of these species. Tomato varieties were characterized as low polymorphic, while sampling potato varieties was more heterogeneous, since a significantly larger number of polymorphic amplicons were found. In general, the approach of estimating the intron length polymorphism of actin genes has allowed qualitative genotyping of tomato and potato varieties and investigating their intervarietal genetic polymorphism.

The feasibility of using a DNA marker system to detect the intron length polymorphism of actin genes for the identification and genotyping of interspecific hybrids of oilseed rape (*Brassica napus* L.) with some adult species from the *Brassicaceae* family, namely *Erucastrum cretaceum* Kotov., *Diplotaxis tenuifolia* L. and *Brassica juncea* L. was also evaluated. DNA profiles of interspecific hybrids and parental species contained a large number of actin gene intron amplicons, which is characteristic of *Brassicaceae* family representatives as a whole. In addition, the DNA profiles of interspecific hybrids combine the actin intron fragments of both parental forms at the same time, allowing both parental and interspecific hybrids to be accurately identified. So further, the method for estimating the intron length polymorphism of actin genes can be fully used for molecular genetic analysis of genotypes and for the study of the origin of species and interspecific plants.

Estimation of actin gene intron length polymorphism has proved to be a sufficiently effective, simple and informative DNA marker system that allows

qualitative genotyping and differentiation of different species, populations, varieties and individual genotypes of higher plant species.

The bioinformatic search for actin genes in monocotyledonous and dicotyledonous plant species and a detailed analysis of their exon-intron structure features were conducted in the work. The high conservativeness of plant actin gene exon regions has been confirmed. Based on the results of actin gene bioinformatic analysis, the design and synthesis of primers for analysis of second intron length polymorphism of actin genes were performed.

The scientific novelty of the dissertation is that for the first time a universal approach to estimate the intron length polymorphism of actin genes in higher plant species was developed, and also demonstrated the feasibility of its use for genotyping, DNA profiling and differentiation of different monocotyledonous and dicotyledonous plants in species, population, varietal and intravarietal levels.

For the first time, different varieties of economically valuable crops such as wheat, barley, rice, flax, tomatoes and potatoes were genotyped and differentiated using the intron length polymorphism of actin genes.

For the first time the interpopulation polymorphism of actin gene introns was evaluated and significant differences between the *Ae. biuncialis* natural populations were shown. An intravarietal analysis of the intron length polymorphism of actin genes in Ukrainian flax varieties was conducted and the genetic homogeneity of their varietal material was evaluated. For the first time the high efficiency of the method for estimating the intron length polymorphism of actin genes has been demonstrated in comparison with the widespread SSR markers and TBP method by the example of intravarietal analysis of Ukrainian flax.

An addition the possibility of using the actin length intron polymorphism to identify interspecific hybrids between oilseed rape (*B. napus*) and wild species of the *Brassicaceae* family was explored.

In general the application of the estimate of actin gene intron length polymorphism can be widely used in various genetic studies for genotyping and

establishing molecular genetic features of different crops, for assessing the genetic homogeneity and purity of varietal material in various breeding programs, as well as for the study of phylogeny populations and to identify genotypes of interspecific hybrids and their parental forms.

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*.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	23
ВСТУП.....	25
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	32
1.1. ДНК – маркери.....	32
1.1.1. Довільні ДНК-маркери	35
1.1.2. Ген-специфічні ДНК-маркери.....	39
1.1.2.1. Поліморфізм довжини інтронів як джерело ДНК-маркерів.....	41
1.1.2.2. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну.....	42
1.1.3. Використання ДНК-маркерів в генетиці рослин.....	44
1.2. Організація генів актину та їх інтронів у рослин.....	47
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	51
2.1. Біоінформатичний пошук та аналіз структури генів актину, закодованих в геномах <i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> , <i>L. usitatissimum</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>S. lycopersicum</i>	51
2.2. Рослинний матеріал.....	52
2.3. Виділення рослинної ДНК.....	56
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).....	57
2.5. Розділення фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі.....	59
2.6. Візуалізація фрагментів ДНК в поліакриламідному гелі.....	61
2.7. Статистична обробка даних.....	61
РОЗДІЛ 3. БІОІНФОРМАТИЧНИЙ ПОШУК ТА АНАЛІЗ ГЕНІВ АКТИНУ У ВИЩИХ РОСЛИН.....	63
3.1. Біоінформатичний пошук генів актину в геномах представників однодольних та дводольних рослин.....	64
3.2. Аналіз особливостей екзон-інтронної структури генів актину вищих рослин.....	67

3.3. Встановлення ступеня ідентичності між кодуючими ділянками генів актину <i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> , <i>L. usitatissimum</i> , <i>S. tuberosum</i> та <i>S. lycopersicum</i> та їхніми трансльованими амінокислотними послідовностями.....	73
3.4. Дизайн праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у вищих рослин.....	74
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ АКТИНУ У РІЗНИХ ВИДІВ ВИЩИХ РОСЛИН.....	83
4.1. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників родини <i>Poaceae</i>	83
4.1.1. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів пшениці та ячменю	84
4.1.2. ДНК-профілювання сортів рису посівного за допомогою оцінки поліморфізму довжини другого інтрону генів актину.....	89
4.1.3. Диференціація природних популяцій <i>Aegilops biuncialis</i> за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.....	91
4.2. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників роду <i>Linum</i>	95
4.2.1. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину сортів льону-довгунця з використанням ген-специфічних праймерів.....	96
4.2.2. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину з використанням вироджених праймерів у різних видів льону та сортів льону-довгунця української селекції та білоруських ландрас	101
4.2.3. Внутрішньосортова оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину льону-довгунця української селекції.....	105

4.2.4. Оцінка ефективності ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з SSR-маркерами та TBP-методом на прикладі аналізу внутрішньосортової генетичної різноманітності у сортів льону-довгунця.....	113
4.3. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників родини <i>Solanaceae</i>	128
4.3.1. Поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних сортів картоплі.....	129
4.3.2. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів томату.....	131
4.4. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у різних представників родини <i>Brassicaceae</i>	134
4.4.1. Ідентифікація міжвидових гібридів ріпаку з дикорослими видами шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.....	135
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	142
ВИСНОВКИ.....	150
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	153
ДОДАТОК А.....	182

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

MAS	–	добір за маркерами або маркер-опосередкований добір (Marker-Assisted Selection)
QTL	–	локус кількісної ознаки (Quantitative Trait Loci)
SSR	–	повтори простих послідовностей, мікросателіти (Simple Sequence Repeats)
TBP	–	поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (Tubulin Base Polymorphism)
PIC	–	індекс поліморфного інформаційного змісту (Polymorphic Information Content)
ЦТАБ	–	цетилтриметиламоній бромід (СТАВ)
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція (PCR)
дНТФ	–	суміш дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (dNTP)
н. п.	–	нуклеотидна пара (bp)
ПААГ	–	поліакриламідний гель (PAGE)
GTM _s	–	ген-специфічні маркери (Gene-targeted markers)
ІЛР	–	поліморфізм довжини інтронів (Intron Length Polymorphism)
ДНК	–	дезоксирибонуклеїнова кислота (DNA)
RFLP	–	поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RDM _s	–	довільні ДНК-маркери (Random DNA markers)
AAD _s	–	ДНК-маркери, що ампліфікуються довільно (Arbitrarily Amplified DNA Markers)
RAPD	–	випадково ампліфікована поліморфна ДНК (Random Amplified Polymorphic DNA)
AFLP	–	поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів (Amplified Fragment Length Polymorphism)

- ISSR – міжмікросателітні послідовності (Inter Simple Sequence Repeats)
- REMAP – поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами та мікросателітами (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism)
- IRAP – поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism)
- РНК – рибонуклеїнова кислота (RNA)
- LTR – Довгий кінцевий повтор (Long Terminal Repeat)
- PBA – поліморфізм аналогів генів цитохрому P450 (Cytochrome P450 based Analogues)
- hTBP – поліморфізм довжини I-го та II-го інтронів генів β -тубуліну (horse Tubulin Base Polymorphism)
- cTBP – комбінований поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (II-го інтрону) (combinatorial Tubulin Base Polymorphism)
- UTR – нетрансльовані ділянки генів (untranslated regions)

ВСТУП

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 [1], 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 (GTMs)) [2, 3]. На сьогодні доступність геномних баз даних та покращення методик секвенування значно спрощують пошук нових ген-специфічних ДНК-маркерних систем [3].

Одним з багатообіцяючих напрямів у цьому плані є використання поліморфізму довжини інтронів різних генів (Intron Length Polymorphism, ILP) [4, 5]. 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 [6]. На сьогодні однією з таких успішних ILP-маркерних систем є оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, так званий метод ТВР (Tubulin Based Polymorphism) – [7, 8, 9]. 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 [7, 9, 10, 11]. 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

[12, 13]. Зокрема відомо, що гени актину є висококонсервативними генами зі сталою екзон-інтронною структурою [14], 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 природніх 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 міжсорттовому 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 ГВР-методом на прикладі аналізу внутрішньосорттового 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.

Дисертантка висловлює щирю 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. Калафат Любові Олександрівні, к.б.н. Пірко Надії Миколаївні, к.б.н. Білоножко Юлії Олександрівні, к.б.н. Рабоконе Анастасії Миколаївні за допомогу в проведенні досліджень. Пошукач 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. ДНК-маркери

Інформація про генетичні варіації, які існують в геномах рослин, відіграє важливу роль в дослідженні, покращенні та використанні рослинних ресурсів для потреб людини [15]. В процесі виявлення природи та рівня генетичних варіацій рослин важливими факторами є еволюційний фон, обрана система схрещування, процес переносу генів, щільність популяції тощо. У дослідженні різноманітності та інших важливих характеристик рослин використовуються різні типи агрономічних та морфологічних параметрів [16, 17]. Однак, протягом останніх десятиліть значно збільшився об'єм знань про структуру та послідовності рослинного геному, про фізіологічну роль та зв'язок різних генів в межах окремих організмів. Використання цих знань спричинило революційний розвиток молекулярної та популяційної генетики рослин, геноміки та селекції, а також сприяло створенню та розповсюдженню різноманітних ДНК-маркерних систем, використання яких дає глибші уявлення про генетичну різноманітність рослинних організмів [1].

ДНК-маркери або молекулярні маркери являють собою нуклеотидні послідовності, як гени так і некодуючі ділянки геному, які досліджуються через поліморфізм, виявлений між цими сіквенсами у різних організмів. Джерелом кількісного та якісного нуклеотидного поліморфізму в геномах рослин є різноманітні мутаційні процеси, такі як інсерції, делеції, точкові дуплікації та транслокації, які далеко не завжди впливають на транскрипційну активність генів [18]. Ідеальний ДНК-маркер має бути кодомінантним, тобто здатним виявляти всі алелі одного гену,

широкорозповсюдженим по всьому геному, відтворюваним та високо поліморфним [19].

На сьогодні, зважаючи на доступність різноманітних генетичних баз даних, покращення методик полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), секвенування, розділення та візуалізації продуктів ампліфікації тощо, абсолютно передбачуваним є вдосконалення старих та впровадження нових ДНК-маркерів як надійного інструменту у вирішення різноманітних популяційно-генетичних завдань [20].

На сьогодні існує декілька класифікаційних систем ДНК-маркерів, серед них найбільш поширеними є наступні:

- за формою взаємодії генів (кодомінантні або домінантні ДНК-маркери);
- за основним методом аналізу (ДНК-маркери, які досліджуються за допомогою блот-гібридизації або ПЛР-аналізу);
- за способом передачі генетичної інформації (успадкування органельного геному за материнським типом, успадкування органельного геному за батьківським типом, успадкування ядерного геному за обома батьками або успадкування ядерного геному за материнським типом) [21];
- за кількістю локусів, що аналізуються (монолокусні та мультилокусні ДНК-маркери) [3, 18].

Найбільш поширеною класифікацією, яка використовується в науковій літературі, вважається поділ ДНК-маркерів за методами аналізу, серед яких блот-гібридизація або ПЛР-аналіз.

Найпоширенішими серед молекулярних маркерів, які використовують як метод детекції саме гібридизацію, є RFLP-маркери. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів) – це перші монолокусні, кодомінантні ДНК-маркери, що використовують ДНК організму як джерело поліморфізму. Суть RFLP методики полягає в тому, що при обробці тотальної геномної ДНК декількома рестриктазами одночасно утворюється суміш з великої кількості

нуклеотидних фрагментів різної довжини. Надалі за допомогою електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелі фрагменти ДНК розділяються. В процесі подальшої гібридизації за Саузерном, з використанням специфічних ДНК-зондів, визначаються точні розміри та взаємне розташування рестрикційних фрагментів. Будь-які мутаційні зміни в межах рестрикційного сайту спричиняють відсутність рестриктазної активності в даній ділянці, в результаті чого утворюється фрагмент більшої довжини. Загалом, довжина рестрикційних фрагментів, що містять мутантні сайти, стає поліморфною, що і дає змогу диференціювати геноми організмів [18, 22, 23]. Оpubліковано велику кількість даних про використання RFLP-маркерів для дослідження багатьох видів рослин, серед яких: кукурудза [24, 25], картопля [26, 27], пшениця [28], рис [29], льон [30], томат [31] коноплі [32] тощо.

На сьогодні, переважна більшість ДНК-маркерів поєднуються в єдину групу, оскільки методом детекції є широко розповсюджений ПЛР-аналіз [21], який дозволяє значно збільшити низькі концентрації певних фрагментів ДНК в аналізованому зразку в процесі ампліфікації *in vitro* [33].

Протягом останніх десятиліть було створено та впроваджено багато ДНК-маркерних систем, які аналізують різні ділянки геномної ДНК. Зважаючи на обмежені знання генетиків щодо нуклеотидних послідовностей закодованих в ДНК, раніше для генетичного аналізу використовувалися довільні ДНК-маркери (Random DNA markers, RDMs) [2], або ДНК-маркери, що ампліфікуються довільно (Arbitrarily amplified DNA markers, AADs) [3], які досліджують анонімні послідовності ДНК. Не зважаючи на те, що на сьогодні все більш популярними стають ген-специфічні маркери (Gene-targeted markers, GTMs) [2, 3], які аналізують цільові ділянки різних генів, закодованих в геномі, тим не менше довільні ДНК-маркери залишаються ефективним інструментом у багатьох молекулярно-генетичних дослідженнях.

1.1.1. Довільні ДНК-маркери

Протягом останніх десятиліть для молекулярно-генетичних досліджень використовували довільні ДНК-маркери (RDMs). Такі маркерні системи не потребують жодної попередньої інформації про нуклеотидні послідовності геному. Використання довільних ДНК-маркерів дозволяє аналізувати різні полінуклеотидні фрагменти, які можуть розташовуватися як в кодуючих так і в некодуючих ділянках геному. Довільні ДНК-маркери проектуються випадковим чином та більшість з них є мультилокусними, досить дешевими та технічно простими, що надає їм значі переваги [20]. На сьогодні в молекулярно-генетичних дослідженнях використовуються такі довільні ДНК-маркерні системи, як: RAPD, AFLP, SSR, ISSR, IRAP, REMAP тощо.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, випадково ампліфікована поліморфна ДНК) як молекулярно-маркерна система передбачає проведення ПЛР з використанням довільних, коротких праймерів (близько 10 нуклеотидів), які комплементарно зв'язуються з ДНК та забезпечують ампліфікацію ділянки геному, розташованої між ними [34]. Поліморфізм, присутній між специфічними сайтами зв'язування RAPD-маркерів, виявляється шляхом розділення за допомогою електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелі, та підтверджується присутністю або відсутністю специфічних фрагментів. Тому, якщо в ділянці геному, яка комплементарна до RAPD-маркеру, відбулася мутація, то ПЛР продукт утворюватися не буде, і, як наслідок, зміниться кількість та розподіл ампліконів у гелі. Окрім того, RAPD є надзвичайно чутливим методом, і кінцевий результат залежить від багатьох факторів, таких як концентрація геномної ДНК, довжина та температура відпалу RAPD-праймерів, тип ДНК-полімерази, концентрація ПЛР буферу та хлориду магнію тощо [35, 36].

Опубліковано значну кількість даних щодо дослідження генетичної різноманітності на міжвидовому та внутрішньовидовому рівнях у різних видів рослин з використанням RAPD-методу [37-39]. Серед

сільськогосподарських культур, які широко вирощуються в Україні, RAPD-маркери розроблені для гороху [40], пшениці [41, 42], кукурудзи [43, 44], ячменю [45, 46], льону [47], картоплі [48, 49] тощо.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів) – ДНК-маркерна система, яка поєднує в собі характеристики RAPD й RFLP-маркерів [50] та передбачає проведення рестрикції тотальної геномної ДНК, лігування утворених фрагментів з ДНК-адапторами та подальшу ПЛР ампліфікацію [22]. AFLP-маркери є більш поліморфними ніж широкоживані RAPD-маркери та дозволяють ідентифікувати точкові мутації в сайтах рестрикції або в ділянках відпалу праймерів шляхом детекції присутності або відсутності специфічних ампліконів. Можна також оцінювати появу вставок та делецій в межах утвореного рестрикційного фрагменту, аналізуючи зміни їх довжини після електрофоретичного розділення [51]. AFLP розроблені та протестовані на багатьох видах рослин, а саме: кукурудза [24, 44], картопля [26, 27], томат [31], рис [52], ячмінь [53], арабідопсис [54] тощо.

SSR-маркери (Simple Sequence Repeats, повтори простих послідовностей) – є монолокусними, кодомінантними, відтворюваними ДНК-маркерами, які дають можливість за допомогою ПЛР-аналізу оцінити рівень поліморфізму, обумовленого різною кількістю повторів в мікросателітному локусі. Ділянки ДНК, які розташовані до та після мікросателітного повтору є консервативними та використовуються для дизайну ПЛР-праймерів [55]. Появу мікросателітів в геномі дослідники пов'язують з рекомбінацією ДНК, переміщенням мобільних генетичних елементів, появою місметчів (спарених нуклеотидів) тощо. Вони широко поширені по всьому ядерному геному та можуть розташовуватися як в некодуючих ділянках геному, так і в генах, які кодують білки [56]. Доведена присутність коротких тандемних повторів також в хлоропластному та мітохондріальному геномах, що лежить в основі створення cpSSR [57] та mtSSR ДНК-маркерів [58]. Варто зазначити, що

розроблено ряд алгоритмів для пошуку SSR в геномах організмів, серед них TROLL [59], MISA [60], SSRFinder [61], SciRoKo [62] тощо.

SSR-маркери надзвичайно широко використовуються в генетиці рослин [55, 63]. Вони є ефективним інструментом для генотипування, диференціації геномів різних видів рослин [64, 65], а також господарсько-цінних культур таких як: льон-довгунець [66, 67], кукурудза [68, 69], рис [70], соя [71], пшениця [72, 73], ячмінь [74], томат [75], картопля [26] тощо.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats, міжмікросателітні послідовності) – це ДНК-маркерна система, яка заснована на аналізі ДНК-послідовностей (200–2000 п. н.), локалізованих між двома ідентичними, однак протилежно орієнтованими, мікросателітними повторами на відстані, що дозволяє проведення успішної ампліфікації [76]. В результаті електрофоретичного розділення візуалізуються багато видоспецифічних фрагментів (ISSR-фінгерпринтинг). ISSR-маркери є мільтилокусними, домінантними системами, що не потребують попередньої інформації про цільову послідовність ДНК [22].

ISSR-маркери широко використовуються в генетиці рослин для генотипування, диференціації, вивчення генетичної різноманітності, картування геномів тощо, розроблені для багатьох видів рослин, в тому числі і господарсько-цінних видів [37-39, 77, 78], серед яких: пшениця [79], картопля [26, 80], ячмінь [81, 82], льон [83] тощо.

На сьогодні ще одним потужним джерелом генетичної інформації для створення довільних ДНК-маркерів вважаються мобільні генетичні елементи (ретротранспозони), які притаманні більшості еукаріотичних організмів. Ретротранспозони широко розподілені по всьому геному та займають значну його частину. Зокрема, відомо, що 49-78 % геному кукурудзи складається з ретротранспозонів [84], а також близько 90 % генома пшениці містить повторювані послідовності, з яких 68 % належить мобільним генетичним елементам [85]. За рахунок унікального механізму «copy-and-paste», ретротранспозони здатні змінювати своє місцеположення за рахунок

транскрипції в РНК, зворотної транскрипції та реінтеграції в новий, випадковий сайт геному. Структура та кількість копій ретротранспозонів значно впливає на еволюційну історію геному господаря. Зважаючи на поширеність та гетерогенність цих мобільних генетичних елементів, на їх основі створено ряд ефективних ДНК-маркерних систем, серед яких: IRAP (Retrotransposon Amplified Polymorphism, поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами), REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism, поліморфізм ампліфікованих послідовностей між ретротранспозонами та мікросателітами) тощо [86-88].

Особливий інтерес дослідників викликають ДНК-маркерні системи IRAP та REMAP, які є найбільш широко розповсюдженими представниками молекулярних маркерів на основі ретротранспозонів. IRAP та REMAP мають багато спільних ознак, однак принциповою різницею між ними є те, що в методиці з проведення IRAP-аналізу використовуються два праймери до LTR кінців ретротранспозону (Long terminal repeat), а в REMAP – один праймер відпалюється на LTR, а другий на ділянці мікросателітного повтору [86]. IRAP забезпечує ампліфікацію ділянки ДНК між ретротранспозонами, які розташовані поруч, в той же час, REMAP дозволяє проаналізувати фрагменти геному між ретротранспозоном та найближчим мікросателітом. В результаті проведеного ПЛР-аналізу проводиться розділення та візуалізація утворених видоспецефічних ампліконів в агарозному гелі. IRAP- та REMAP- маркери є полілокусними, гетерогенними і не потребують попередньої інформації про геномні послідовності, саме тому вони є ефективними системами в процесах генотипування та дослідження генетичної різноманітності [89, 90].

IRAP та REMAP-маркери розроблені та протестовані на багатьох рослинних об'єктах, серед яких: ячмінь [91], пшениця [92], картопля [93], кукурудза [94], рис [95] тощо.

Загалом, декілька десятиліть назад саме довільні ДНК-маркери стали пілотними ДНК-маркерними системами, за допомогою яких стало можливим диференціювати різні організми на рівні ДНК. Завдяки своїй

інформативності, універсальності та достовірності отриманих даних, і сьогодні ці ДНК-маркери надзвичайно вживані в різних напрямках сучасних генетичних досліджень рослин.

1.1.2. Ген-специфічні ДНК-маркери

В останні роки розроблено багато нових перспективних ДНК-маркерних систем для молекулярно-генетичного аналізу рослин. В значній мірі це зумовлено трендовим переходом від довільних ДНК-маркерів до ген-специфічних маркерів (GTM) [2, 3, 20]. Стрімкий розвиток методів секвенування ДНК зумовив глобальне збільшення інформації щодо геномних послідовностей різних організмів, яка на сьогодні є загальнодоступною в базах даних. Володіючи чіткими, достовірними даними щодо послідовностей в геномі, пошук ДНК-маркерів, які локалізуються в генах або поруч з ними, став достатньо простим [2].

На сьогодні значна увага генетиків прикута до створення та впровадження нових ген-специфічних маркерних систем (GTM). Основною їх відмінністю від довільних ДНК-маркерів є метод їх розробки [3]. Ген-специфічні маркери можна отримувати з будь-якої послідовності ДНК, що містить поліморфну ділянку, шляхом використання специфічних праймерів для проведення ПЛР. Однак ключовою умовою є наявність розшифрованої цільової послідовності. Як ДНК-маркери потенційно можуть використовуватися як послідовності, в яких закодовані як цільові гени, так і некодуючі ділянки геному [96].

Серед найбільш перспективних ген-специфічних ДНК-маркерних систем можна виділити CDDP (Conserved DNA-derived Polymorphism), яка дозволяє диференціювати організми шляхом аналізу поліморфізму в консервативних генах та генних родинах, для яких характерна багатокопійність в межах геному [97]. Маючи нуклеотидні послідовності генів, можна оцінити наявність функціональних доменів

висококонсервативних ділянок, які притаманні всім представникам генної родини. В CDDP методиці такі функціональні домени використовуються для попереднього дизайну праймерів та як ділянки для подальшого їх відпалу в процесі ампліфікації. В результаті ПЛР утворюються ряд фрагментів, які аналізуються та дозволяють диференціювати різні геноми між собою. CDDP-маркери розроблені для таких функціональних генів як WRKY (кодують транскрипційні фактори рослин) [98], KNOX (гени, що містять гомеобокс, та функціонують як транскрипційні фактори з унікальним гомеодоменом) [99], ABP1 (кодують ауксин-зв'язуючі білки), MADS (кодують транскрипційні фактори рослин, мають MADS-бокс,) [100] тощо. CDDP успішно протестована на рисі [97], пшениці [101] та на декількох інших рослинних об'єктах [102-104].

Ще одна перспективна ген-специфічна ДНК-маркерна система – PBA (Cytochrome P450 based Analogues), яка оцінює поліморфізм аналогів генів цитохрому P450 та ефективно використовується як інструмент для вивчення генетичного різноманіття вищих видів рослин [105]. Родина генів цитохром P450 монооксидаз є чисельною та широко розповсюдженою родиною генів у тварин, рослин, грибів та мікроорганізмів [106]. Зокрема, аналіз геному *Arabidopsis* показав, що близько 272 генів та 26 псевдогенів імовірно є генами цитохрому P450, а це приблизно 0,9 % від всіх закодованих генів [107]. Така поширеність цих генів є значною перевагою PBA-маркерної системи, яка комплексно оцінює поліморфізм P450 генів з використанням специфічних ПЛР-праймерів. Універсальні праймери, що використовуються в PBA-аналізі у різних комбінаціях, підібрані до висококонсервативних ділянок генів P450, а також до ділянки гену, що кодує сайт зв'язування гему (heme-binding site). В результаті ПЛР з PBA-маркерами спостерігається утворення видоспецифічних фрагментів генів P450, подальше розділення яких дозволяє охарактеризувати міжвидову та внутрішньовидову генетичну різноманітність різних видів рослин. PBA-маркерна система протестована на

51 видах рослин із 28 родин, серед яких родини *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Ericaceae*, *Magnoliaceae* тощо [105].

1.1.2.1. Поліморфізм довжини інтронів як джерело ДНК-маркерів

Багатообіцяючим напрямком розробки ген-специфічних ДНК-маркерів є метод оцінки поліморфізму довжини інтронів (Intron Length Polymorphism, ILP) [4, 108]. Як відомо, екзони є найбільш консервативними ділянками генів, оскільки саме тут закодowana інформація про амінокислотний склад протеїнів і будь-яка зміна складу або кількості нуклеотидів потенційно може призвести до негативних наслідків для життєдіяльності клітини. Водночас основна частина геномних мутацій, таких як інсерції, делеції, дуплікації тощо, притаманна інтронам, як некодуючим ділянкам генів [6]. Зважаючи на цей факт, саме вони є гіперваріабельними ділянками і потенційним джерелом поліморфізму, який може бути оцінений за рахунок використання відповідних праймерів. Для створення молекулярно-генетичної маркерної системи, заснованої на оцінці поліморфізму довжини інтронів цільових генів, обов'язковою є наявність попередньої інформації про цільові генні послідовності, а саме кількість екзонів та інтронів, їх нуклеотидний склад, ступінь гомології екзонних ділянок тощо. Ці дані загальнодоступні в чисельних базах даних і є необхідними для підбору та подальшого синтезу праймерів для ПЛР. Специфічною ознакою таких ДНК-маркерів є те, що праймери підбираються до екзонних ділянок генів таким чином, щоб отримати чисельні видоспецифічні копії інтронів. Проведення ПЛР-аналізу та подальшого електрофоретичного розділення фрагментів інтронів генів в агарозному або поліакриамідному гелі дозволяє оцінити довжиний поліморфізм утворених інтронів генів [4].

ПЛР-маркери є специфічними, кодомінантними, нейтральними, гіперваріабельними, дешевими та дозволяють отримувати відтворювані

результати у вигляді специфічних ДНК-профілів, а отже проводити генотипування, ідентифікацію та диференціацію геномів різних видів рослин [4].

Для систематизації та полегшення пошуку розроблених простих ІЛР-маркерів створена онлайн база даних РІР (Potential Intron Polymorphism), в якій загальнодоступна детальна інформація щодо РІР-маркерів та їх взаємозв'язків у різних видів рослин. РІР-маркери являють собою специфічні прості ІЛР-маркери, які створюються через дизайн праймерів до ділянок EST (expressed sequence tags), що являють собою короткі послідовності кДНК, синтезовані з мРНК. Пошук видоспецифічних РІР-маркерів можна здійснити через РІР базу даних, використавши посилання <http://ibi.zju.edu.cn/pgl/pip/> [109].

На сьогодні опублікована велика кількість робіт щодо розробки та впровадження ІЛР-маркерів для аналізу різних господарськоцінних видів рослин, серед яких: рис [4, 110, 111], пшениця [112], томат [113], кукурудза [5] коров'ячий горох (*Vigna unguiculata* L.) [114], могар (*Setaria italica* L.) [115, 116], соя [117], представники родини *Brassicacea* [118] тощо.

1.1.2.2. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну

Однією з найбільш вживаних ІЛР-маркерних систем у рослин вважається ТВР (Tubulin Based Polymorphism) - метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну [7].

Відомо, що β -тубулін разом з α -тубуліном є основною складовою мікротрубочок, що утворюють цитоскелет рослинної клітини та беруть участь у фундаментальних процесах, таких як: поділ клітин, везикулярний транспорт, передача сигналів, утворення клітинної стінки тощо [119, 120]. Багатофункціональність β -тубуліну та його важливість в забезпеченні нормального функціонування клітин передбачає необхідність чіткої первинної амінокислотної послідовності білку. У рослин гени β -тубуліну

об'єднані в одну родину та кодують різні ізоформи білку. Зокрема найбільш охарактеризованими є родини генів β -тубуліну *A. thaliana* та рису, які містять дев'ять та вісім представників відповідно [121, 122]. Структура генів β -тубуліну є консервативною і вони містять по два інтрони розташованих у фіксованих позиціях. Виключеннями є лише гени β -тубуліну кукурудзи *Zea mays*TUB1 і рису *Oryza*TUB2, оскільки містять лише один перший інтрон [123]. Загалом, спостерігається висока консервативність генів β -тубуліну в межах як одного організму, так і між різними організмами.

ТВР-метод проведення комплексної оцінки поліморфізму довжини першого інтрону одночасно всіх генів β -тубуліну, закодованих в геномі рослин [7]. Відомо, що перший інтрон β -тубуліну знаходиться у фіксованій позиції, а саме починається з 397 нуклеотиду після стартового кодону, та його довжина може значно варіювати між різними ізоטיפами генів β -тубуліну. Одночасно перший та другий екзони β -тубуліну є висококонсервативними ділянками генів. Зважаючи на ці факти, був проведений дизайн пари вироджених ТВР-праймерів, які відпалюються на частинах екзонів та в процесі ПЛР забезпечують багатократну ампліфікацію перших інтронів всіх генів β -тубуліну, закодованих в досліджуваному геномі. В подальшому утворені фрагменти розділяються з використанням електрофорезу в агарозному або поліакриламідному гелі [7], або за допомогою капілярного електрофорезу [124].

ТВР-маркери є універсальною маркерною системою, яка дозволяє отримати видоспецифічні ДНК-профілі будь-яких видів рослин. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну використовуються як джерело інформації для генотипування та генетичної диференціації різних видів, сортів та генотипів рослин. ТВР-маркери мають ряд значних переваг, які роблять їх привабливими в порівнянні з іншими популярними маркерними системами, зокрема вони є кодомінантними, мультилокусними, варіабельними, відтворюваними та відносно дешевими [10].

На сьогодні відомі декілька варіацій TBP-методу. Дослідниками був запропонований модифікований метод h-TBP (horse-TBP), в якому використовують для аналізу як I-й, так і II-й інтрон генів β -тубуліну, тим самим збільшуючи диференціюючу здатність методу [125]. Ще однією з варіацій TBP-методу є cTBP – підхід, що дозволяє оцінювати поліморфізм довжини II-го інтрону генів β -тубуліну [126].

На сьогодні, за допомогою TBP-маркерів проведені генетичні дослідження багатьох видів рослин, серед яких представники родів: *Rosa* L., *Brassica* L., *Lotus* L., *Eleusine Gaertn.*, *Coffea* L. [126, 127], *Camelina Crantz.*, [8, 125], *Passiflora* L. [128] тощо. Проаналізовано генетичне різноманіття сортів господарськоцінних культур, таких як: пшениця, ячмінь [129], льон [9, 130], виноград [11]. Досліджений поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну в природних популяціях *Ae. biuncialis* [131] та *Deschampsia antarctica* Desv. [132]. Досліджено поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну таких видів як *Quercus robur* L., *Fagus* L., *Ulmus* L., *Betula* L., *Acer* L., *Picea* D. Don ex Loudon, *Pinus* L [133].

Загалом TBP-маркери на сьогодні є одними з найпоширеніших серед ПЛР-маркерних систем. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну представлений як універсальний, інформативний та надійний інструмент для проведення різноманітних генетичних досліджень рослин.

1.1.3. Використання ДНК-маркерів в генетиці рослин

Молекулярні маркери, або ДНК-маркери, є незамінним інструментом в різноманітних генетичних дослідженнях [3, 18]. Доступність різноманітних генетичних баз даних, покращення умов проведення ПЛР, секвенування, розділення та візуалізація продуктів ампліфікації тощо, сприяє впровадженню нових ДНК-маркерів як надійного інструменту у вирішенні різноманітних генетичних завдань. На сьогодні ДНК-маркерні системи широко використовуються в популяційній генетиці, філогенетиці,

порівняльній геноміці, молекулярній екології, біології розвитку тощо [3]. Серед найбільш поширених напрямків використання ДНК-маркерних систем є генотипування, ідентифікація та оцінка генетичної різноманітності різних сортів та популяцій рослин [1, 89]. ДНК-маркери доцільно використовувати для встановлення гаплоїдності утворених гібридів та ліній [134, 135], а також для дослідження еволюції та філогенетичних зв'язків між окремими рослинними групами.

На сьогодні створення генетичних карт геномів різних видів рослин є одним з провідних напрямків використання ДНК-маркерів. Генетичне картування передбачає ідентифікацію локусу, в якому закодований ген, встановлення відстані між окремими генами, розташованими на хромосомах [1]. На таких молекулярно-генетичних картах відображені важливі гени, що відповідають за розвиток, морфологічні ознаки, стійкість до захворювань тощо [18]. ДНК-маркери є ключовими ланками в картуванні локусів кількісних ознак (Quantitative Trait Loci (QTL)), яке полягає в аналізі ділянок геному, що містять гени пов'язані з проявом певних корисних ознак [136, 137]. Відомо, що більшість господарсько-цінних ознак рослин наслідуються полігенно та знаходяться під контролем багатьох генів, розташованих в QTL-локусах. Детальні QTL-карти в подальшому використовуються для проведення маркер-допоміжної селекції (Marker-Assisted Selection, MAS) [136]. Часто саме RFLP, AFLP, ISSR, SSR-маркери використовуються для створення карт геномів рослин [21].

Надзвичайно перспективним напрямком використання ДНК-маркерів є MAS-селекція. Селекція рослин відіграє ключову роль в прагненнях дослідників збільшити виробництво продуктів харчування. Тому надзвичайно актуальним питанням є створення нових, більш продуктивних сортів господарськоцінних видів, які б володіли рядом корисних ознак. До таких ознак належать продуктивність, стійкість до захворювань, стійкість до абіотичних факторів, таких як посуха, засоленість ґрунтів тощо [138, 139]. MAS-селекція являє собою особливий підхід в сучасній селекції, який

дозволяє проводити відбір рослин по генотипу з використанням ДНК-маркерів [140]. Загалом MAS-стратегія полягає в ідентифікації алеля гену, що відповідає за прояв певної корисної ознаки, подальшого підбору відповідних ДНК-маркерів, алелі якого тісно зчеплені з селекційним геном та подальшого відбору цільових генотипів. Велика точність відбору досягається за рахунок використання декількох маркерів, розташованих поруч з цільовим геном. ДНК-маркери, які тісно пов'язані з цільовим геном, дозволяють достовірно спрогнозувати фенотип відібраних рослин. У випадку, коли наявний повний сіквенс гену інтересу та визначені послідовності його алелей, можливо розробити внутрішньогенні ДНК-маркери для точнішого відбору генотипів. У випадку відсутності внутрішньогенного або зчепленого з геном ДНК-маркеру доцільно використати більш віддалені маркери та поєднати MAS з подальшим фенотипуванням рослин. Такий комбінований підхід називається маркер-направленим фенотипуванням (Marker-directed phenotyping) [18, 141]. Окрім того, QTL-карти ділянок геному, в яких закодовані гени, що відповідають за фенотипічний прояв певних корисних ознак, є корисним інструментом в процесі проведення MAS-селекції для розробки нових сортів з конкретними алельними комбінаціями [142]. Залучення маркерних систем значно забезпечує підвищення ефективності та точності селекції рослин, прискорює селекційні процеси, покращує якість відібраного матеріалу та дозволяє виокремлювати організми або лінії, які несуть цільові гени [143, 144].

Одними з найбільш поширених ДНК-маркерів, що використовуються в MAS-селекції є SSR-маркери. Зокрема SSR-маркери використовуються для селекції сортів пшениці зі стійкістю до фузаріозу [145], до бурої та стеблової іржі [146, 147], сортів кукурудзи з підвищеним вмістом лізину та амілопектину в ендоспермі [148], ячменю зі стійкістю до смугастої іржі [149], сортів рису з толерантністю до засолення ґрунтів [150] та зі стійкістю до пірікуляріозу [151] тощо. Також RFLP, ALFP, RAPD-маркери використовуються в MAS-селекції для створення високопродуктивних сортів

ячменю [152, 153], кукурудзи [154], сортів рису, стійких до бактеріальної п'ятнистості [155], ячміню зі стійкістю до вірусу жовтої мозаїки [156] тощо.

Загалом ДНК-маркери всебічно використовуються у різних галузях біології та є незамінними інструментами в сучасних молекулярно-генетичних дослідженнях. Саме тому пошук більш інформативних та надійних ДНК-маркерних систем, які здатні достовірно виявляти відмінності між генотипами різних рослинних організмів, є актуальним питанням, яке потребує подальшого вирішення. Зважаючи на це з метою розробки нових ПР-маркерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів для генотипування та диференціації рослин було обрані гени актину, як гени високо консервативного білку.

1.2. Організація генів актину та їх інтронів у рослин

Актин – це глобулярний білок, присутній у всіх еукаріотичних клітинах та є одним із основних білків цитоскелету. Актин є невід'ємною складовою мікрофіламентів, які виконують ряд важливих функцій, а саме: ріст та поділ клітин, підтримка форми та полярності, забезпечення внутрішньоклітинного транспорту та везикулярного транспорту при ендоцитозі тощо [157]. Актин представлений в рослинних клітинах різними ізоформами, які відрізняються між собою за структурою, функціями, тканино-специфічністю та механізмами регуляції експресії. Всі гени, що кодують актин в рослинному геномі, відносять до великої мультигенної родини актинів. Число генів актину у різних видів рослин значно варіює. Окрім того, загальна кількість ізотипів актину, закодованих в геномі, частково відображає складність відповідного рослинного організму. Наприклад, червоні водорості містять два ізотипи актину [158], також по два ізотипи актину знайдені у зелених водоростей *Chlamydomonas* and *Volvox* [159]. Більш складно організовані рослини, до яких відносять голонасінні та мохи, зазвичай кодують близько 7–11 різних актинів [160, 161]. Покритонасінні рослини в середньому містять

близько 10 різних ізотипів генів актину. Зокрема в геномах сорго (*Sorghum bicolor* L.) закодвано 10 генів актину, маніока (*Manihot aesculenta* Crantz) – 11 генів, тополі (*Populus trichocarpa* Torr. & A.Gray) – 9 генів. Наприклад кукурудза (*Z. mays* L.) має 21 ізотипи генів актину, хоча деякі з них є псевдогенами. Також велика кількість генів актину виявлена у геномі петунії (*Petunia* JUSS.), а саме більше 100 генів. Найімовірніше така кількість генів утворилася в результаті дуплікації окремих частин хромосом, що містили гени актину. На сьогодні достовірно невідома кількість активних генів актину та псевдогенів у петунії [162].

На відміну від рослин, більшість тваринних організмів мають менше 10 генів актину в геномі. Зокрема у птахів та ссавців закодвано 6 різних генів актину, що кодують 6 різних ізоформ білку [163]. В порівнянні з тваринами, рослинні актинові гени є більш диверсифікованою та складною родиною генів. Оскільки кількість рослинних актинових генів збільшується разом зі збільшенням складності тканин, можна припустити, що більш складні рослинні організми у складних тканинах потребують більш різноманітні актини. Проте, також і інші фактори сприяють розвитку складності родини генів актину у рослин, серед яких поліплоїдизація геномів, дуплікації окремих частин хромосом, гібридне видоутворення тощо [164].

Одними з найбільш досліджених є гени актину, що закодвані в геномі *A. thaliana*, як одного з модельних об'єктів в генетиці рослин та в біології загалом. Родина генів актину *A. thaliana* складається з 10 генів актину (*act*), вісім з яких кодують функціонально-активні білки актину, що містять 376 амінокислот, а два гени (*act5* та *act9*) є псевдогенами. Проведений філогенетичний аналіз показав, що всі гени актину *A. thaliana* поділяються на два класи: вегетативні та репродуктивні. Окрім того, вісім ізотипів генів актину поділяються на п'ять підкласів. До вегетативного класу актинів відносяться *act7*, *act11* та *act2/8* підкласи, в той час як репродуктивний клас складається з двох підкласів, а саме *act1/3* та *act4/12* [14]. Гени актину *act5* та *act9* вважаються псевдогенами, хоча було показано, що ці гени все ж таки

експресуються виключно в ендоспермі, однак їх функціональні особливості потребують подальших досліджень [165].

Дослідження генів актину у рослин та, зокрема, на прикладі *A. thaliana*, показали, що їх структура є високо консервативною. Загалом, кодуючі послідовності генів містять по чотири екзони, що розділені трьома інтронами. Інтрони в генах актину знаходяться у чітко фіксованих позиціях. Зокрема, інтрон 1 гену актину розташований між 20 та 21 кодоном, інтрон 2 розділяє кодон 151, а інтрон 3 локалізується між 356 та 357 кодонами. Виключенням у *A. thaliana* є лише ген актину *act2*, в якому відсутній I інтрон. На обох кінцях всіх генів актину розташовані 5' UTR (близько 120 п. н.) та 3' UTR (близько 180 – 220 п. н.) нетрансльовані області, які у складі мРНК не є матрицею для синтезу амінокислотної послідовності білку, однак містять ряд регуляторних послідовностей та беруть участь у регуляції трансляції, локалізації, деградації мРНК тощо. Окрім того, 5' UTR нетрансльована область гена актину містить один лідируючий некодуючий екзон та інтрон, які відіграють ключову роль в регуляції експресії генів актину [166, 167]. Зокрема проведені експерименти, в яких у репродуктивному гені актину *act1* замінювали лідируючий інтрон на лідируючий інтрон вегетативного гену *act2*. Варто зазначити, що ці гени актину є еволюційно віддаленими та експресуються у різних тканинах. Такі заміни лідируючого інтрону в гені *act1* призвели до збереження експресії, але тільки у вегетативних тканинах, та повної відсутності у зрілому пилку [167]. 5' UTR (нетрансльована область) кожного гену актину має сайт ініціації транскрипції, а у деяких генів актину таких сайтів декілька (у *act1* – три, *act7* – два) [14]. Також в даній ділянці всіх генів актину розташований ТАТА-бокс. Окрім того, у 5' UTR-області гена *act7* містяться ряд гормон-чутливих консервативних елементів, серед яких ауксин-, гіберелін-чутливі елементи та елемент, чутливий до абсцизової кислоти. Ці елементи дозволяють регулювати експресію *act7* відповідно до гормональних стимулів [168]. Більшість генів актину *A. thaliana*, окрім *act2*

та *act8*, мають консенсусний елемент поліаденілювання ААТAAA у 3' UTR нетрансльованій області.

Екзон-інтронна структура генів актину *A. thaliana* консервативна, однак є певні відмінності в нуклеотидному складі окремих ізотипів генів актину. Білки, що кодуються генами актину *act1* та *act3*, мають ідентичні амінокислотні послідовності, в той час як підкласи актину *act2/8* та *act4/12* відрізняються лише однією амінокислотою. Різниця між нуклеотидними послідовностями цих пар генів актину складає близько 9 – 12 %. Загалом, відмінність у нуклеотидному складі генів актину у *A. thaliana* складає близько 22 %. Також, якщо порівнювати відмінність амінокислотного складу, то 8 актинів *A. thaliana* відрізняються лише на 0.3 – 8.8 %, серед яких найбільш віддаленими є білки генів актину *act2* та *act4*, які містять 33 різні амінокислоти [165].

Загалом всі репродуктивні гени актину *A. thaliana* (*act1/3*, *act4/12*, *act11*) реалізуються у репродуктивних тканинах рослин, в той час як вегетативні гени актину (*act2/8*, *act7*) – у вегетативних тканинах. *act1* та *act3* експресуються під час формування плодолистиків та яйцеклітин, розвитку квіткової меристеми та у зрілому пилку [14]. Гени *act4* та *act12* одночасно реалізуються у молодих судинних тканинах, тапетумі, у пилку, також *act12* виявляється в перициклі при ініціації бічного кореня. *act11* є чітко репродуктивним актином з сильною експресією в зрілому пилку, яйцеклітинах, ембріоні, ендоспермі тощо [169]. Ген актину *act2* та *act8* реалізуються у всіх вегетативних тканинах рослини, хоча *act8* має значно слабшу експресію в порівнянні з *act2*. Ген *act7* виявляється у всіх молодих вегетативних тканинах, гіпокотелях тощо.

Загалом, гени актину є висококонсервативними генами, що кодують білки, які є ключовим елементом мікрофіламентів клітини. Зважаючи на сталу екзон-інтронну структуру, потенційно ці гени можуть бути використані для подальшої розробки ІЛР ДНК-маркерів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Науково-дослідну роботу проводили протягом 2015-2018 років у відділі геноміки та молекулярної біотехнології і у відділі популяційної генетики Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (м. Київ, Україна).

2.1. Біоінформатичний пошук та аналіз генів актину закодованих в геномах *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*

Повні анотовані послідовності генів актину різушки Таля (*A. thaliana*) були взяті з бази даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), їх анотовані послідовності білка – з бази даних UniProt (www.uniprot.org/). Використовуючи он-лайн інструмент BLASTN версії 2.2.26+, був проведений пошук в базі даних Phytozome v 9.1 (www.phytozome.net) [170] на предмет наявності потенційних генів актину в геномах рису посівного (*O. sativa*), льону-довгунця (*L. usitatissimum*), картоплі (*S. tuberosum*), томату звичайного (*S. lycopersicum*). Як матриця для пошуку таких генів актину була використана повна анотована послідовність гену актину *act1* *A. thaliana*. Даний тип пошуку передбачає пошук на основі порівняння заданих нуклеотидних послідовностей з трансльованою у амінокислотні послідовності базою даних нуклеотидів. Для цього було використано налаштування програми BLASTN за замовчуванням. Відбір послідовностей проводився на основі відсоткових показників ідентичності, а також на основі повноти амінокислотних продуктів трансляції.

Для множинного вирівнювання кодуєчих областей (екзонів) гомологічних послідовностей, а також їхніх поліпептидних продуктів була

використана програма Clustal X 2.0 [171]. Ступінь ідентичності кодуєчих ділянок генів актину та їх трансльованих амінокислотних послідовностей визначили за допомогою програми UGENE [172]. 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 [173] та онлайн-інструменту Oligo Analyzer V. 3.1. 1. (www.idtdna.com/calc/Analyzer/).

2.2. Рослинний матеріал

Під час роботи було оцінено поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних видів однодольних та дводольних рослин. Зокрема, серед однодольних проаналізовано представників родини *Poaceae*, а серед дводольних – види родин *Linaceae*, *Solanaceae* та *Brassicaceae*.

Проаналізовано 7 сортів м'якої ярої пшениці (*T. aestivum*) ('Черемшина', 'Елегія', 'Етюд', 'Х 12', 'Retown', 'Недра' та 'Selkirk'); 29 сортів ячменю звичайного (*H. vulgare*) вітчизняної селекції, а саме: 'Паллідум 32', 'Медікум 46', 'Одеський 9', 'Одеський 14', 'Одеський 18', 'Южний', 'Степовий', 'Нутанс 106', 'Південний', 'Гетьман', 'Оболонь', 'Чудовий', 'Чарівний', 'Чорноморець', 'Нутанс 244', 'Славутич', 'Одеський 70', 'Нутанс 518', 'Незалежний', 'Едем', 'Престиж', 'Одеський 131', 'Итиль', 'Одеський 82', 'Одеський 69', 'Одеський 36', 'Романтик', 'Тайфун' та 'Одеський 115', які люб'язно надані Інститутом захисту рослин Національної академії аграрних наук України (м. Київ, Україна) та особисто к.б.н. І.О. Созіновим.

Оцінено поліморфізм довжини інтронів генів актину у сортів рису (*O. sativa*): 'УР-4970', 'УР-4558', 'Лазурит', 'Віконт', 'Преміум', 'Консул', які люб'язно надані Інститутом рису Національної академії аграрних наук України (с. Антонівка, Україна).

Був оцінений поліморфізм довжини інтронів генів актину 14 природних популяцій егілопсу двухдуюмового (*A. biuncialis* Vis.), які зібрані на території півострову Крим (Україна), а саме: НК 010, НК 11-2, НК 13-1, НК 10-3, НК 14-12 (г. Кара-Даг), НК В1-1 (с. Піщане), НК ММ7-3, НК ММВ-1, НК 1-І, НК ММ2-1 (Мис Март'ян), НК 6-2, НК 4N2 (с. Берегове), НК ОZ-2 (г. Аю-Даг), НК 02 (місцеположення невідоме). Зразки люб'язно надані Інститутом захисту рослин Національної академії аграрних наук України (м. Київ, Україна) та особисто к.б.н. Н.О. Козуб та к.б.н. І.О. Созіновим.

Досліджено два окремі види льону: льон вузьколистий (*L. angustifolium*) і льон дворічний (*L. bienne*). Оцінено поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних сортів льону-довгунця (*L. usitatissimum*). Аналізували 10 сортів льону різної селекції, а саме сорти 'Зенга' (Нідерланди), 'Ескаліна' (Бельгія), 'Електра' (Бельгія), 'Глазур' (Україна), 'Світанок' (Україна), 'Антей' (Росія), 'Светоч' (Росія), 'Л-1120' (Росія), 'Хейя 13' (Китай), 'Хейя 15' (Китай), наявні в колекції Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України (м. Київ, Україна).

Проаналізовано 16 сортів льону-довгунця української селекції, які люб'язно надані Інститутом луб'яних культур Національної академії аграрних наук України (м. Глухів, Україна), а саме: сорти 'Есмань', 'Чарівний', 'Зоря 87', 'Сіверський', 'Каменярь', 'Журавка', 'Глухівський ювілейний', 'Іванівський', 'Вручий', 'Глазур', 'Рушничок', 'Гладіатор', 'Надія', 'Глобус', 'Глінум'. Детальна інформація про походження сортів льону-довгунця наведена в Табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Сорти льону-довгунця української селекції

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

*ДСЛК – Дослідна станція луб’яних культур Інституту сільського господарства Північного Сходу Національної академії аграрних наук України

Також, досліджено 12 білоруських ландрас льону-довгунця, які люб'язно надані Інститутом генетики і цитології Національної академії наук Білорусі (м. Мінськ, Білорусь) та особисто В.О. Лемеш, серед них: 'К-790', 'К-5330', 'К-5455', 'К-5451', 'К-5460', 'К-5992', 'К-603', 'К-604', 'К-5990', 'К-6601', 'К-37', 'К-7236'.

Досліджено 12 сортів томату (*S. lycopersicum*): 'Money Maker', 'Перлина', 'Волгоградський', 'Балконне Чудо золоте', 'Де Барао чорний', 'Тарасенко рожевий', 'Ефемер', 'Шапка Мономаха', 'Валютний', 'Американський Синій', 'Золотий Горіх' та 'Де Барао рожевий'. Оцінено поліморфізм довжини інтронів генів актину у 4 сортів картоплі (*S. tuberosum*), а саме: 'Зарево', 'Світанок', 'Левада' та 'Вернісаж'. Матеріал наявний в колекції Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України (м. Київ, Україна).

Досліджено міжвидові гібриди ріпаку олійного (*B. napus*) з деякими дикорослими видами родини *Brassicaceae*, а також їх батьківські форми. Серед них лінії ріпаку, отримані раніше шляхом примусового схрещування в умовах теплиці між трансгенними лініями ріпаку (*B. napus* L. var. *Oleifera annua*) MS1 x RF1 (ACS-BN004-7xACS-BN001-4) та MS1 x RF1 (ACS-BN004-7 x ACS-BN002-5) компанії Bayer CropScience зі стійкістю до глюфосинату (геноми трансгених рослин містили *Bar*-ген та *NOS*-термінатор), а також деякі дикорослі види родини *Brassicaceae* (рогачка мілова (*Erucastrum cretaceum* Kotov.), дворядник тонколистий (*Diplotaxis tenuifolia* L.) та гірчиця сиза (*Brassica juncea* L.), які наявні в колекції Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України (м. Київ, Україна). Інформація про досліджені лінії ріпаку та міжвидові гібриди наведена в Табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Введені в культуру *in vitro* лінії ріпаку та гібриди, які отримані в результаті схрещування ($\text{♀P}_1 \times \text{♂P}_2$) ліній ріпаку олійного (*B. napus*) і дикорослих видів родини *Brassicaceae*

Гібриди <i>Brassica napus</i> ($\text{♀P}_1 \times \text{♂P}_2$)	Покоління
<i>B. napus</i> L. ssp. ol. PHS-97-460 (B. n. 2)	Вихідний матеріал
<i>B. napus</i> L. ssp. ol. PHS-97-515 (B. n. 4)	Вихідний матеріал
<i>B. napus</i> L. ssp. ol. PHS-97-579 (B. n. 5)	Вихідний матеріал
<i>E. cretaceum</i> × <i>B. n. 5</i>	F ₁
<i>E. cretaceum</i> × <i>B. n. 4</i>	F ₁
(<i>E. cretaceum</i> × <i>B. n. 4</i>) × (<i>E. cretaceum</i> × <i>B. n. 4</i>)	F ₂
<i>D. tenuifolia</i> × <i>B. n. 5</i>	F ₁
<i>B. juncea</i> × <i>B. n. 2</i>	F ₁
<i>B. juncea</i> × <i>B. n. 4</i>	F ₁

2.3. Виділення рослинної ДНК

Тотальну ДНК виділяли з використанням ЦТАБ-методу [174, 175] з певними методичними доповненнями.

Як рослинний матеріал використовували проростки, насіння або листки. Тканину масою 250-300 мкг переносили в мікропробірку, заливали рідким азотом та розтирали до порошкоподібного стану, використовуючи песту. Додавали 350 мкл лізуючого буферу з 2х ЦТАБ (1,4 М NaCl, 20 мМ Na₃EDTA, 100 мМ Трис-НСl, 2 % ЦТАБ, рН 8,0) та інкубували при 65°C протягом 1 год з використанням термостату. Після інкубації суміш центрифугували 10 хв при 14 500 об/хв в мікроцентрифузі «Centrifuge 5415» (Eppendorf, Німеччина). Утворений супернатант переносили в нові мікропробірки, додавали 500 мкл суміші хлороформ:ізопропіловий спирт

(24:1) та перемішували до утворення суспензії з подальшим центрифугуванням протягом 10 хв при 14500 об/хв (мікроцентрифуга «Centrifuge 5415» (Eppendorf, Німеччина)). Далі переносили близько 450 мкл водної фази до нових мікропробірок та додавали 50 мкл розчину з 5 x ЦТАБ (5 %-ний ЦТАБ, 350 мМ EDTA, рН 8,0) з подальшим термостатуванням протягом 10 хв при 65°C в термостаті. Після інкубації до розчину додавали 300 мкл хлороформу, ретельно перемішували та центрифугували 10 хв при 14500 об/хв в мікроцентрифузі «Centrifuge 5415» (Eppendorf, Німеччина). Близько 400 мкл надосадової рідини переносили в чисті мікропробірки та додавали рівний об'єм буферу для преципітації з подальшим перемішуванням та інкубацією від 1 до 12 год при кімнатній температурі. Після 10 хвилинного центрифугування суміші при 16000 об. та 4 °С на центрифюзі «Centrifuge 5415» (Eppendorf, Німеччина), супернатант видаляли, а утворений осад розчиняли у 300 мкл 1,2 М NaCl. Після цього, додавали 300 мкл хлороформу, перемішували та центрифугували 15 хв на центрифюзі при 16000 об/хв та 4 °С. Утворену водну фазу переносили в нові мікропробірки, додавали 150–200 мкл ізопропілового спирту. Після центрифугування протягом 10 хв на центрифюзі «Centrifuge 5415» (Eppendorf, Німеччина) при 16000 об/хв та 4°C, утворювався осад з геномної ДНК, який промивали в 70 % етиловому спирті. Залишків спирту позбувалися шляхом просушування осаду з ДНК за допомогою термостату. Осад розчиняли в 30 мкл бідистильованої води та зберігали зразки ДНК при – 20°C.

Концентрацію та чистоту отриманого генетичного матеріалу перевіряли спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» (США), а також з використання електродифузії в 6 %-ному агарозному гелі.

2.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Спираючись на дані, отримані в результаті біоінформатичного пошуку та аналізу генів актину в геномах вищих видів рослин, для оцінки

поліморфізму довжини інтронів генів актину були розроблені чотири пари праймерів. Зокрема, три пари праймерів, що є специфічними та оцінюють поліморфізм довжини II-го інтрону в окремих генах актину, закодованих в геномі льону-довгунця, зокрема Lus10016259 та Lus10040826. Зважаючи на надзвичайно високу консервативність екзонних ділянок генів актину в місцях відпалу праймерів, пара праймерів Lus виявляє поліморфізм довжини інтронів інших генів актину (Lus10021057 та Lus10029286) одночасно. В Табл. 2.3 наведені послідовності праймерів, використаних у дослідженні.

Для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у різних видів вищих рослин, спираючись на результати біоінформатичного пошуку та екзон-інтронового аналізу генів актину, синтезовані універсальні виродженні праймери ActIn (Табл. 2.3).

Таблиця 2.3

**Праймери для оцінки поліморфізму довжини інтронів
генів актину за допомогою ПЛР**

Назва праймеру	Послідовність 5'--> 3'	Кількість нуклеотидів (п. н.)	Температур а 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	F: GGA TGA CAT GGA GAA AAT CTG GCAT	25	63
	R: GAG TTG TAC GTG GTC TCG TGG AT	23	63

Окрім того, в межах дослідження внутрішньосортової гетерогенності сортів льону-довгунця української селекції, були використані два SSR-маркера LU 7 та LU 21, раніше описані в літературі [67]. Мікросателітний локус LU 7 аналізували з використанням праймерів:

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

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

Алельний стан мікросателітного локусу LU 21 оцінювався за допомогою праймерів:

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 за допомогою ПЛР 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).

З праймерами (в тому числі виродженими) для виявлення поліморфізму довжини інтронів 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 Lus1004082 – 64 °C) – 45 с, елонгація 72 °C – 1 хв), фінальна елонгація 72 °C – 7 хв, 10 °C – утримання.

Для SSR-праймерів 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, подовження 72 °C – 1 хв), фінальна елонгація 72 °C – 7 хв, 10 °C – утримання [67].

З метою виключення утворення продуктів неспецифічної ампліфікації кожен ПЛР проводили щонайменше в триразовій повторності.

2.5. Розділення фрагментів ДНК за допомогою електрофору в поліакриламідному гелі

Розділення продуктів ПЛР проводили з використанням вертикального електрофору в 6 %-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі

(ПААГ) в однократному TBE-буфері з певними методичними змінами [176]. Для виготовлення 40 мл 6 %-го ПААГ використовували 2,32 г акриламід, 0,08 г бісакриламід, 4 мл десятикратного TBE буферу (0.89M Трис, 0.89M H_3BO_3 , 2 mM EDTA pH 8,0). Об'єм розчину доводили бідистильованою водою.

Для розділення фрагментів в ПААГ використовували запатентований прилад для вертикального гель-електрофорезу [177]. Для цього корпус приладу, спейсери, гребінка та зовнішні скельця ретельно вимивалися, протиралися етанолом та фіксувалися затискувачами в правильному положенні. Між корпусом приладу та зовнішнім скельцем утворюється камера для ПААГ, ширину та товщину якої можна варіювати використовуючи спейсери та гребінки різної товщини. В нижній частині утвореної камери для ПААГ розміщували гніт з фільтрувального паперу та заливали 5 мл розчину ПААГ, попередньо додавши 100 мкл 10 % персульфату амонію (ПСА) та 20 мкл тетраметилетилендіаміна (TEMED) для ініціювання полімеризації. Через 1 хв після полімеризації гелевої пробки, заливали 35 мл робочого ПААГ з додаванням 400 мкл 10 % ПСА та 20 мкл TEMED та встановлювали гребінку для формування комірок. Час полімеризації гелю залежить від температури, тому в разі необхідності прискорення цього процесу, прилад переносили в термостат з температурою 37 – 40 °С. Після закінчення полімеризації гребінки виймалися з гелю та утворені лунки промивалися 1x TBE буфером. Продукти ПЛР наносили по 1 мкл в лунку. Для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину електрофорез проводили протягом 3 год та для оцінки алельного складу мікросателітних повторів – 1,5 год за напруги 390 В в однократному TBE буфері.

Для подальшого визначення довжини фрагментів, що містили інтрони генів актину та алелів мікросателітів, використовували ДНК-маркер 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).

2.6. Візуалізація фрагментів ДНК в поліакриламідному гелі

Фрагменти, розділені в ПААГ, візуалізували шляхом фарбування нітратом срібла [178]. Після закінчення електрофорезу ПААГ переносили в кювету та промивали 300 мл бідистильованої води. Після промивання додавали 250 мл розчину 10% етанолу та 0,5% оцтової кислоти при температурі 10-12 °С, накривали склом та інкубували протягом 3 хв на шейкері. В подальшому гель заливали 250 мл розчином азотнокислого срібла (0,15% AgNO_3 , 0,08% формаліну) та інкубували 5-6 хв при кімнатній температурі помішуючи. Зливши другий розчин, гелеву пластину промивали бідистильованою водою не менше двох разів, після чого заливали 250 мл третього розчину (1,5% NaOH , 0,08% формаліну). Інкубування проводили протягом 5-7 хв на шейкері до появи чітко забарвлених фрагментів ДНК в гелі. Після фарбування третій розчин зливали та протягом 1-2 хв обробляли гель 5 % льодяною оцтовою кислотою для зупинки фарбування та на завершення заливали бідистильованою водою.

Пофарбовані гелі фотографували у видимому світлі з використанням цифрової фотокамери Olympus XZ-1. Зображення аналізували за допомогою програми GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>).

2.7. Статистична обробка даних

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 [179].

ДНК-профілі, які утворилися в результаті оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, а також в результаті використання SSR-маркерів обраховувалися для кожної пари праймерів лише враховуючи чіткі та відтворювані фрагменти.

Варто зазначити, що при розрахунку PIC замість частот алелів, використовувався показник частоти алельних фенотипів (унікальний розподіл та кількість фрагментів в ДНК-профілі). Це пов'язано зі складністю визначення частот алелів при обрахунку даних, які утворюються в результаті використання методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.

РОЗДІЛ 3

БІОІНФОРМАТИЧНИЙ ПОШУК ТА АНАЛІЗ ГЕНІВ АКТИНУ У ВИЩИХ РОСЛИН

Розроблення методу, який дозволить оцінити поліморфізм довжини інтронів генів актину, передбачає наявність достовірної інформації про нуклеотидні послідовності генів актину вищих рослин та їх екзон-інтронну структуру, ступінь гомології тощо. Для дослідження було обрано п'ять як однодольних, так і дводольних видів рослин, серед яких різушка Таля (*A. thaliana*), рис посівний (*O. sativa*), льон-довгунець (*L. usitatissimum*), томат звичайний (*S. lycopersicum*), картопля (*S. tuberosum*). Обрані види є модельними об'єктами в молекулярно-генетичних дослідженнях, а також господарсько-цінними видами, що представляють практичний інтерес для сучасних селекційних досліджень. Варто зазначити, що їх геноми повністю секвеновані. Геном *A. thaliana* ($2n=10$ хромосом) є найбільш дослідженим серед вищих рослин. Дані щодо його повного секвенування опубліковані ще у 2000 році [180]. Рис (*O. sativa*) – є однією з найбільш поширених харчових культур у світі та представляє практичний інтерес для генетичних досліджень, оскільки має невеликий диплоїдний геном ($2n$) з 12 хромосом, який також був секвенований у 2000 році [181]. У 2012 році представлені результати секвенування повного геному льону-довгунця (*L. usitatissimum*), що є диплоїдом ($2n=30$ хромосом) [182]. Геном томату (*S. lycopersicum*) – диплоїдний, містить 24 хромосоми ($2n=24$) та був повністю опублікований у 2012 році [183]. Геном картоплі (*S. tuberosum*) – тетраплоїдний ($4n=48$ хромосом) [184] та був секвенований у 2011 році [185]. Оскільки геном *A. thaliana* є одним з найбільш досліджених, то в геномних базах даних присутні анотовані послідовності генів актину з відомою екзон-інтронною структурою, а щодо інших видів, така інформація або неповна, або повністю відсутня. Саме з цією метою був проведений пошук та аналіз генів актину,

що закодовані в геномах видів *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*.

3.1. Біоінформаційний пошук генів актину в геномах представників однодольних та дводольних рослин

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* (Рис. 3.1). Ці послідовності генів актину *A. thaliana* було використано в подальших дослідженнях.

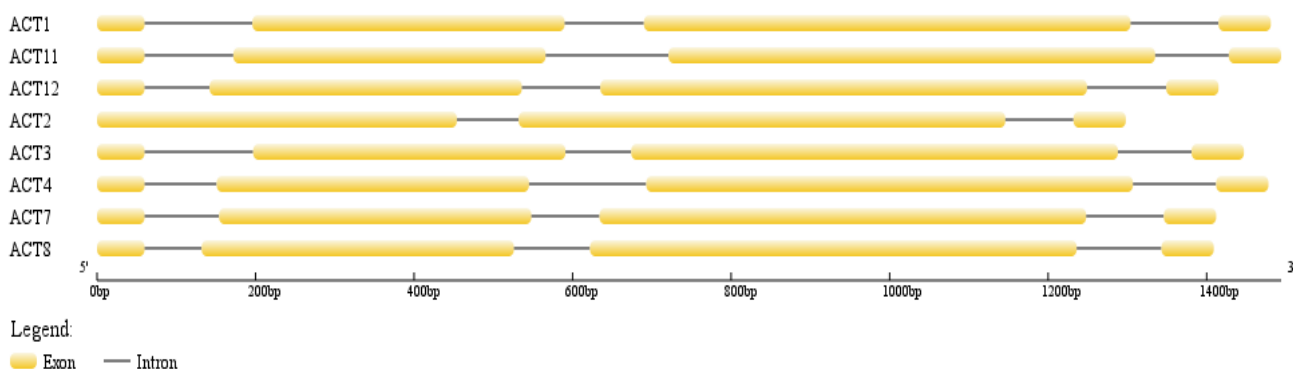


Рис. 3.1. Екзон-інтронна структура генів актину *A. thaliana*.

Також був проведений біоінформатичний пошук генів актину в геномах *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* з використанням бази даних Phytozome v 9.1 [170].

В результаті пошуку в геномі *O. sativa* знайдено 9 нуклеотидних послідовностей генів актину (Рис. 3.2): LOC_Os03g61970, LOC_Os03g50885, LOC_Os11g06390, LOC_Os01g73310, LOC_Os05g36290, LOC_Os05g01600, LOC_Os10g36650, LOC_Os12g06660, LOC_Os01g64630.

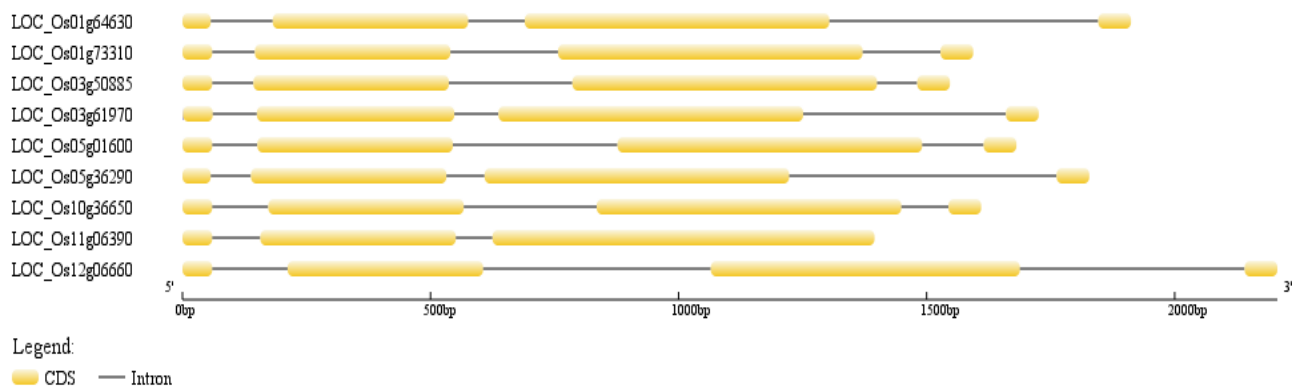


Рис. 3.2. Екзон-інтронна структура генів актину *O. sativa*.

В геномі *L. usitatissimum* виявлено 15 генів актину (Рис. 3.3):
 Lus10005163, Lus10006783, Lus10006784, Lus10005819, Lus10005820,
 Lus10029286, Lus10004169, Lus10021057, Lus10016259, Lus10016558,
 Lus10005457, Lus10001694, Lus10040826 Lus10004956, Lus10001693.

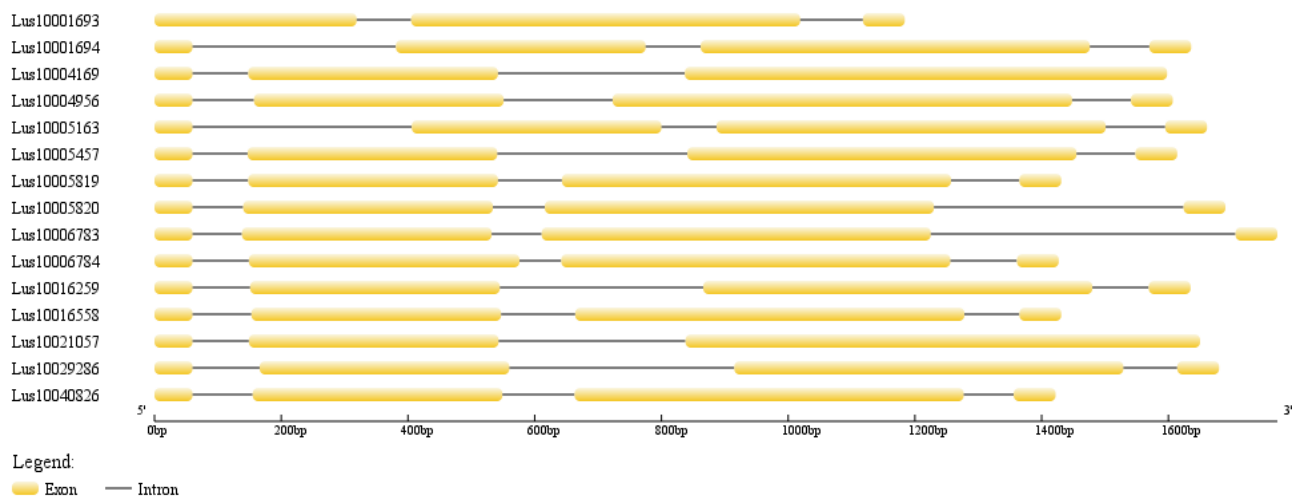


Рис. 3.3. Екзон-інтронна структура генів актину *L. usitatissimum*.

В геномі *S. tuberosum* відібрано 11 послідовностей генів актину (Рис.3.4):
 PGSC0003DMG400003985, PGSC0003DMG400000439,
 PGSC0003DMG400018449, PGSC0003DMG400027746,
 PGSC0003DMG400023708, PGSC0003DMG400019204,
 PGSC0003DMG400008912, PGSC0003DMG400036865,

PGSC0003DMG400029121,
PGSC0003DMG400008618.

PGSC0003DMG400008619,

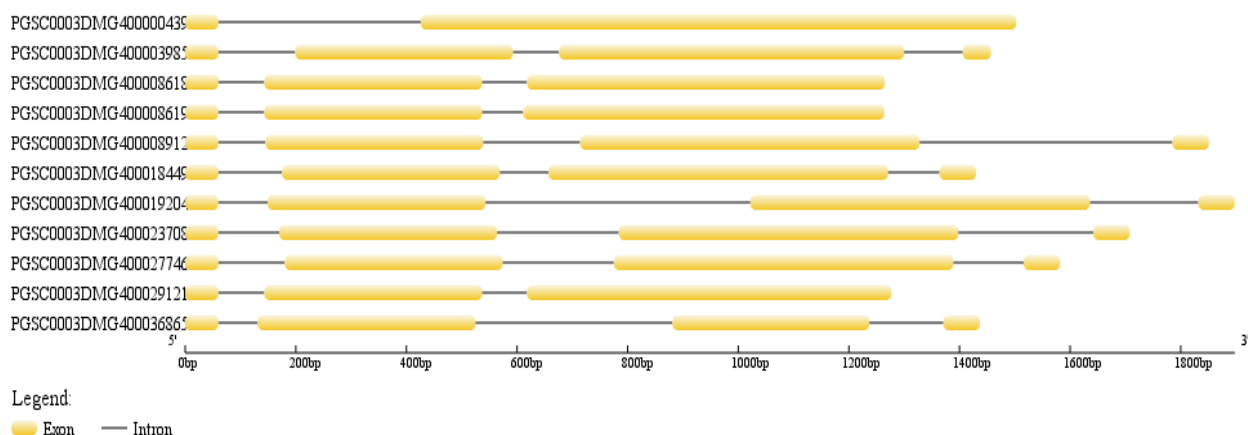


Рис. 3.4. Екзон-інтронна структура генів актину *S. tuberosum*.

В геномі *S. lycopersicum* знайдено 11 послідовностей, що, ймовірно, кодують актин (Рис. 3.5): Solyc00g017210, Solyc01g104770, Solyc03g078400, Solyc04g011500, Solyc04g071260, Solyc05g054480, Solyc06g076090, Solyc10g080500, Solyc10g086460, Solyc11g005330, Solyc11g065990.

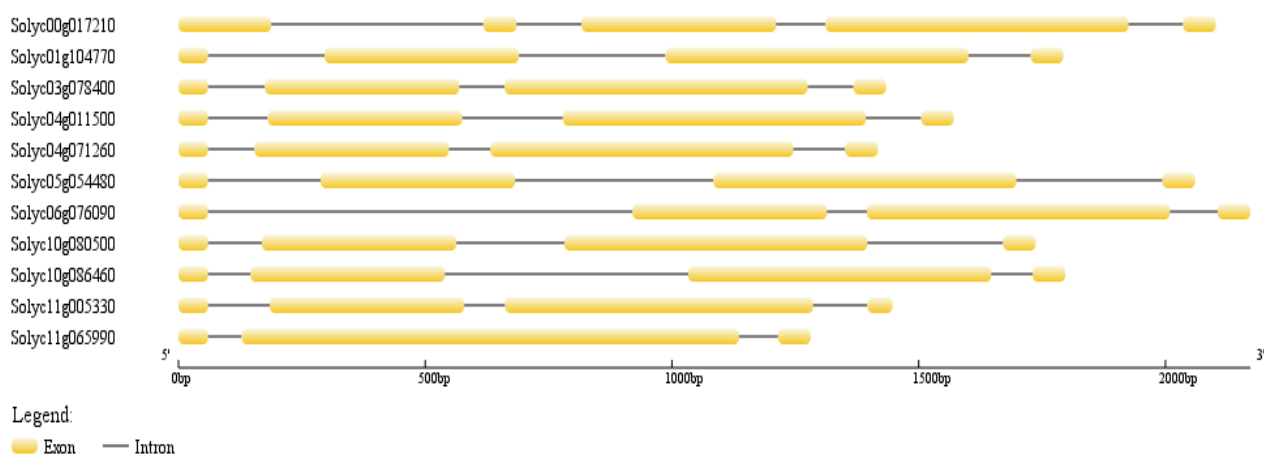


Рис. 3.5. Екзон-інтронна структура генів актину *S. lycopersicum*.

Гени відбиралися на основі ступеня ідентичності та повноти амінокислотних послідовностей, що транлюються даними генами. Середня

кількість амінокислот, які транслюються на основі даних послідовностей, для актину складає близько 380. Окрім того, з бази даних Phytozome v 9.1, окрім повних генних послідовностей актину, були взяті і нуклеотидні послідовності кодуєчих ділянок генів (екзони) та амінокислотні послідовності актину, які були використані в наступних етапах дослідження.

Отже в процесі проведеного біоінформатичного пошуку відібрано гени актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, які в подальшому використовувались для аналізу та дизайну праймерів з метою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у вищих видів рослин.

3.2. Аналіз особливостей екзон-інтронної структури генів актину вищих рослин

Оскільки геном *A. thaliana* є модельним, то з метою встановлення довжини та кількості екзонів та інтронів було проаналізовано анотовані послідовності генів актину *A. thaliana* за допомогою бази даних GenBank,. В Табл. 3.1 наведено результати аналізу особливостей екзон-інтронної структури 8 генів актину *A. thaliana*. Показано, що переважна більшість послідовностей генів актину має по три інтрони та чотири екзони, окрім гену *act 2*, який складається з трьох інтронів та чотирьох екзонів. Довжини інтронів коливаються від 72 п. н. до 155 п. н., а екзонів – 60 – 614 п. н. (Табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Особливості екзон-інтронної структури генів актину *A. thaliana* (п. н.)

Ген	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й інтрон	IV-й екзон	Загальна довжина гену
<i>act 1</i>	60	136	394	100	614	111	66	1481
<i>act 2</i>	454	-	-	78	614	86	66	1298
<i>act 3</i>	60	138	394	83	614	93	66	1448
<i>act 4</i>	60	91	394	148	614	105	66	1430
<i>act 7</i>	60	94	394	86	614	98	66	1412
<i>act 8</i>	60	72	394	96	614	107	66	1409
<i>act 11</i>	60	112	394	155	614	93	66	1494
<i>act 12</i>	60	82	394	99	614	100	66	1415

На підставі інформації, наведеної в базі даних Phytozome v 9.1, також був проведений аналіз екзон-інтронної структури відібраних послідовностей генів актину *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*.

Проаналізовані 9 генів актину в геномі *O. sativa* містять переважно по три інтрони та чотири екзони, окрім LOC_Os03g50885 та LOC_Os11g06390, що містять по два інтрони та три екзони (Табл. 3.2). Довжини інтронів складають від 74 до 539 п. н. Довжини екзонів становлять 57 – 770 п. н.

Таблиця 3.2

Особливості екзон-інтронної структури генів актину *O. sativa* (п. н.)

Локус	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й інтрон	IV-й екзон	Загальна довжина гену
LOC_Os03g61970	60	89	394	93	614	409	66	1725
LOC_Os03g50885	60	83	394	249	614	81	66	1547
LOC_Os11g06390	60	97	394	74	770	-	-	1395
LOC_Os01g73310	60	86	394	217	614	157	65	1593
LOC_Os05g36290	57	81	394	77	614	539	66	1829
LOC_Os05g01600	60	91	394	332	614	124	66	1681
LOC_Os10g36650	60	113	394	268	614	95	66	1610
LOC_Os12g06660	60	152	394	459	623	453	66	2207
LOC_Os01g64630	57	125	394	114	614	542	66	1912

Відібрані 15 генів актину *L. usitatissimum* містили в переважній більшості по три інтрони та по чотири екзони. Виключенням є гени актину Lus10004169, Lus10001693 та Lus10021057, що мали по два інтрони та три екзони (Табл. 3.3). Довжина екзонів варіює від 60 п. н. до 812 п. н., в той час як інтронні ділянки містять 66 – 481 п. н.

Дані щодо структури генів актину Lus10004169 та Lus10021057 вказують на те, що в обох випадках третій інтрон піддався екзогенізації, тобто почав експресуватися як екзонна ділянка гену. Екзогенізація інтронних ділянок генів, на сьогодні, підтверджена для багатьох організмів і є важливим компонентом еволюційного процесу геномів [186]. Саме тому четвертий екзон, який кодує 21 амінокислоту С-термінального фрагменту білку, транслюється зі зсунотою рамкою зчитування. Подібно до тубулінів на кінці білку актину знаходиться неструктурована область, що бере участь у формуванні зв'язків між мономерами в процесі формування фібрили актину [187, 188], а також є сайтом зв'язування для багатьох білків [189]. Однак

більш детального дослідження потребує питання щодо екзогенізації третього інтрону генів Lus10004169 та Lus10021057, та впливу цього явища на експресію даних генів.

Таблиця 3.3

**Особливості екзон-інтронної структури генів актину
L. usitatissimum (п. н.)**

Локус	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III -й інтрон	IV-й екзон	Загальна довжина гену
Lus10005163	60	346	394	87	614	94	66	1661
Lus10006783	60	78	394	79	614	481	66	1772
Lus10006784	60	89	427	66	614	105	66	1427
Lus10005819	60	88	394	101	614	108	66	1431
Lus10005820	60	80	394	82	614	394	66	1690
Lus10029286	60	106	394	355	614	85	66	1680
Lus10021057	60	89	394	295	812	-	-	1184
Lus10005457	60	87	394	300	614	93	66	1614
Lus10004956	60	106	394	355	614	85	66	1680
Lus10004169	60	88	394	295	761	-	-	1598
Lus10016259	60	91	394	321	614	89	66	1635
Lus10001694	60	321	394	87	614	94	66	1636
Lus10040826	60	95	394	114	614	79	66	1422
Lus10004956	60	97	394	172	725	93	66	1607
Lus10001693	319	-	-	86	614	99	66	1184

Проаналізовані 11 генів актину в геномі *S. tuberosum* містять переважно по три інтрони та чотири екзони, окрім PGSC0003DMG400029121, PGSC0003DMG400008619, PGSC0003DMG400008618, що мають по два інтрони та три екзони, та PGSC0003DMG400000439 – лише один інтрон та

два екзона. Кількість нуклеотидів некодуючих областей генів актину складає від 71 до 479 п. н. Довжини екзонів складають 60 – 1077 п. н. (Табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Особливості екзон-інтронної структури генів актину *S. tuberosum* (п. н.)

Локус	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й інтрон	IV-й екзон	Загальна довжина гену
PGSC0003DMG 400003985	60	139	394	83	614	101	66	1457
PGSC0003DMG 400000439	60	366	1077	-	-	-	-	1503
PGSC0003DMG 400018449	60	115	394	88	614	93	66	1430
PGSC0003DMG 400027746	60	120	394	201	614	127	66	1582
PGSC0003DMG 400023708	60	110	395	220	614	244	66	1708
PGSC0003DMG 400019204	60	89	394	479	614	196	66	1898
PGSC0003DMG 400008912	60	85	394	175	614	457	66	1851
PGSC0003DMG 400036865	9	71	394	356	356	134	66	1386
PGSC0003DMG 400029121	60	83	394	81	659	-	-	1277
PGSC0003DMG 400008619	60	83	394	74	659	-	-	1264
PGSC0003DMG 400008618	60	83	394	81	647	-	-	1265

Відібрані 11 генів актину в геномі *S. lycopersicum* мають переважно по три інтрони та чотири екзони. Ген актину Solyc00g017210 містить чотири інтрони та п'ять екзонів. Виключенням також є ген актину Solyc11g065990, який має лише два інтрони та три екзони. В гені Solyc11g065990 відбулася екзогенізація II-го інтрону, в результаті чого II-й екзон теоретично містить в своєму складі II-й екзон, III-й інтрон та III-й екзон, та має довжину 1008 п. н. Довжини некодуючих ділянок генів корелюють від 68 п. н. до 860 п. н., довжини екзонів – 60 – 1008 п. н. (Табл. 3.5).

Таблиця 3.5

**Особливості екзон-інтронної структури генів актину
S. lycopersicum (п. н.)**

Локус	I-й екзон	I-й інтрон	II-й екзон	II-й інтрон	III-й екзон	III-й інтрон	IV-й екзон	IV-й інтрон	V-й екзон	Загальна довжина гену
Solyc00g017210	188	433	64	132	394	100	614	111	64	2102
Solyc01g104770	60	236	394	297	614	126	66	-	-	1793
Solyc03g078400	60	115	394	92	614	93	66	-	-	1334
Solyc04g011500	60	121	394	204	614	112	66	-	-	1571
Solyc04g071260	60	94	394	84	614	105	66	-	-	1417
Solyc05g054480	60	228	394	402	614	275	66	-	-	2060
Solyc06g076090	60	860	394	81	614	97	66	-	-	2172
Solyc10g080500	60	109	394	219	614	296	66	-	-	1737
Solyc10g086460	60	86	394	493	614	84	66	-	-	1797
Solyc11g005330	60	125	394	83	614	105	66	-	-	1447
Solyc11g065990	60	68	1008	79	66	-	-	-	-	1281

Отже, проведений аналіз особливостей екзон-інтронної структури анотованих послідовностей генів актину *A. thaliana* та відібраних генів актину *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* з використанням бази даних GeneBank та Phytozome v 9.1 дозволив встановити, що послідовності генів актину всіх проаналізованих видів вищих рослин мають схожу екзон-інтронну структуру. Переважна більшість генів актину має по три інтрони та чотири екзони. Отримані дані вказують на системність в кількісному складі екзонів. Зокрема, екзони в переважній більшості містять однакову кількість пар нуклеотидів: 60 (I-й екзон), 394 (II-й

екзон), 614 (III-й екзон) та 66 (IV-й екзон) відповідно. Сталості в будові інтронів не виявлено, оскільки некодуючі ділянки генів актину мають різну кількість нуклеотидів, яка варіює в широких межах.

3.3. Встановлення ступеня ідентичності між кодуючими ділянками генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* та їх трансльованими амінокислотними послідовностями

Наступним етапом дослідження було порівняння ступеня ідентичності кодуючих ділянок генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* та амінокислотних послідовностей, що з них трансльовуються. Множинне вирівнювання нуклеотидних та амінокислотних послідовностей проводили з використанням Clustal X 2.0 [171], а відсоток ідентичності встановлювали в програмі UGENE [172]. В результаті проведеного біоінформатичного аналізу встановлено, що ступінь ідентичності кодуючих ділянок (екзонів) складає в середньому 77% відповідно (Табл. 3.6). За результатами порівняння амінокислотних послідовностей, що трансльовуються з генів актину, відсоток ідентичності складає 92% (Табл. 3.7).

Таблиця 3.6

Ступінь ідентичності кодуючих ділянок генів актину (%)

Вид рослин	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	71	75	80	80
<i>O. sativa</i>	71	100	73	71	71
<i>L.usitatissimum</i>	75	73	100	70	77
<i>S. tuberosum</i>	80	71	70	100	84
<i>S.lycopersicum</i>	80	71	77	84	100
В середньому	77				

Таблиця 3.7

**Ступінь ідентичності трансльованих амінокислотних послідовностей
генів актину (%)**

Вид рослин	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>S. tuberosum</i>	<i>S. lycopersicum</i>
<i>A. thaliana</i>	100	95	96	86	95
<i>O. sativa</i>	95	100	95	87	95
<i>L.usitatissimum</i>	96	95	100	88	96
<i>S. tuberosum</i>	86	87	88	100	87
<i>S.lycopersicum</i>	95	95	96	87	100
В середньому	92				

Таким чином, встановлено, що відсоток ідентичності екзонних ділянок генів актину та трансльованих амінокислотних послідовностей *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum* виявився достатньо високим. Це є свідченням того, що саме екзони являються найбільш консервативними ділянками генів актину, що підтверджує доцільність використання цих ділянок генів актину для подальшого дизайну праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину.

3.4. Дизайн праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у вищих рослин

Розробка підходу для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, передбачає підбір та синтез праймерів для проведення ПЛР. Такі праймери відпалюються на консервативних ділянках екзонів та дозволяють ампліфікувати ділянки генів актину, що містять повний інтрон та два фрагменти сусідніх екзонів. В даному випадку, джерелом поліморфізму виступає саме інтронна ділянка гену актину. Зважаючи на результати проведеного пошуку генів актину в геномах *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, а також беручи до уваги

отримані дані щодо екзон-інтронового аналізу відібраних генів, був проведений дизайн та синтез праймерів для оцінки поліморфізму довжини II-го інтрону генів актину.

Результати попередніх досліджень свідчать про наявність у геномі *L. usitatissimum* 15 генів актину. Для оцінки поліморфізму довжини інtronів деяких з цих послідовностей підібрано три пари специфічних праймерів до консервативних ділянок екзонів генів актину Lus10021057, Lus10029286 Lus10016259, Lus10040826 *L. usitatissimum* так, щоб отримати в подальшому багатократну ампліфікацію II-го інтрону.

Першою парою специфічних ПЛР-праймерів є Lus-F та Lus-R, що дають можливість оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону генів Lus10021057 та Lus10029286 *L. usitatissimum*. На Рис. 3.6 показано, що праймери відпалюються на висококонсервативних ділянках II-го та III-го екзонів. Варто зазначити, що згідно аналізу екзон-інтронної структури даних генів актину у льону-довгунця було передбачено появу фрагментів з довжинами близько 906 п. н. для гена Lus10021057 та 961 п. н. – для гена Lus10029286. Нуклеотидні послідовності прямого та зворотнього Lus-праймерів продемонстровано в Табл. 2.3.

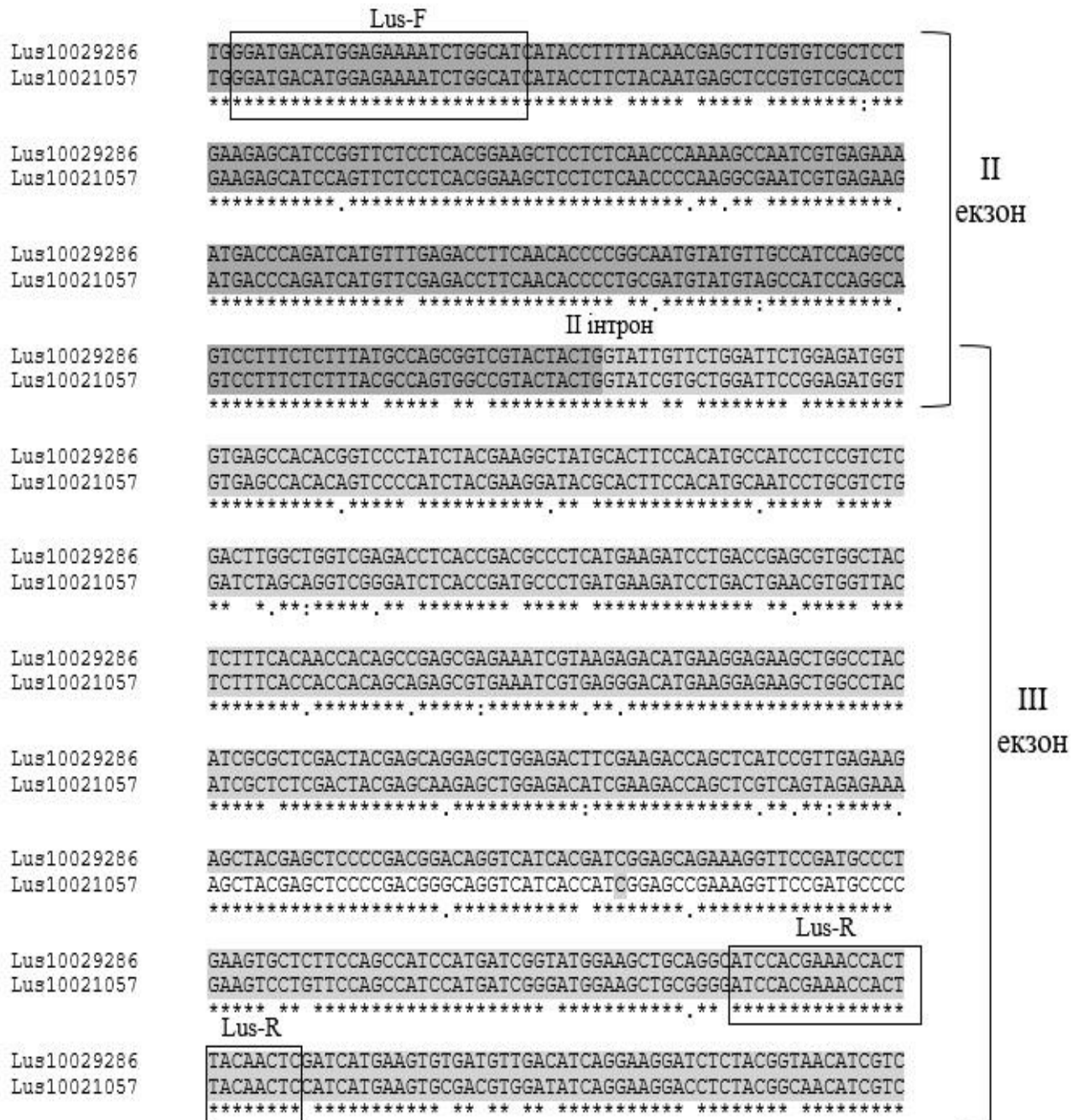


Рис. 3.6. Фрагмент вирівнювання кодуючих ділянок генів актину Lus10021057 та Lus10029286 *L. usitatissimum*. Прямокутниками виділені ділянки відпалу прямого та зворотнього праймерів Lus-F та Lus-R.

Друга пара специфічних праймерів підібрана до гена актину Lus10016259 *L. usitatissimum*. Праймери підібрані до ділянок II-го та III-го екзонів, що дає можливість оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону даного гена у льону-довгунця. На Рис. 3.7 виділені фрагменти екзонів, на

яких відпалюються прямий та зворотній праймери. Зважаючи на результати біоінформатичного аналізу даного гена очікується отримати фрагмент розміром 926 п. н. Нуклеотидні послідовності праймерів, що дають можливість оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону гена актину Lus10016259 у льону-довгунця, наведені в Табл. 2.3.



Рис. 3.7. Послідовність гену актину Lus10016259 *L. usitatissimum*. Прямокутниками позначено ділянки відпалу прямого та зворотнього праймерів для виявлення поліморфізму довжини II-го інтрону.

Третя пара специфічних праймерів дозволяє оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону гена актину Lus10040826 *L. usitatissimum*. Прямий та зворотній праймери відпалюються на ділянках II-х та III-х екзонів, таким чином дають можливість оцінити поліморфізм II-го інтрону (Рис. 3.8).

```

>Lus10040826.g
ATGGCAGAAGGTGAGGATATCCAGCCACTTGTCTGCGACAATGGAAGTGGTCAAGGTACCGTATTTTGTTCAGCAGGTCTTTTCAGATTGCAAT
CTCAGGAATGCTAAGATTGTGGTGTGATAAATACTGATACATTCTCACATTTTCAGGCTGGGTTTGTGGTGATGATGCTCCAAGGGCAGTGTCCCTAGC
ATTGTTGGCCGTCACGCCACACTGGTGTGATGGTTGGAATGGGACAAAAGGATGCCATGTTGGGGATGAAGCTCAGTCTAAGAGGGGTATCTTGACCC
TGAAGTACCCATTGAGCATGGTATCGTCAGTAACTGGACGATATGGAGAAAATTTGGCATCACACATTCTACAATGAACCTCGTGTGCGCCCAGAAGA
ACACCCAGTCTGCTCACTGAAGCACCTCTCAATCCTAAGGCCAATCGTGAAAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAATACTCTGCTATGTAT
GTCGCCATCCAGGCCGTGCTCTCGCTTTATGCCAGTGGTCTACTACTGGTGAGTGGTTGCTAAGCAGCATTTTCAACTGCACATCATGTCTCTGATCAT
AGTAACTAATGAAATGTTACTACTATGTTAGCTTGACATGTGTTTGTCTTCCCTGATGTCAGGTATCGTGTGCTGACTCCGGTGATGGTGTGACGCCACAC
GGTCCCAATTTACGAGGGATATGCCCTCCCGCATGCCATCCTCCGCTCTCGACCTGGCTGGCCGCATCTACCAGCGCGCTCATGAAGATCCTGACAGAG
CGCGGTACTCCTTACCACCACAGCCGAGCGAGAAAATCGTGAGGACATGAAGGAGAAGCTAGCGTACATCGCCCTCGACTACGAGCAGGAGCTCGAAA
CCTCCAAGACCAGTCTCCGTCGAGAAGAGCTACGAGCTCCCGACGGTCAAGTGATCACCATCGGCGCTGAACGTTTCAGATGCCCTGAAGTCTCTT
CCAGCCCTCAATGATTGGGATGGAAGCTGCTGGCATCCACGAACTACCTACAACCTCATCATGAAGTGCAGCTGGATATCAGGAAGGATCTGTACGGA
AACATCGTCTCAGTGGTGGTTCGACCATGTTCCCTGGAATTGCAGACAGGATGAGCAAGGAAATCACAGCTTGGCCCTTAGCAGCATGAAGATCAAGG
TCGTTGCTCCCCCTGAGAGAAAATACAGTGTCTGGATCGGTGGATCCATCTTGGCTTCCCTCAGCACTTTCCAGCAGGTTTGTGATCCTCGTAAAGGTTT
TAAATTTCAATCGTTGATAGCAATGACTAACTATTTACTTGGATTTGAAATGCAGATGTGGATTGCAAAAGGCTGAGTACGACGAATCTGGACCGTCCAT
CGTTCACAGGAAGTGCTTCTAA

```

■ - Екзон □ - Праймер

Рис. 3.8. Послідовність гену актину Lus10040826 *L. usitatissimum*. Прямокутниками виділені ділянки відпалу прямого та зворотнього праймерів для виявлення поліморфізму довжини II-го інтрону.

Зважаючи на попередній біоінформатичний аналіз гена Lus10040826, очікувалось отримати фрагмент розміром 676 п. н. Нуклеотидні послідовності форвардного та реверсного праймерів до гена актину Lus10040826 льону-довгунця представлені в Табл. 2.3.

Окрім того, були побудовані та синтезовані універсальні вироджені праймери ActIn, які дозволяють оцінювати поліморфізм довжини інтронів генів актину у всіх видів вищих рослин. Попередньо було проведено множинне вирівнювання кодуючих ділянок всіх відібраних генів актину з геномів *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. Прямий (форвардний) праймер ActIn-F відпалюється на ділянках II-го екзону генів актину (Рис. 3.9).

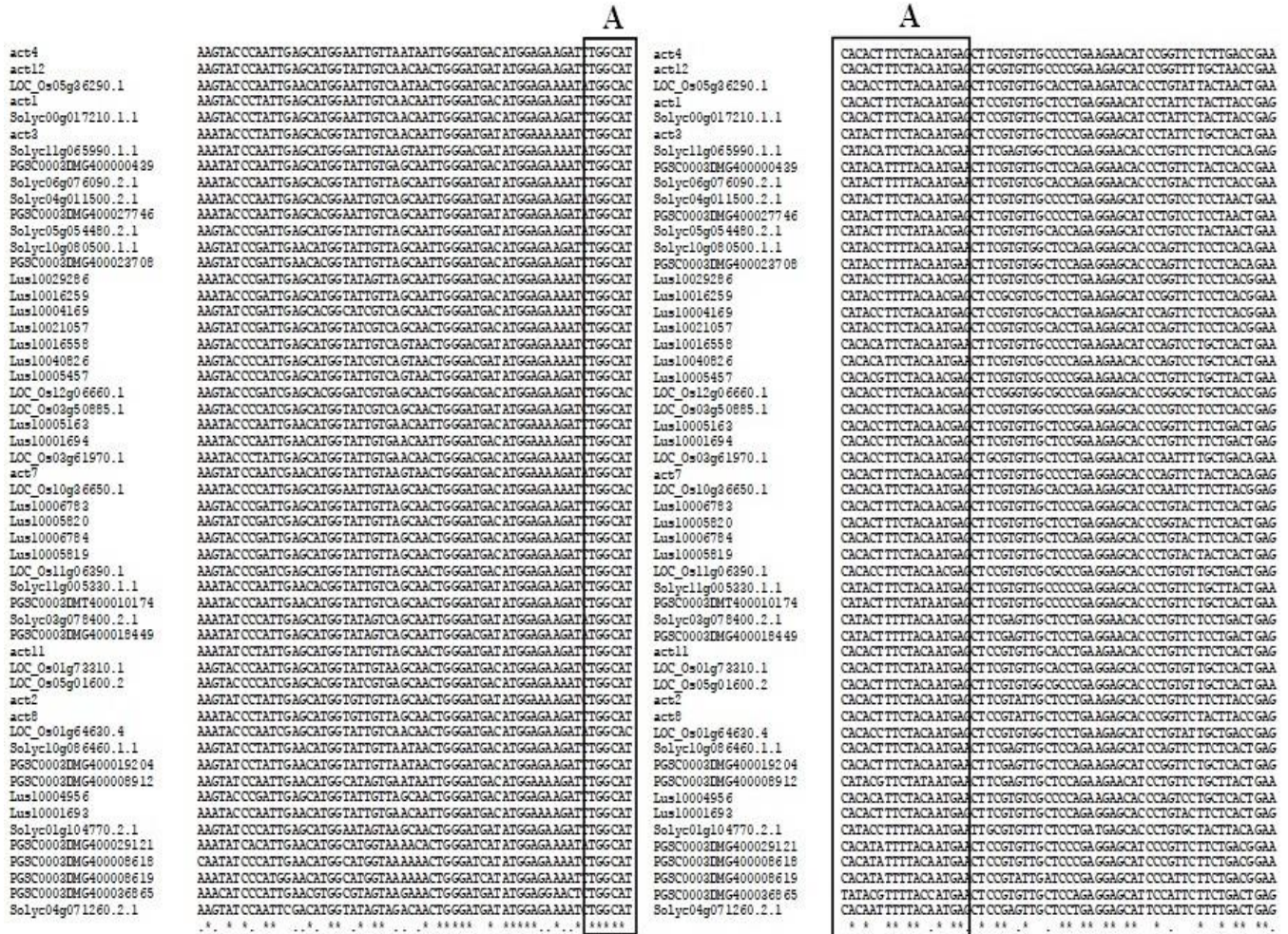


Рис. 3.9. Фрагменти множинного вирівнювання кодуючих (екзонних) ділянок генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. А – ділянки відпалу прямого праймеру (ActIn-F).

Зворотній (реверсний) праймер ActIn-R відпалюється на ділянках III-го екзону генів актину (Рис. 3.10). Таким чином, в результаті проведеного ПЛР можливо отримати багатократну ампліфікацію II-го інтрону всіх генів актину, що закодовані в межах рослинного геному. Повні нуклеотидні послідовності розроблених ПЛР-праймерів наведено в Табл. 2.3.

A

```

act4      GACTTG TAGGGT AACATTGT GCTAAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTGGAG GGAATTGCT GAT
act12     GACTTT TAGGGT AACATTGT GCTTAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTGGCG GGAATTGCT GAT
LOC_O=05g36290.1 GACTTG TAGGGT AACATTGT CCTAAGTG GAAGG TTC TACCATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
act1      GACTTG TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATGCC GAC
Solyc00g017210.1.1 GACTTG TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATGCC GAC
act3      GACTTG TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAC
Solyc11g065990.1.1 GACTTT TAGGGT AACATTGT ACTTAGCG GGGGT AAC GACTATG TTTCCAG GGAATGCC GAT
PG8C0003DMG40000439 GACTTT TAGGGT AACATTGT ACTTAGTG GCGGT AAC CACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Solyc06g076090.2.1 GATCTC TAGGGT AACATCGT ACTCAGTG GTGGT AAC GACTATG TTTCCCTG GGAATGCC GAT
Solyc04g011500.2.1 GATCTT TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC TACCATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
PG8C0003DMG400027746 GATCTT TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC TACCATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Solyc05g054480.2.1 GACTCT TAGGGT AACATTGT CCTCAGTG GTGGT AAC TACCATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Solyc10g080500.1.1 GATCTG TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
PG8C0003DMG400023708 GATCTC TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10029286 GATCTC TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10016259 GACTCT TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10004169 GACTCT TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10021057 GACTCT TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10016558 GATCTG TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC GACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10040826 GATCTG TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC GACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10005457 GATCTG TAGGGT AACATCGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
LOC_O=12g06660.1 GATCTG TAGGGT AACATCGT GCTCAGTG GTGGT AAC GACTATG TTTCCCTG GGAATGCC GAC
LOC_O=03g50885.1 GACTTA TAGGGT AACATCGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10005163 GACTTG TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10001694 GACTTG TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
LOC_O=03g61970.1 GATCTC TAGGGT AACATTGT GCTTAGTG GAAGG AAC TACCATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
act7      GATCTC TAGGGT AACATCGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
LOC_O=10g36650.1 GACTTG TAGGGT AACATTGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATGCC GAC
Lus10006783 GACTTT TAGGGT AACATCGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10005820 GACTTT TAGGGT AACATCGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10006784 GACTTT TAGGGT AACATCGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10005819 GACTTT TAGGGT AACATCGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
LOC_O=11g06390.1 GACTTG TAGGGT AACATTGT TCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Solyc11g005330.1.1 GACTCT TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
PG8C0003DMT400010174 GACTCT TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Solyc03g078400.2.1 GACTCT TAGGGT AACATTGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
PG8C0003DMG400018449 GACTTA TAGGGT AACATTGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
act11     GATCTG TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
LOC_O=01g73210.1 GACTTG TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATGCC GAC
LOC_O=05g01600.2 GACTTT TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
act2      GATCTG TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC CACTATG TTTCCAG GCAATGCC GAC
act8      GACTTT TAGGGT AACATTGT GCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCTAG GGAATTGCT GAT
LOC_O=01g64630.4 GATTTG TAGGGT AATGTGGT CCTTAGTG GGGGT AAC TACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Solyc10g086460.1.1 GATCTG TAGGGT AACATTGT ACTTAGTG GTGGT AAC CACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
PG8C0003DMG400019204 GATCTG TAGGGT AACATTGT ACTTAGTG GTGGT AAC CACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
PG8C0003DMG400008912 GATTTG TAGGGT AACATTGT GCTTAGCG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10004956 GACTTT TAGGGT AACATCGT TCTCAGTG GTGGT AAC CACAATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Lus10001693 GATCTG TAGGGT AACATCGT CCTCAGTG GTGGT AAC GACTATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
Solyc01g104770.2.1 GACTTT TAGGGT AACATTGT CCTCAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GGAATTGCT GAT
PG8C0003DMG400029121 GATTTA TTTGCA AACATTGT GCTTAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GCTTAGCA GAA
PG8C0003DMG400008618 GATTTA TTTGCA AACATTGT GCTTAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GCTTAGCA GAA
PG8C0003DMG400008619 GATTTA TTTGCA AACATTGT GCTTAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GCTTAGCA GAA
PG8C0003DMG400036865 GATTTA TAGGGT AACATCGT GCTTAGTG GTGGT AAC AACATG TTTCCCTG GCAATGCC GAT
Solyc04g071260.2.1

```

Рис. 3.10. Фрагменти множинного вирівнювання кодуєчих (екзонних) ділянок генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. А – ділянки відпалу зворотнього праймеру (ActIn-R).

Отже, зважаючи на результати проведеного біоінформатичного пошуку та аналізу генів актину в геномах вищих видів рослин, на даному етапі дослідження проведений дизайн та синтез ПЛР-праймерів, що дозволять оцінити поліморфізм довжини інтронів генів актину у однодольних та дводольних видів рослин. Зокрема, здійснено дизайн та синтез трьох пар ген-специфічних праймерів, що дають можливість оцінити поліморфізм довжини інтронів окремих генів актину *L. usitatissimum*, а саме: Lus10021057, Lus10029286, Lus10016259 та Lus10040826. Окрім того, враховуючи екзон-

інтронну структуру всіх відібраних генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*, синтезовано пару вироджених універсальних праймерів, які дозволять виявити та проаналізувати поліморфізм довжини інтронів генів актину вищих рослин.

Результати експериментальних досліджень розділу 3 наведено в публікаціях:

1. Рабоконь А.Н. Анализ гомологов генов основных белков цитоскелета у различных видов высших растений / А.Н. Рабоконь, **А.С. Постовойтова**, Я.В. Пирко, Я.Б. Блюм // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2014. – Т. 14. – С. 76-78. *(Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).*

2. **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. Пирко, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм // Наукові доповіді НУБіП. – 2015. – 8(57) URL: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/14.pdf. *(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 разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).*

4. Пирко Я.В. Анализ экзон-интронной структуры генов “домашнего хозяйства” у различных видов растений / Я.В. Пирко, **А.С. Постовойтова**, А.М. Рабоконь, Я.Б. Блюм // Матеріали ІІ конференції молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23-24 грудня 2013, Київ, Україна: тези доп. – Київ, 2013. – С. 34.

5. Пирко Я.В. Анализ гомологов генов, кодирующих актин, у различных видов высших растений / Пирко Я.В., Рабоконе А.Н., **Постовойтова А.С.**, Самофалова Д.А., Блюм Я.Б. // Матеріали ІІІ 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.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ АКТИНУ У РІЗНИХ ВИДІВ РОСЛИН

4.1. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників родини *Poaceae*

Родина Тонконогові або Злакові (*Poaceae* Barnhart.) – одна з найбільш чисельних та поширених родин однодольних рослин, яка включає значну кількість господарсько цінних культур. Ця родина нараховує понад 770 родів і близько 12 тисяч видів рослин та за чисельністю поступається лише родинам *Asteraceae*, *Orchidaceae*, *Fabaceae* та *Rubiaceae* [190]. Злаки поширені на всіх континентах (включаючи Антарктиду) та є важливою складовою багатьох наземних екосистем, таких як тундра, степ, ліси тощо. Окрім того, до складу цієї родини входять найбільш важливі світові продовольчі культури, зокрема пшениця, кукурудза, рис, ячмінь, сорго, просо, овес та ін.

Зважаючи на значну чисельність, поширеність та користь для людини представників родини *Poaceae*, передбачуваним є науковий інтерес як до окультурених так і до дикорослих видів злаків. Зокрема генетики та селекціонери досить давно займаються всебічним дослідження культурних злаків, вивчаючи їх біорізноманіття, філогенетичні зв'язки, створюючи нові сорти чи покращуючи характеристики вже існуючих. Практичний інтерес для сучасних наукових досліджень представляють і дикорослі родичі злакових, оскільки зростаючи у різних екосистемах та пристосувавшись до кардинально різних кліматичних умов, саме вони можуть слугувати джерелом корисних ознак для сортів культурних злаків, серед яких холодостійкість, посухостійкість, стійкість до засолення ґрунтів тощо.

На сьогодні для молекулярно-генетичного аналізу представників родини *Poaceae* використовуються велика кількість ДНК-маркерних систем, а саме: RAPD, AFLP, ISSR, IRAP, REMAP, SSR і інші [41-46, 52, 53, 68-70, 72, 73, 79-82, 91, 92, 94, 95]. Саме ДНК-маркери дозволяють якісно проводити популяційно-генетичний аналіз, оцінювати біорізноманіття, прискорювати процес селекції та створювати нові сорти злакових культур з покращеними ростовими, харчовими, морфологічними характеристиками, а також сорти, стійкі до різноманітних стресових чинників як абіотичного так і біотичного характеру в процесі маркер-асоційованої селекції. Однак, зважаючи на постійне зростання продовольчих потреб людства та необхідність створення нових та покращення існуючих сортів злаків, необхідним є і удосконалення молекулярно-генетичних підходів для їх аналізу. Оскільки, на сьогодні впровадження нових ген-специфічних ДНК-маркерних систем в сучасні генетичні та селекційні дослідження є актуальним питанням, то оцінка можливостей використання новорозроблених ДНК-маркерів, що дозволяють виявляти поліморфізм довжини інтронів генів актину, для молекулярно-генетичного аналізу саме представників родини *Poaceae* є надзвичайно актуальним питанням.

4.1.1. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів пшениці та ячменю

Пшениця (*T. aestivum*) – одна з найбільш розповсюджених сільськогосподарських культур в світі та в Україні зокрема. Жодна сільськогосподарська культура не має стільки різноманітних сортів та видів як пшениця [191]. Зважаючи на глобальну важливість пшениці у світі як зернової культури, вона є надзвичайно цікавим об'єктом різноманітних досліджень як генетиків так і селекціонерів. Ще один представник родини *Poaceae* – ячмінь звичайний (*H. vulgare*) – одна з найдавніших сільськогосподарських культур, яка разом з пшеницею була окультурена не

менше ніж 10 тисяч років тому [192]. Рід ячменю (*Hordeum* L.) об'єднує близько 30 видів, з яких лише декілька є культурними видами, всі інші – це багаторічні або однорічні форми дикорослого ячменю. Зважаючи на таку велику кількість дикорослих родичів, ячмінь є цікавим об'єктом для створення нових покращених селекційних ліній та сортів з використанням сучасних молекулярно-генетичних та селекційних підходів.

На сьогодні переважна більшість відомих ДНК-маркерів була протестована на пшениці, ячменю та інших зернових культурах. Для генотипування, диференціації та паспортизації сортів злакових використовують такі ДНК-маркерні системи, як IRAP, REMAP [193, 194], SSR [195], RAPD, ISSR [196], TBP [129]. Зокрема ДНК-маркери широко використовуються для створення селекційних ліній пшениці та ячменю з певними корисними ознаками. В літературі описано дані, що для підвищення урожайності ячменю застосовували RFLP-маркери [152], а для покращення хлібопекарських якостей та урожайності пшениці корисними виявилися SSR-маркери [197]. ДНК-маркери є основою MAS-програм щодо створення селекційних ліній злакових культур, стійких до певних хвороб. Зокрема для селекції ліній пшениці, стійких до бурої та стеблової іржі, використовують IRAP, REMAP SSR, RAPD-маркерні системи [146, 147, 198]. Також SSR-маркери виявилися корисними для створення стійких ліній пшениці до фузаріозу та борошнистої роси [147, 199]. ALFP-маркери використовувалися для виявлення ліній ячменю, стійкого до фузаріозу [200].

На сьогодні ДНК-маркери є доступним та корисним інструментом для маркування господарсько цінних ознак зернових культур, таких як пшениця та ячмінь. Впровадження методів молекулярного маркування значно пришвидшує селекцію ліній в процесі створення нових сортів. Однак актуальним залишається питання щодо пошуку нових ген-специфічних ДНК-маркерів, які б були інформативними та доступними для генотипування, диференціації зернових культур, зокрема в процесі селекції. Саме тому на даному етапі роботи оцінена можливість застосування поліморфізму

довжини інтронів генів актину для генотипування та диференціації сортів пшениці та ячміню.

Проведений аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у 7 сортів ярої пшениці з використанням розробленої системи для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволив генотипувати досліджувані сорти пшениці та отримати специфічні ДНК-профілі. На електрофореграмі (Рис. 4.2) продемонстровано фрагменти, що містять інтрони генів актину, які розподілялися в діапазоні довжин від 600 п. н. до 1500 п. н. Найбільш щільне розташування ампліконів інтронів генів актину спостерігається в межах від 700 п. н. до 900 п. н.

Загалом більшість утворених фрагментів інтронів генів актину виявилися мономорфними, однак досліджена поява трьох зон поліморфних ампліконів (на Рис. 4.2, зони виділені прямокутниками). Зокрема у сорту 'Х 12' (зразок 4) відсутній фрагмент з інтроном гена актину довжиною близько 676 п. н., що вирізняє даний сорт пшениці серед усіх інших. Чітка поліморфна зона спостерігається в межах від 900 п. н. до 1000 п. н. У сортів 'Етюд', 'Х 12', 'Retown' та 'Selkirk' (Рис. 4.2, зразки 3, 4, 5, 7) в цій зоні наявні по два фрагменти інтронів генів актину з довжинами близько 932 п. н. та 964 п. н., в той час як у сортів 'Черемшина', 'Елегія' та 'Недра' (Рис. 4.2, зразки 1, 2, 6) візуалізувався лише один фрагмент довжиною близько 632 п. н. Ще одна зона поліморфних ампліконів інтронів візуалізується у верхній частині електрофореграми. У більшості проаналізованих сортів пшениці, а саме у сортів: 'Черемшина', 'Елегія', 'Етюд', 'Retown' та 'Недра' (Рис. 4.2, зразки 1, 2, 3, 5, 6), наявний лише один фрагмент інтронів довжиною близько 1139 п. н. У сорту 'Х 12' спостерігається амплікон інтронів гена актину довжиною близько 1204 п. н., а сорт 'Selkirk' містить одночасно два фрагменти (1139 п. н. та 1204 п. н.), що вирізняє саме цей сорт пшениці серед всіх інших проаналізованих сортів.

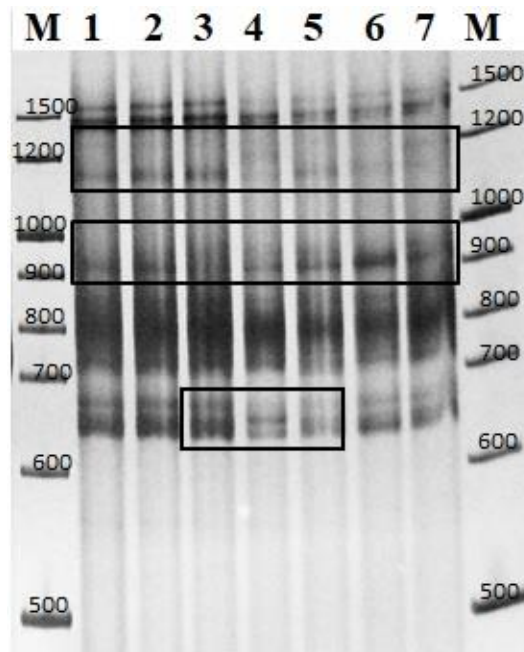


Рис. 4.2. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів пшениці: 1 – ‘Черемшина’, 2 – ‘Елегія’, 3 – ‘Етюд’, 4 – ‘Х 12’, 5 – ‘Retown’, 6 – ‘Недра’, 7 – ‘Selkirk’ (Канада). М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину.

Для даної вибірки сортів пшениці характерним є утворення чотирьох різних алельних фенотипів, а у двох сортів ‘Х 12’ та ‘Selkirk’ виявлені унікальні алельні фенотипи. Значення *PIC* склало 0,69, що свідчить про досить високий рівень поліморфізму в представленій вибірці пшениці.

В подальшому за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину було проведено генетичне профілювання сортів ячменю (*H. vulgare*). Результати проведеного аналізу свідчать про стабільне утворення ДНК-профілів зі специфічними фрагментами ДНК, що містять інтрони генів актину (Рис. 4.3). Загалом для кожного проаналізованого сорту ячменю характерним є утворення трьох фрагментів. Утворені амплікони, що містять інтрони генів актину, розподілилися в межах від 700 п. н. до 1000 п. н. Довжина мономорфних фрагментів ДНК складала близько 769 п. н. та 884 п. н. Поліморфізм довжини інтронів виявлений лише в межах верхньої смуги фрагментів. Для більшості проаналізованих сортів ячменю були характерні

амплікони розміром близько 938 п. н. Це стосується, насамперед, сортів ‘Медікум 46’, ‘Одеський 18’, ‘Южний’, ‘Нутанс 106’, ‘Південний’, ‘Гетьман’ тощо. У сортів ‘Паллідум 32’, ‘Одеський 9’, ‘Одеський 14’, ‘Степовий’, ‘Престиж’ та інших виявлено присутність фрагменту ДНК довжиною 908 п. н. Загалом при оцінці вибірки сортів ячменю встановлено наявність двох різних алельних фенотипів. Значення *PIC* склало 0,43, що свідчить про достатній рівень поліморфізму у проаналізованій вибірці сортів ячменю.

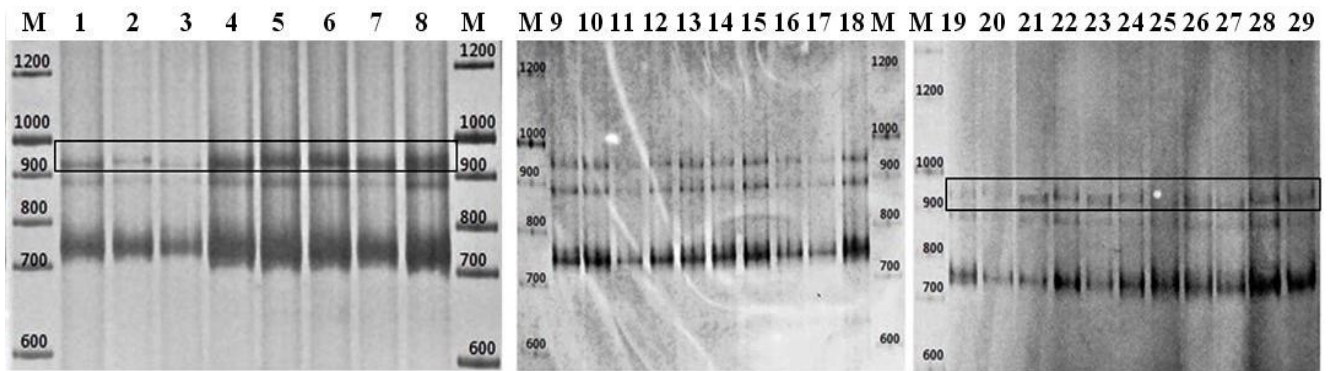


Рис. 4.3. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у сортів ячменю: 1 – ‘Паллідум 32’, 2 – ‘Медікум 46’, 3 – ‘Одеський 9’, 4 – ‘Одеський 14’, 5 – ‘Одеський 18’, 6 – ‘Южний’, 7 – ‘Степовий’, 8 – ‘Нутанс 106’, 9 – ‘Південний’, 10 – ‘Гетьман’, 11 – ‘Оболонь’, 12 – ‘Чудовий’, 13 – ‘Чарівний’, 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.

Отже, розроблений підхід для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволив генотипувати та диференціювати між собою сорти пшениці та ячміню через утворення сортоспецифічних ДНК-профілів. Таким чином, було показано інформативність та доцільність подальшого використання оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у

подальших молекулярно-генетичних дослідженнях та в процесі селекції пшениці та ячміню.

4.1.2. ДНК-профілювання сортів рису посівного за допомогою оцінки поліморфізму довжини другого інтрону генів актину

Рис посівний (*O. sativa*) являється однією з найпоширеніших зернових культур в світі [201]. На сьогодні саме рис є модельним об'єктом для різноманітних молекулярно-генетичних досліджень злакових, оскільки має невеликий диплоїдний геном довжиною 430 Мб та 12 хромосом. Для проведення молекулярно-генетичного аналізу рису широко використовуються різні довільні ДНК-маркерні системи, зокрема розроблені SSR, AFLP, IRAP, REMAP-маркери [52, 70, 95]. Серед ген-специфічних молекулярно-генетичних маркерів на рисі протестовані CDDP-маркери [97].

Зважаючи на досить обмежені дані щодо використання ген-специфічних ДНК-маркерів у дослідженнях рису, актуальним є питання щодо можливості використання методу оцінки поліморфізму довжини інtronів генів актину для вирішення проблем генетики та селекції. Зокрема був проведений аналіз поліморфізму довжини інtronів генів актину 6 сортів рису (*O. sativa*) посівного української селекції. Окрім того, на даному етапі дослідження проаналізований один з підвидів рису, а саме *O. sativa* spp. *japonica*. Генотипування рису посівного проводилося з використанням універсальних ДНК-маркерів для оцінки поліморфізму довжини інtronів генів актину.

В результаті проведеного генотипування продемонстровано утворення видоспецифічних ДНК-профілів рису, що містили чіткі та відтворювані фрагменти з інтронами генів актину. Показано, що у всіх досліджених сортів рису посівного утворювалося по 6 чітких відтворюваних фрагментів, розташованих в діапазоні довжини від 500 п. н. до 1200 п. н. (Рис. 4.4). Розміри ампліконів інtronів складали близько 560 п. н., 708 п. н., 770 п. н.,

840 п. н., 963 п. н. та 1191 п. н. Серед досліджуваних сортів не було виявлено жодних поліморфних фрагментів з інтронами генів актину, що свідчить про генетичну гомогенність сортів за цим видом ДНК-маркерів. В результаті трикратного повторення ампліфікації не було виявлено інших фрагментів або продуктів неспецифічного зв'язування праймерів.

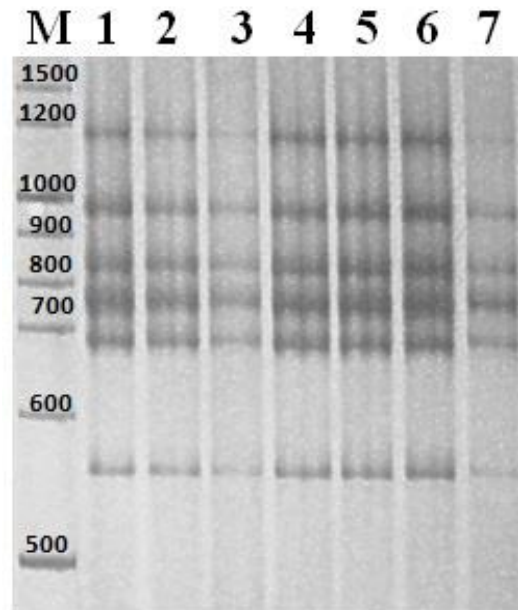


Рис. 4.4. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів рису посівного. 1 – *O. sativa* spp. *japonica*; 2 – ‘УІР-4970’, 3 – ‘УІР-4558’, 4 – ‘Лазурит’, 5 – ‘Віконт’, 6 – ‘Преміум’, 7 – ‘Консул’. М – маркер молекулярної маси.

Отримані дані свідчать про можливість використання оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину генотипувати зразки рису посівного, однак диференціювати сорти української селекції за цим видом ДНК-маркерів не вдалося. Доцільним в даному випадку було б подальше розширення досліджуваної вибірки сортів рису. Однак отримані результати узгоджуються з наявною в літературних джерелах інформацією про те, що характерною особливістю сортів рису різних країн є тісний генетичний зв'язок, а дані, отримані з використанням різних ДНК-маркерних систем

(зокрема RAPD, AFLP, SSR та ін.) свідчать про низьку генетичну різноманітність сортів рису посівного [202-204]

4.1.3. Диференціація природних популяцій *Aegilops biuncialis* за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину

Егілопс двухдуюмовий (*Ae. biuncialis*) – вид однорічних трав'янистих рослин з родини *Poaceae*, який є найближчим дикорослим родичем роду *Triticum* L. В сучасній селекції та генетиці *Ae. biuncialis* є джерелом корисних рис для покращення агрономічних характеристик сучасних сортів пшениці (*T. aestivum*) [205]. Зокрема, тетраплоїд *Ae. biuncialis* ($2n=4x=28$) характеризується широкими адаптивними можливостями до змін кліматичних умов, а також є стійким до різних біотичних та абіотичних стресових факторів. Егілопс успішно адаптований до існування на засушливих територіях, тому такі його особливості як посухостійкість та стійкість до осмотичного стресу використовується селекціонерами для покращення сортів пшениці [206-208]. Окрім того, декі види егілопсу є стійкими до жовтої карликовості ячменю [209] та іржі [210].

Ряд досліджень популяційної диференціації егілопсу двухдуюмового проводили шляхом використання білкових маркерних систем, а саме високомолекулярних субодиниць глютеніна, гліадинів, білків насіння тощо [208, 211]. Оскільки на сьогодні ДНК-маркери є невід'ємною складовою молекулярно-генетичних досліджень, вони в повній мірі використані для оцінки біорізноманітності, генетичної однорідності та філогенетичних зв'язків різних видів та популяцій *Aegilops*. В літературі описані дані щодо використання довільних ДНК-маркерів для вивчення генетичної різноманітності різних видів егілопсів, а саме RAPD, AFLP [212, 213], ISSR [214, 215], SSR [215], RFLP [216] тощо. Однак дані щодо використання ген-специфічних ДНК-маркерних систем для молекулярно-генетичного аналізу *Ae. biuncialis*, є досить обмеженими. Опубліковані результати аналізу

популяції егілопсу з використанням ТВР-маркерів [131]. Однак залишається доцільним подальше вивчення генетичних характеристик вибірок *Ae. biuncialis* з використанням новорозроблених ДНК-маркерів, що оцінюють поліморфізм довжини інтронів генів актину.

На даному етапі дослідження був проведений аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників природних популяцій *Ae. biuncialis*, зібраних на території Кримського півострову (Україна) (Рис. 4.1). Генотипування та диференціацію зразків егілопсу проводили з використанням підходу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. На сьогодні в геномних базах даних відсутня достовірна інформація про кількість та екзон-інтронну структуру генів актину, закодованих в геномі *Ae. biuncialis*, а отже неможливо достовірно передбачити розміри утворюваних фрагментів інтронів. Зважаючи на це, в даному дослідженні аналізувалися всі утворені під час ПЛР амплікони.

Аналіз 14 популяцій егілопсу двухдьюмового показав стабільне утворення фрагментів інтронів генів актину, які розподілялися в межах від 600 до 2000 п. н., утворюючи специфічні ДНК-профілі. Найбільш щільно амплікони інтронів розподілялися в зоні від 600 п. н. до 1000 п. н. В кожному проаналізованому зразку *Ae. biuncialis* утворювалось від 10 до 14 фрагментів, що, ймовірно, містили гени актину. В межах даної вибірки лише 4 амплікони інтронів були мономорфними, а саме амплікони з довжинами близько 709 п. н., 745 п. н., 761 п. н. та 815 п. н. Саме наявність цих фрагментів в ДНК-профілях всіх зразків свідчить про їх приналежність до одного виду. Однак, переважна більшість фрагментів виявилися поліморфними, оскільки їх розподіл та кількість значно відрізнялися між проаналізованими популяціями *Ae. biuncialis*. Наприклад, популяція НК 02 (Рис. 4.1, зразок 1) відрізняється від всіх інших досліджених популяцій, оскільки вона має два унікальні фрагменти з довжинами близько 697 п. н. та 1424 п. н., і зовсім відсутні амплікони в діапазоні від 1000 до 1200 п. н. На електрофореграмі розташування поліморфних фрагментів позначене стрілками.

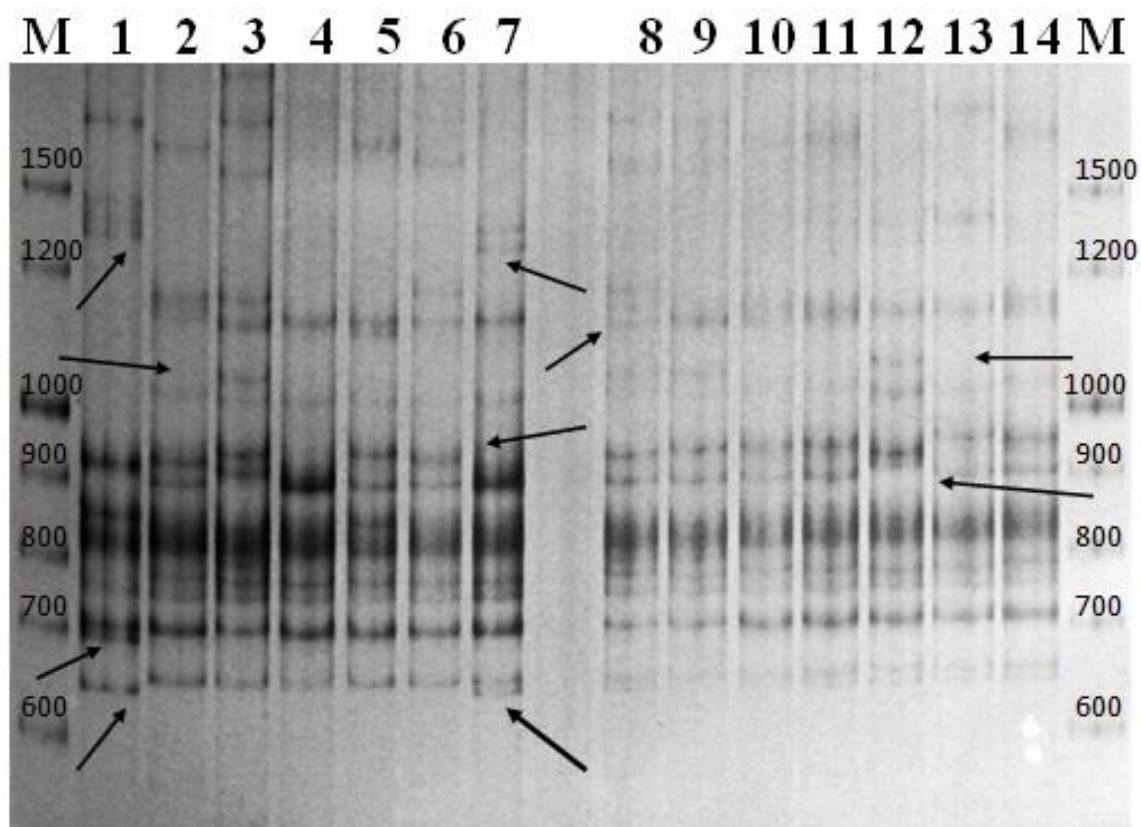


Рис. 4.1. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину природних популяцій *Ae. biuncialis* з півострову Крим (Україна): 1 – НК 02, 2 – НК 010, 3 – НК В1-1, 4 – НК 11-2, 5 – НК ММ7-3, 6 – НК ММВ-1, 7 – НК 13-1, 8 – НК 6-2, 9 – НК 4N2, 10 – НК 1-І, 11 – НК ОZ-2, 12 – НК 10-3, 13 – НК ММ2-1, 14 – НК 14-12. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначені поліморфні фрагменти інтронів генів актину.

Оцінюючи рівень поліморфізм показано, що кожен з проаналізованих зразків *Ae. biuncialis* має унікальний алельний фенотип. Загалом, виявлено 14 алельних фенотипів, а розраховане значення *PIC* становить 0,97, що характеризує дану популяційну вибірку *Ae. biuncialis* як високо гетерогену та генетично-неоднорідну. Дані отримані з використанням методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, підтверджують дані, отримані з використанням інших ДНК-маркерів, зокрема AFLP, ISSR, TBP [213, 214, 131].

В цілому, розроблений метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину продемонстрував здатність генотипувати та чітко диференціювати природні популяції *A. biuncialis* між собою. Виявлено спільні фрагменти інтронів генів актину, які свідчать про приналежність зразків до одного виду. Вдалося ідентифікувати значну кількість поліморфних зразків, що дозволило оцінити ДНК-профілі кожної з досліджуваних популяцій та диференціювати їх. Отже підхід для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину виявився інформативним інструментом для генотипування та диференціації природних популяцій *A. biuncialis* і може бути використаний у подальшому молекулярно-генетичному аналізі інших дикорослих родичів злакових культур.

Результати експериментальних досліджень підрозділів 4.1.1., 4.1.2, 4.1.3 наведено в публікаціях:

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. **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.
3. **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.

4.2. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників роду *Linum*

Рід *Linum* належить до родини двудольних *Linaceae* та нараховує близько 200 видів та сотні різних сортів. Одним з найбільш поширених представників цього роду є льон звичайний або льон-довгунець (*L. usitatissimum*), який є однією з найдавніших сільськогосподарських культур та широко використовується в різних галузях промисловості [217]. На сьогодні льон-довгунець належить до основних олійних та прядильних культур світу. Зокрема лляна олія, вміст якої в насінні може досягати 40 %, є цінною харчовою добавкою через високий вміст вітамінів та жирних кислот. Зі стебел льону отримують волокно, що широко використовується для продукції різних видів тканин. Практичне використання має 95-98 % маси лляної рослини. Окрім того, льон є однорічною трав'янистою культурою і зручним об'єктом для проведення різноманітних генетичних та селекційних досліджень [218].

Зважаючи на широке використання льону-довгунця в різних сферах господарства, він є важливим об'єктом різноманітних селекційних програм, в результаті чого створено різні сорти, що розрізняються рядом цінних характеристик (стресова стійкість, продуктивність, якість волокон, ліпідний склад насіння тощо) [218]. Повсякчас перед селекціонерами постають питання щодо ефективного відбору батьківських ліній, оцінки генетичної чистоти отриманих сортів, встановлення генетичних зв'язків між ними. Для вирішення таких проблем необхідним є наявність відпрацьованих, інформативних та надійних ДНК-маркерних систем. В попередні роки з метою генетичної диференціації та ідентифікації генотипів льону-довгунця використовували переважно лише довільні ДНК-маркери, серед них RFLP, RAPD, SSR, ISSR, [30, 47, 66, 67, 83] тощо. На сьогодні інформація щодо використання ген-специфічних ДНК-маркерних систем для молекулярно-генетичного аналізу представників роду *Linum*, є достатньо обмеженою.

Зокрема, опубліковані данні про використання ТВР-маркерів для проведення молекулярно-генетичного аналізу видів, сортів та ландрас льону [219. 220].

Таким чином, питання щодо пошуку нових ген-специфічних ДНК-маркерних систем, які б дозволили якісно генотипувати льон, залишається відкритим. Зважаючи на це оцінено можливість використання новоствореної ДНК-маркерної системи для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину для ДНК-профілювання та диференціації сортів та видів льону.

4.2.1. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину сортів льону-довгунця з використанням ген-специфічних праймерів

В результаті аналізу екзон-інтронної структури генів актину льону-довгунця (*L. usitatissimum*) були підібрані та синтезовані три пари ген-специфічних праймерів, за допомогою яких можливо оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону генів актину Lus10021057 та Lus10029286 одночасно, Lus10040826, Lus10016259 (Табл 2.3, Рис. 3.4, 3.5, 3.6). На електрофореграмі (Рис. 4.5) представлені результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину Lus10021057 та Lus10029286 у 10 сортів льону-довгунця зарубіжної та вітчизняної селекції. Варто зазначити, дослідження проводили з використанням власно підібраних специфічних ПЛР-праймерів Lus-F та Lus-R. Варто зазначити, що згідно біоінформатичного аналізу генів актину у льону-довгунця, була передбачена поява фрагментів, що містять цільові інтрони, довжинами близько 906 п. н. для гену Lus10021057 та 961 п. н. – для гену Lus10029286.

На Рис. 4.5 продемонстрована поява двох смуг ампліконів інтронів генів актину. Основна зона розподілення фрагментів знаходиться в діапазоні від 1000 до 700 п. н. Верхня смуга містить фрагменти однакової довжини близько 913 п. н., які, ймовірно, відповідають II інтрону гена Lus10029286 льону-довгунця, однак поліморфізму довжини інтронів даних генів не було виявлено. В межах нижньої смуги містяться поліморфні амплікони інтронів

гена актину Lus10021057, довжини яких складають близько 820 п. н. та 780 п. н. Для сортів ‘Глазур’, ‘Електра’, ‘Світанок’, ‘Светоч’ та ‘Хейя 15’ довжина утворених фрагментів інтронів склала 820 п. н., а для сортів ‘Ескаліна’, ‘Антей’, ‘Л-1120’ та ‘Хейя 13’ – близько 780 п. н. Варто зазначити, що в результаті поведеного ПЛР-аналізу виявлено утворення лише цільових ампліконів, а будь-які нечіткі фрагменти, що характерні для продуктів неспецифічного зв’язування праймерів, повністю відсутні.

Виходячи з виявленого поліморфізму II-го інтрону генів Lus10021057 та Lus10029286 льону-довгунця у даній вибірці сортів, було розраховано значення *PIС*, яке склало 0,48. Загалом продемонстрований середній рівень поліморфізму в даній вибірці сортів льону-довгунця.

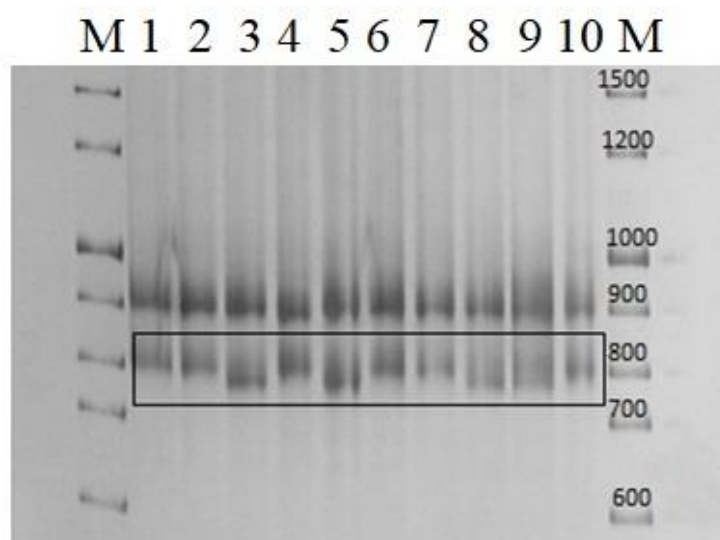


Рис. 4.5. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину Lus10021057 та Lus10029286 у сортів льону-довгунця: 1 – ‘Глазур’, 2 – ‘Зенга’, 3 – ‘Ескаліна’, 4 – ‘Електра’, 5 – ‘Антей’, 6 – ‘Світанок’, 7 – ‘Светоч’, 8 – ‘Л-1120’, 9 – ‘Хейя 13’, 10 – ‘Хейя 15’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутником виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину.

На наступному етапі дослідження було проведено оцінку поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів льону-довгунця української селекції з

використанням трьох пар власних ген-специфічних праймерів до генів актину Lus10021057, Lus10029286, Lus10040826 та Lus10016259 льону.

На Рис. 4.6, А представлена електрофореграма з результатами аналізу 15 обраних сортів льону-довгунця української селекції за локусами Lus10021057 та Lus10029286. Основна зона розподілення фрагментів знаходиться в діапазоні від 1000 до 700 п. н. На електрофореграмі показано наявність двох чітких смуг ампліконів. Верхня смуга містить фрагменти довжиною близько 913 п. н. і відсутній жодний поліморфізм в даній зоні. В межах нижньої смуги знаходяться фрагменти різної довжини, що відповідають інтрону гену Lus10021057 (зона виділена прямокутником). Для сортів ‘Есмань’, ‘Зоря 87’, ‘Сіверський’, ‘Каменярь’, ‘Журавка’, ‘Іванівський’, ‘Вручий’, ‘Глазур’, ‘Міандр’, ‘Рушничок’, ‘Гладіатор’ та ‘Надія’ характерний амплікон довжиною близько 820 п. н., а у сортів ‘Чарівний’, ‘Глобус’ та ‘Глінум’ наявний фрагмент близько 780 п. н., що і вирізняє їх. Варто зазначити, що отримані на даному етапі результати повністю узгоджуються з даними представленими вище.

Електрофореграма (Рис. 4.6, Б) ілюструє результати аналізу сортів льону-довгунця за допомогою праймерів до гена актину Lus10040826. Утворені фрагменти, що містять інтрони генів актину, розташовані в діапазоні від 600 до 1600 п. н. У кожному із 16 зразків утворилося по 4 фрагменти. Всі амплікони – мономорфні та мають розміри близько 1530, 1265, 750 та 676 п. н. Зважаючи на попередній біоінформатичний аналіз гена Lus10040826, очікувалось отримати фрагмент II-го інтрону гену розміром 676 п. н. Однак, появу ряду інших ампліконів можна пояснити тим, що ділянки віджигу праймерів на II та III екзонах генів актину *L. usitatissimum* є висококонсервативними, тому крім цільового фрагмента гена Lus10040826, можуть утворюватися ще три амплікони, які потенційно також є фрагментами генів актину. Однак, це питання потребує додаткових досліджень. Загалом, використання ген-специфічних праймерів до гена

Lus10040826 *L. usitatissimum*, не дозволило виявити поліморфізму довжини II-го інтрону генів актину у сортів льону-довгунця.

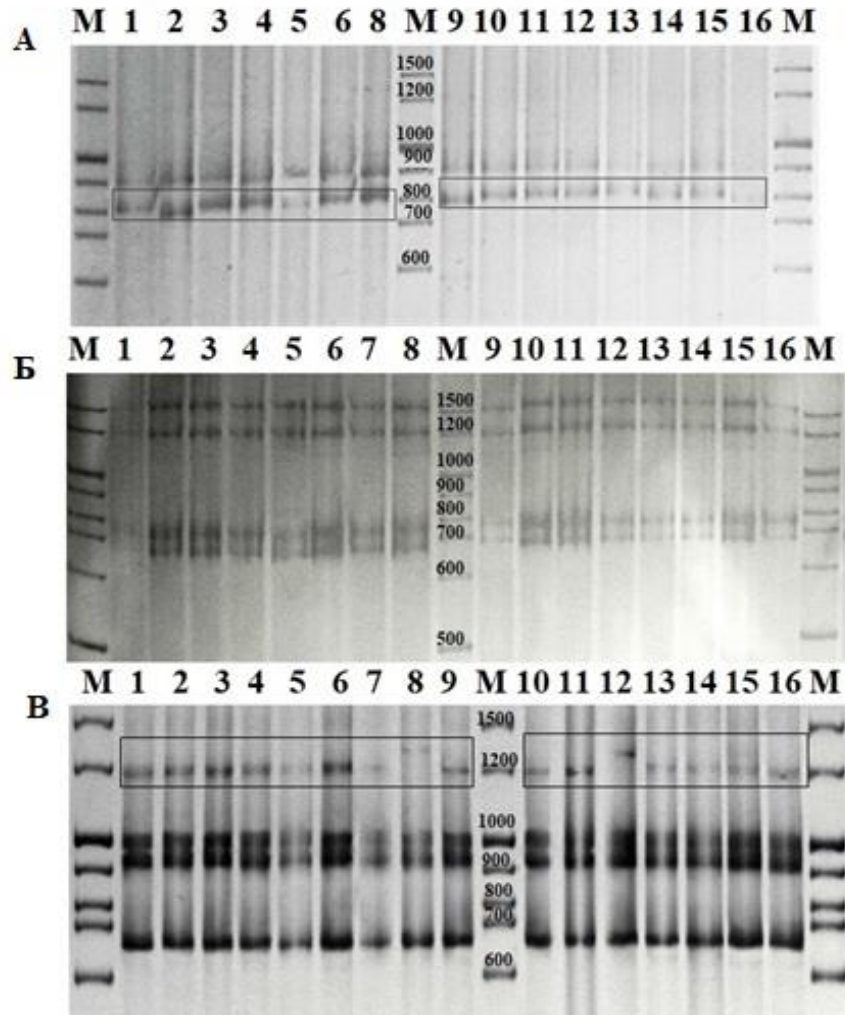


Рис. 4.6. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів льону-довгунця, отриманих за допомогою праймерів до генів актину Lus10021057 та Lus10029286 (А), Lus10040826 (Б) та Lus10016259 (В): 1 – ‘Есмань’, 2 – ‘Чарівний’, 3 – ‘Зоря 87’, 4 – ‘Сіверський’, 5 – ‘Каменярь’, 6 – ‘Журавка’, 7 – ‘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.

На Рис. 4.6, В продемонстровані результати аналізу поліморфізму довжини II інтрону генів актину у 16 сортів льону-довгунця української селекції, отримані з використанням пари ген-специфічних праймерів до гена актину Lus10016259 *L. usitatissimum*. Зважаючи на результати біоінформатичного аналізу гена Lus10016259 *L. usitatissimum*, очікувалось отримати фрагмент розміром близько 926 п. н.

Загалом, для кожного сорту льону-довгунця показане уворення 4 чітких ампліконів інтронів генів актину, серед яких три фрагменти охарактеризовані як мономорфні та мають розміри близько 990 п. н., 926 п. н. та 676 п. н. Також візуалізовано поліморфні фрагменти розміром близько 1210 та 1274 п. н. (зона виділена прямокутником). Більшість сортів містили фрагмент 1210 п. н., однак в зразках сортів 'Іванівський' та 'Рушничок' виявлено амплікон довжиною 1274 п. н., що і вирізняє їх серед усіх сортів.

Не виключено, що амплікон розміром близько 926 п. н. відповідає ділянці гена Lus10016259 та містить II інтрон саме цього гена актину. Оскільки в процесі ПЛР праймери відпалюються на високо консервативних ділянках екзонів генів актину *L. usitatissimum*, то чотири інші фрагменти, імовірно, також є інтронами генів актину. Зокрема, спираючись на попередні данні, утворений фрагмент довжиною близько 676 п. н. відповідає гену Lus10040826. Походження фрагментів довжиною близько 1274, 1210 та 990 п. н. потребує додаткових досліджень.

Рівень поліморфізму у сортовій вибірці льону-довгунця української селекції оцінювали шляхом розрахунку значення *PIC*. Для сортів льону, проаналізованих з використанням специфічних праймерів до генів Lus10021057 та Lus10029286 (Рис. 4.6, А) *PIC* дорівнює 0,32. За умов використання праймерів до II-го інтрону гена актину Lus10040826 (Рис. 4.6, Б) у сортів льону-довгунця не виявлено поліморфічних фрагментів інтронів генів актину, а отже значення *PIC* дорівнює 0. Для вибірки сортів льону-довгунця, проаналізованої з використанням специфічних праймерів до гена актину Lus10016259 (Рис. 4.6, В), значення *PIC* склало 0,22.

Загалом, на даному етапі дослідження показана стабільна ампліфікація II-х інтронів наступних генів актину: Lus10021057, Lus10029286, Lus10040826, Lus10016259 та ще ряду фрагментів, які найімовірніше також є інтронами генів актину льону-довгунця. Виявлений поліморфізм інтронів за двома праймерами до генів актину льону-довгунця Lus10021057 та Lus10029286, і гена Lus10016259.

Отже, аналіз льону-довгунця української та зарубіжної селекції, з використанням ген-специфічних праймерів, показав здатність підходу, що заснований на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів актину, виявляти різницю між генотипами льону на міжсорттовому рівні.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.2.1. наведено в публікаціях:

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

2. **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 разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).*

4.2.2 Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину з використанням вироджених праймерів у видів льону та сортів льону-довгунця української селекції та білоруських ландрас

Було проведено аналіз 28 сортів льону-довгунця української селекції і білоруських ландрас та двох різних видів льону (льон дворічний (*L. bienne*) та

льон вузьколистий (*L. angustifolium*)) з використанням власних універсальних вироджених праймерів (Рис. 4.7, 4.8).

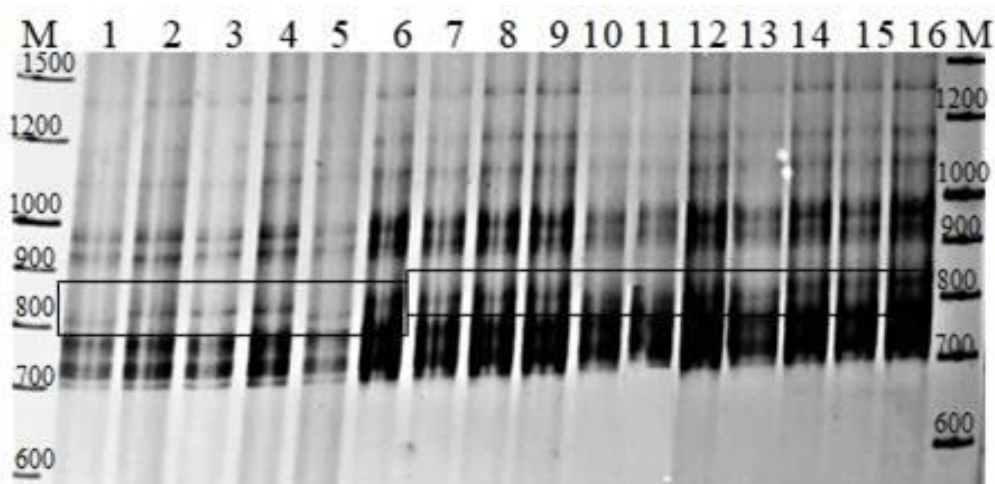


Рис. 4.7. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів льону-довгунця української селекції: 1 – ‘Надія’, 2 – ‘Гладіатор’, 3 – ‘Вручий’, 4 – ‘Сіверський’, 5 – ‘Міандр’, 6 – ‘Чарівний’, 7 – ‘Глазур’, 8 – ‘Журавка’, 9 – ‘Глухівський ювілейний’, 10 – ‘Глобус’, 11 – ‘Каменярь’, 12 – ‘Есмань’, 13 – ‘Іванівський’, 14 – ‘Зоря 87’, 15 – ‘Глінум’, 16 – ‘Рушничок’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину.

В результаті проведеного аналізу, продемонстровано уворення видоспецифічних ДНК-профілів, що містили амплікони інтронів генів актину. ДНК-профіль кожного зразка льону-довгунця представлений мінімум 10 фрагментами інтронів генів актину, довжини яких варіювали в межах від 700 п. н. до 1200 п. н. Загалом проаналізовані сорти льону-довгунця містили поліморфні фрагменти інтронів в діапазоні довжин від 800 п. н. до 900 п. н., що дало можливість диференціювати їх між собою. Також у сортів ‘К-604’ льону-довгунця білоруської селекції (Рис. 4.8, зразок 8) виявлений унікальний амплікон інтрону гена актину довжиною близько 1127 п. н. Всі інші амплікони виявилися ідентичними для всіх проаналізованих зразків. Варто однак зазначити, що фрагменти довжиною більше 1500 п. н. не

аналізувалися, оскільки їх існування не було передбачено попередньо проведеним біоінформатичним аналізом.

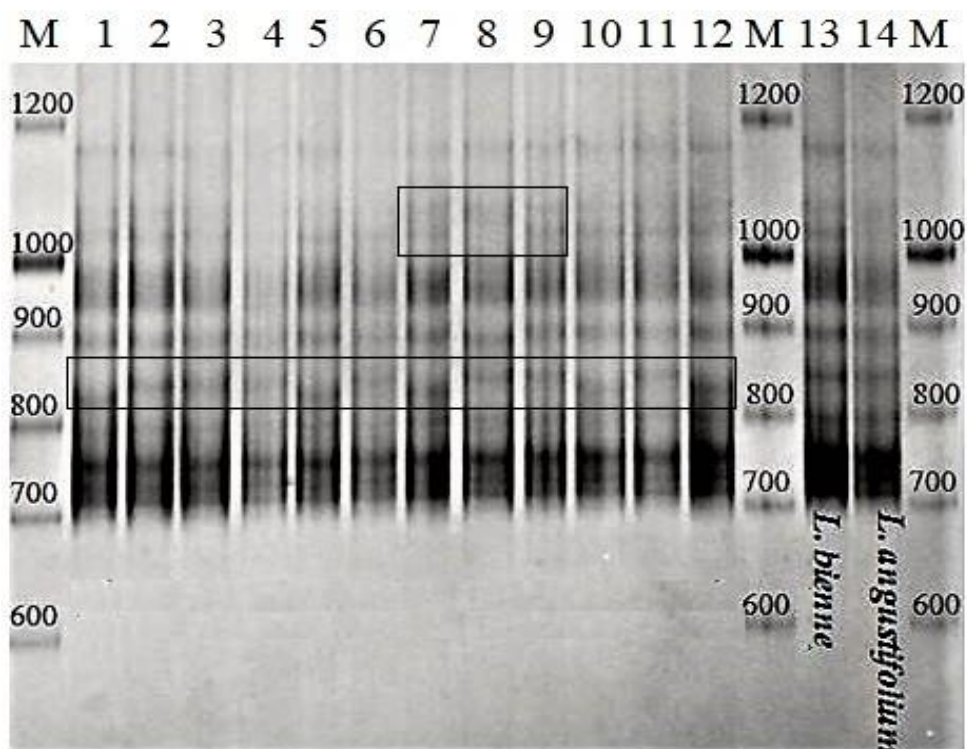


Рис. 4.8. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину видів льону та білоруських ландрас льону-довгунця: 1 – ‘К-790’, 2 – ‘К-5330’, 3 – ‘К-5455’, 4 – ‘К-5451’, 5 – ‘К-5460’, 6 – ‘К-5992’, 7 – ‘К-603’, 8 – ‘К-604’, 9 – ‘К-5990’, 10 – ‘К-6601’, 11 – ‘К-37’, 12 – ‘К-7236’, 13 – *L. bienne*; 14 – *L. angustifolium*. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділені поліморфні фрагменти інтронів генів актину.

Встановлено, що для сортів льону-довгунця білоруської селекції характерна поява трьох різних унікальних алельних фенотипів, PIC дорівнює 0,57, а у сортів льону-довгунця української селекції встановлено два алельні фенотипи та PIC – 0,43. Отримані результати свідчать, що обидві вибірки льону-довгунця є генетично гетерогенні, хоча рівень поліморфізму у сортів білоруської селекції дещо вищий.

Також, за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину проведено генотипування різних видів льону, зокрема льону

дворічного (*L. bienne*) та льону вузьколистого (*L. angustifolium*) (Рис. 4.8, зразки 13, 14). Проведене генотипування цих видів льону показало утворення ДНК-профілів, які містили інтрони генів актину. 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* [221], так само як продемонстрована і висока спорідненість саме *L. bienne* та *L. angustifolium* [222, 223]. Однак дослідження з використанням ДНК-маркерів показали дуже високу спорідненість всіх трьох видів льону, а також, що *L. bienne* може розглядатися як підвид *L. usitatisimum*, так і як окремий вид льону [224].

Отже, в результаті проведених досліджень вперше вдалося проаналізувати поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних сортів та видів льону-довгунця з використанням новорозроблених універсальних ДНК-маркерів. Було отримано видоспецефічні ДНК-профілі льону та диференціовано сорти льону-довгунця української на білоруської селекції на міжсорттовому рівні. Показано, що вибірки льону-довгунця білоруських ландрас виявилися більш генетично гетерогенними, ніж українські сорти. Одночасно не виявлено різниці між ДНК-профілями *L. bienne* та *L. angustifolium*, що свідчить про їх високу генетичну спорідненість.

В цілому продемонстровано доцільність використання підходу для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для генотипування та диференціації різних генотипів представників роду *Linum*.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.2.2. наведено в публікації:

1. **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. 40.

4.2.3. Внутрішньосортова оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у 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 насіння кожного з 16 сортів льону-довгунця української селекції випадковим чином обирали 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. 2.3). Джерелом поліморфізму в цьому випадку є II-й інтрон генів актину.

16 сортів льону-довгунця української селекції було оцінено на предмет наявності внутрішньосортового поліморфізму інтронів генів актину з використанням специфічних праймерів до гена *Lus10016259* (Рис. 4.9). Внаслідок проведеної ПЛР та електрофоретичного розділення її продуктів було отримано ряд фрагментів, які містять інтрони актину, що розташовувалися в діапазоні від 600 п. н. до 1300 п. н. Виявлено фрагменти довжиною близько 644 п. н., 676 п. н., 926 п. н., 990 п. н., 1210 п. н. та 1274 п. н. Спираючись на результати попереднього біоінформатичного аналізу гена актину *Lus10016259* очікували отримати фрагмент розміром 926 п. н. Чотири інші фрагменти, імовірно, також містять інтрони генів актину, зокрема фрагмент 676 п. н. відповідає інтрону гена *Lus10040826*.

Походження фрагментів 1274 п. н., 1210 п. н. та 990 п. н. потребує додаткового дослідження.

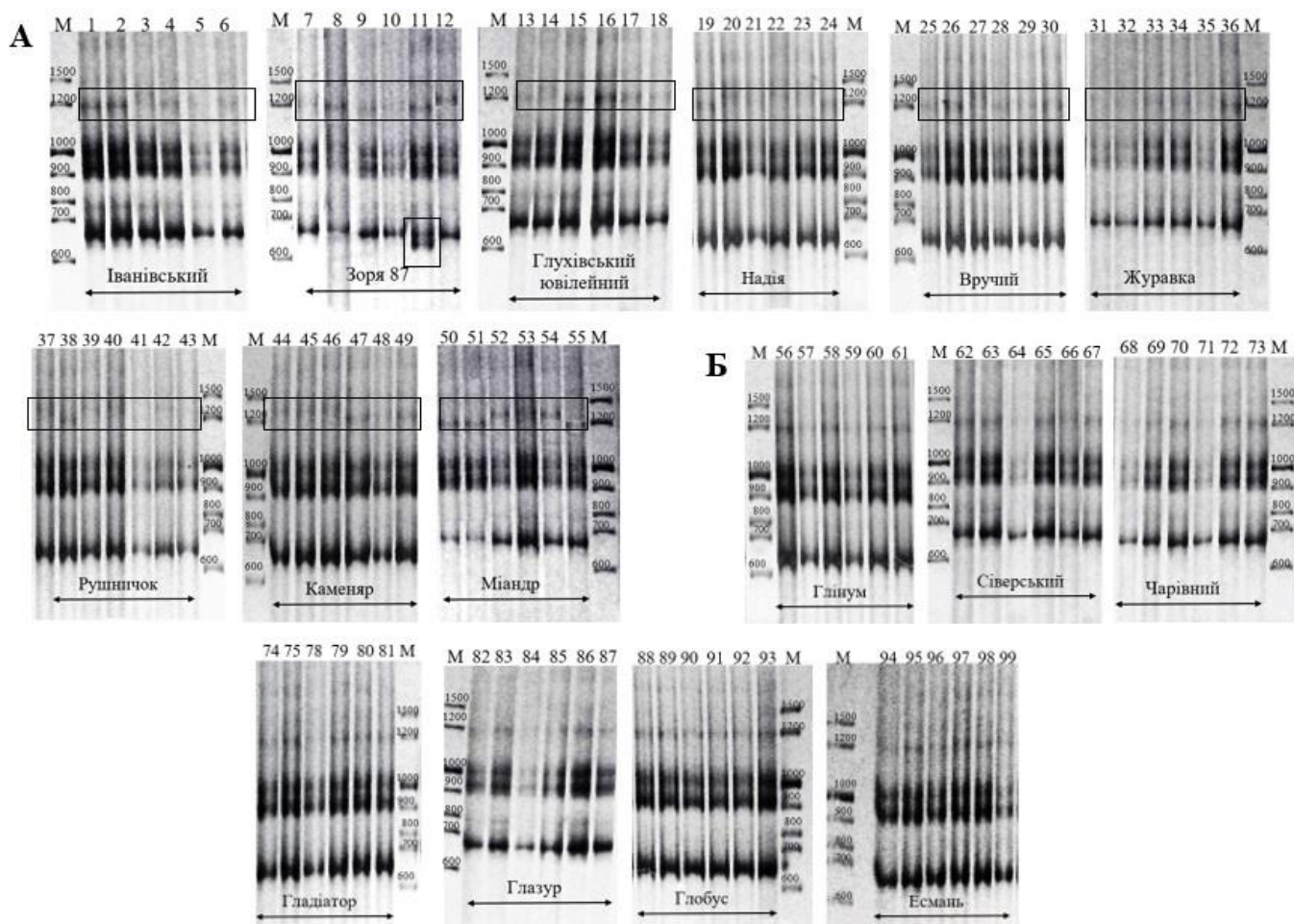


Рис. 4.9. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у сортів льону-довгунця української селекції, отриманих за допомогою праймерів до гена Lus10016259: А – гетерогенні сорти, Б – гомогенні сорти, 1–6 – ‘Іванівський’, 7–12 – ‘Зоря 87’, 13–18 – ‘Глухівський ювілейний’, 19–24 – ‘Надія’, 25–30 – ‘Вручий’, 31–36 – ‘Журавка’, 37–43 – ‘Рушничок’, 44–49 – ‘Каменярь’, 50–55 – ‘Міандр’, 56–61 – ‘Гліну́м’, 62–67 – ‘Сіверський’, 68–73 – ‘Чарівний’, 74–81 – ‘Гладіатор’, 82–87 – ‘Глазур’, 88–93 – ‘Глобус’, 94–99 – ‘Есмань’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділено поліморфні зони ампліконів інтронів генів актину.

Загалом для кожного зразка отримано по чотири стабільні фрагменти інтронів генів актину. Винятком є лише зразок 11 (сорт ‘Зоря 87’) на Рис. 4.9,

для якого характерний унікальний амплікон довжиною 644 п. н., який, імовірно за все, є інтроном гена Lus10040826. Основна зона поліморфних фрагментів інtronів генів актину знаходиться в діапазоні 1200-1300 п. н., яка на електрофореграмі виділена прямокутником.

Більшість сортів льону-довгунця виявилися генетично неоднорідними. Поліморфізм довжини інtronів генів актину встановлено в зразках сортів ‘Іванівський’, ‘Зоря 87’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Надія’, ‘Вручий’, ‘Журавка’, ‘Рушничок’, ‘Каменярь’ та ‘Міандр’. Мономорфними виявилися сорти ‘Глінум’, ‘Сіверський’, ‘Чарівний’, ‘Гладіатор’, ‘Глазур’, ‘Глобус’ та ‘Есмань’.

Рівень поліморфізму для кожного сорту льону-довгунця визначали шляхом розрахунку значення PIC через визначення частоти алельних фенотипів у вибірках. Якщо всі зразки вибірки сортів льону-довгунця мають однакові алельні фенотипи, то PIC дорівнює 0. PIC буде дорівнювати 1 у випадку, коли у вибірці кожен зразок має унікальний алельний фенотип.

Значення PIC , за допомогою якого здійснювали оцінку рівнів поліморфізму для сортів льону-довгунця, коливалась в межах від 0,28 до 0,61. Найвищі значення PIC характерні для сортів ‘Зоря 87’ (0,61), ‘Каменярь’ (0,5) та ‘Міандр’ (0,5). Нижчі значення PIC встановлено для сортів ‘Журавка’ (0,45), ‘Надія’ (0,45), ‘Рушничок’ (0,41), ‘Вручий’ (0,28), ‘Іванівський’ (0,28) та ‘Глухівський ювілейний’ (0,28) (Табл. 4.1). Сорти ‘Чарівний’, ‘Сіверський’, ‘Глінум’, ‘Глобус’, ‘Глазур’, ‘Гладіатор’ та ‘Есмань’ виявилися генетично однорідними, оскільки не містили поліморфних фрагментів і, відповідно, значення PIC було нульовим.

На Рис. 4.10 наведено результати внутрішньовидового аналізу сортів льону-довгунця з використанням інших специфічних праймерів до другого інtronу гена актину Lus10040826. Утворені амплікони варіювали в межах від 600 п. н. до 1600 п. н. Зважаючи на попередньо проведений біоінформатичний аналіз для гена Lus10040826, в результаті ПЛР

передбачали отримати фрагмент розміром 676 п. н. Зважаючи на те, що екзони генів актину є висококонсервативними, під час ампліфікації утворювалось ще три амплікони, які також потенційно могли бути фрагментами генів актину.

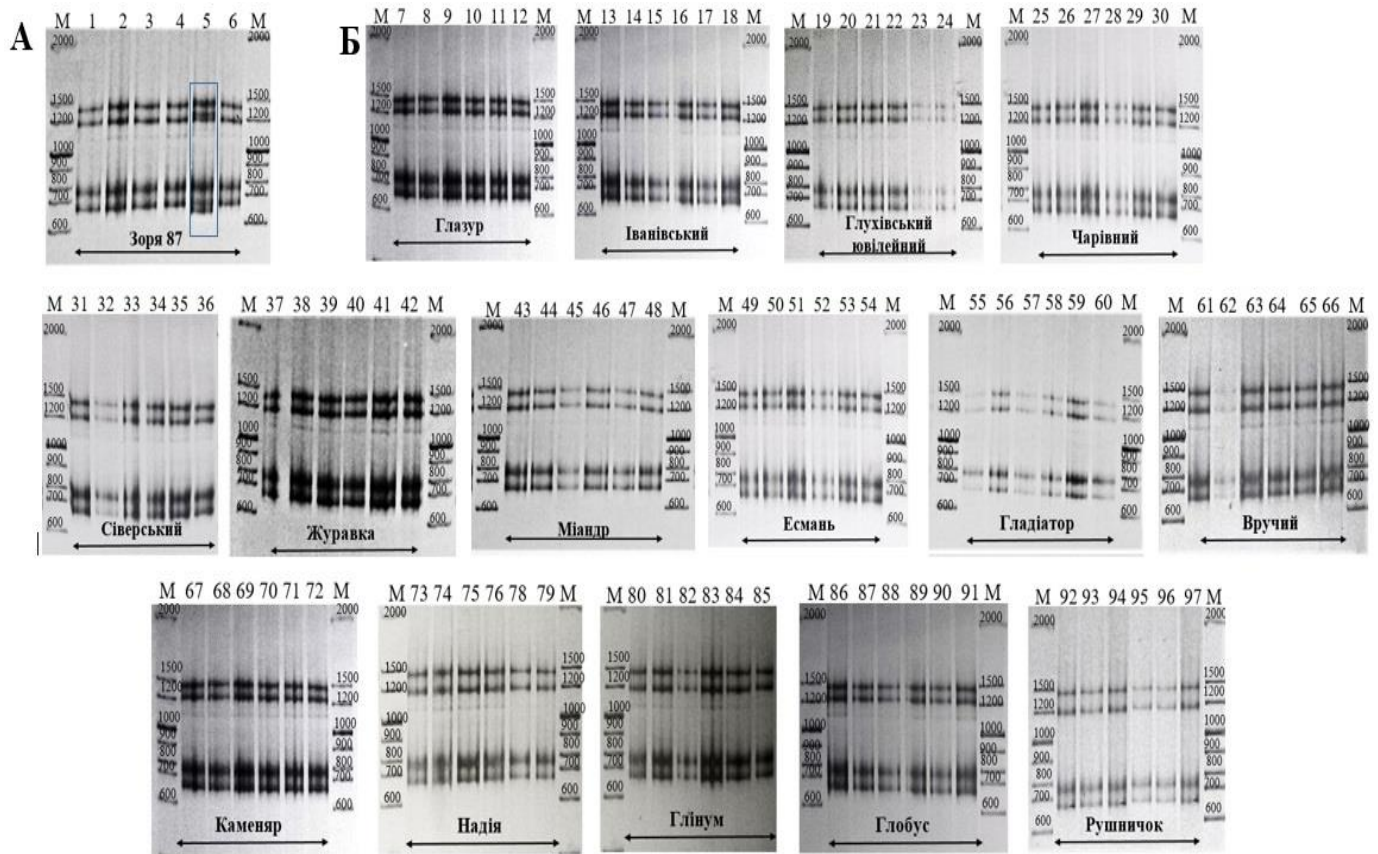


Рис. 4.10. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у сортів льону-довгунця української селекції, отриманих за допомогою праймерів до гена Lus10040826: А – гетерогенні сорти, Б – гомогенні сорти, 1–6 – ‘Зоря 87’, 7–12 – ‘Глазур’, 13–18 – ‘Іванівський’, 19–24 – ‘Глухівський ювілейний’, 25–30 – ‘Чарівний’, 31–36 – ‘Сіверський’, 37–42 – ‘Журавка’, 43–48 – ‘Міандр’, 49–54 – ‘Есмань’, 55–60 – ‘Гладіатор’, 61–66 – ‘Вручий’, 67–72 – ‘Каменярь’, 73–79 – ‘Надія’, 80–85 – ‘Гліум’, 86–91 – ‘Глобус’, 92–97 – ‘Рушничок’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутником виділено зону розташування поліморфних ампліконів інтронів генів актину.

Загалом у кожному зразку виявлено по 4 фрагменти, довжини яких складають близько 676 п. н., 750 п. н., 1265 п. н. та 1500 п. н. У 15 сортів всі амплікони з інтронами генів актину виявилися мономорфними, окрім сорту 'Зоря 87'. В зразку 5 (сорт 'Зоря 87') на Рис. 4.10 зафіксовано появу ампліконів довжиною 1284 п. н. та 1265 п. н. і 676 п. н. та 644 п. н. Найімовірніше, що фрагменти 676 п. н. та 644 п. н. є різними варіантами інтронів гена Lus10040826.

Результати, отримані за допомогою використання праймерів до гена Lus10040826, свідчать про те, що всі сорти (окрім сорту 'Зоря 87') виявились генетично однорідними. Відповідно значення *PIC* для них було нульовим. Рівень поліморфізму для сорту 'Зоря 87' оцінений як 0,28 (Табл. 4.1).

Надалі з метою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину на внутрішньосортовому рівні 16 сортів льону-довгунця української селекції було проаналізовано з використанням власнорозроблених вироджених праймерів ActIn (Табл. 2.3). За результатами проведеного електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації (Рис. 4.11) встановлено утворення специфічних відтворюваних фрагментів інтронів генів актину, які мали розміри від 650 п. н. до 1500 п. н. Для кожного зразка сортів льону-довгунця характерним є утворення щонайменше 10 ампліконів. Найбільш чіткою є смуга в ділянці близько 700 – 800 п. н., яка містить щонайменше 5 фрагментів інтронів генів актину. Саме ця зона є поліморфною, і в ній спостерігається наявність ампліконів довжиною від 800 до 850 п. н. Фрагменти, розташовані вище 900 п. н., виявилися мономорфними для всіх зразків.

Зважаючи на отримані результати, встановлено, що 4 із 16 сортів льону-довгунця виявилися мономорфними за цим маркером, тобто поліморфізму довжини інтронів генів актину виявлено не було. До них належать сорти

‘Есмань’, ‘Сіверський’, ‘Глазур’ та ‘Чарівний’. В той же час у вибірках інших 12 сортів виявлено поліморфні амплікони інтронів (‘Іванівський’, ‘Зоря 87’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Надія’, ‘Вручий’, ‘Журавка’, ‘Рушничок’, ‘Каменяр’, ‘Міандр’, ‘Глінум’, ‘Гладіатор’ та ‘Глобус’). Загалом у більшості сортів виявили по 2 поліморфні зони ампліконів інтронів генів актину в межах досліджуваних вибірок. Серед зразків сорту ‘Гладіатор’ (Рис. 4.11, зразки 53-57) було виявлено 5 фрагментів інтронів різноманітної довжини, що характеризує цей сорт як найбільш гетерогенний та відмінний від інших досліджуваних сортів льону-довгунця.

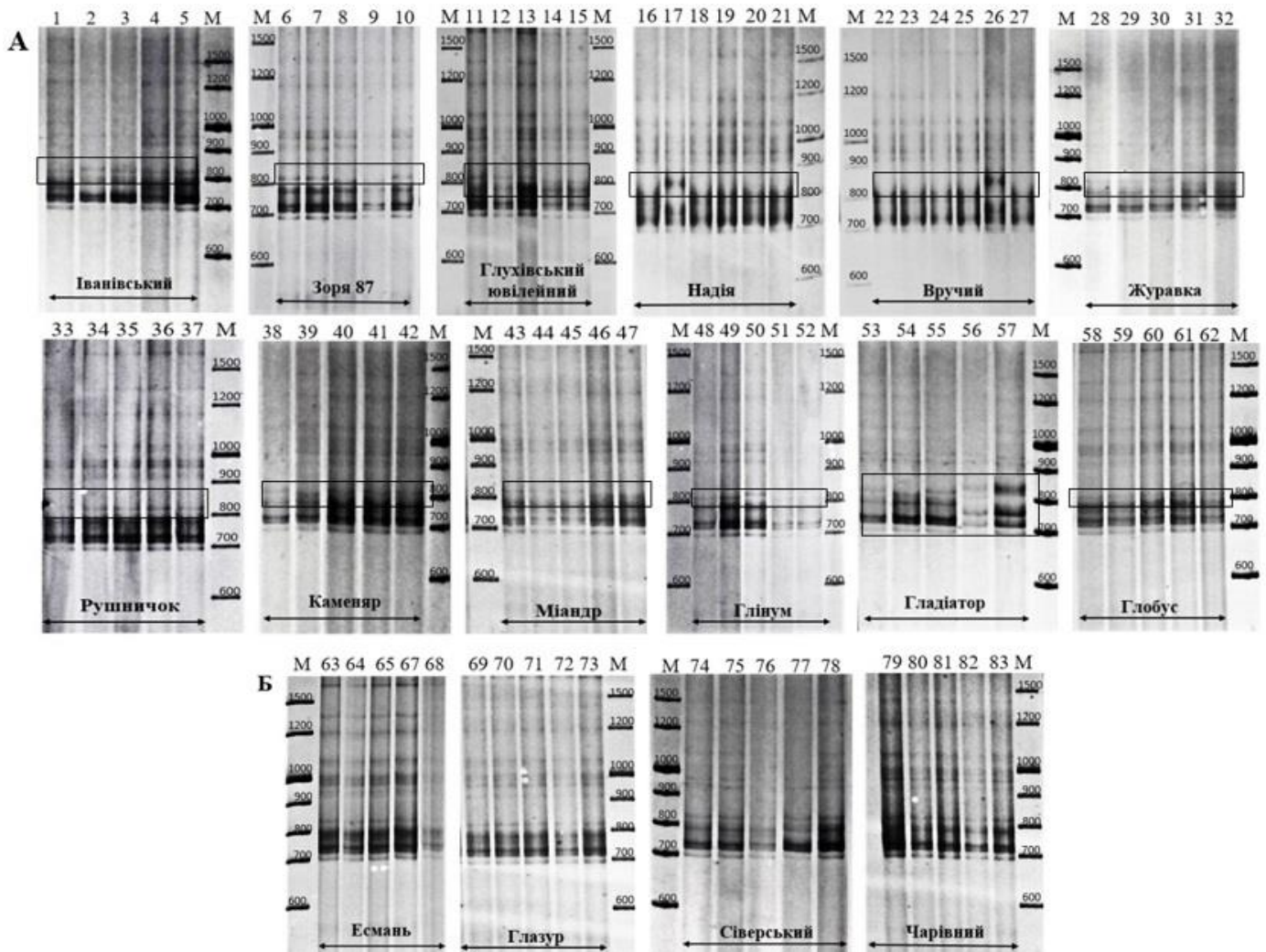


Рис. 4.11. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину у сортів льону-довгунця української селекції, отриманих з використанням вироджених праймерів ActIn: *A* – гетерогенні сорти, *B* – гомогенні сорти, 1–5 – ‘Іванівський’, 6–10 – ‘Зоря 87’, 11–15 – ‘Глухівський ювілейний’, 16–21 – ‘Надія’, 22–27 – ‘Вручий’, 28–32 – ‘Журавка’, 33–37 – ‘Рушничок’, 38–42 – ‘Каменяр’, 43–47 – ‘Міандр’, 48–52 – ‘Глінум’, 53–57 – ‘Гладіатор’, 58–62 – ‘Глобус’, 63–68 – ‘Есмань’, 69–73 – ‘Глазур’, 74–78 – ‘Сіверський’, 79–83 – ‘Чарівний’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділено зону розташування поліморфних ампліконів інтронів генів актину.

В результаті аналізу 16 сортів льону-довгунця з використанням ДНК-маркерної системи, заснованої на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів актину, встановлено, що значення *PIC* для вибірок сортів коливаються

в широких межах від 0,28 до 0,72 (Табл. 4.1). Більшість неоднорідних сортів досліджених сортів льону мали по 2 алельні фенотипи в межах вибірки, саме тому значення *PIC* невисокі (0,28–0,48). Найнижчі значення *PIC* (0,28) мають сорти ‘Вручий’ та ‘Надія’. Для сорту ‘Гладіатор’ *PIC* найвищий – 0,72, зважаючи на присутність 4 алельних фенотипів у вибірці. Отримані дані щодо внутрішньосортного аналізу поліморфізму сортів льону-довгунця за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину наведені в Табл. 4.1.

Загалом використання даного підходу дозволило провести генотипування та оцінити однорідність сортів льону-довгунця української селекції. Встановлено, що переважна більшість сортів льону-довгунця виявились генетично неоднорідними (12 із 16 сортів), а саме ‘Іванівський’, ‘Зоря 87’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Надія’, ‘Вручий’, ‘Журавка’, ‘Рушничок’, ‘Каменярь’, ‘Міандр’, ‘Глінум’, ‘Гладіатор’ та ‘Глобус’. Мономорфними виявилися лише сорти ‘Есмань’, ‘Сіверський’, ‘Глазур’ та ‘Чарівний’, які належать до сортів селекції Інституту луб’яних культур НААН України. Також, для кожної вибірки сортів льону значення *PIC* коливалося в широких межах, від 0,28 до 0,72. Якщо порівнювати результати, отримані з використанням генспецифічних (Рис. 4.9, 4.10) та вироджених (Рис. 4.11) праймерів, то, безперечно, можна зробити висновок, що більш інформативним є використання вироджених праймерів, оскільки за їх допомогою вдалось виявити поліморфізм в сортах ‘Глобус’, ‘Гладіатор’ та ‘Глінум’. Однак, варто зазначити відсутність на Рис. 4.11 поліморфних смуг вище 1200 п. н., наявних при аналізі сортів з використанням специфічних праймерів до генів *Lus10016259* та *Lus10040826*. Природа цих фрагментів невідома і потребує подальшого дослідження.

Таким чином, оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину є принципово новим підходом для оцінки внутрішньосортного поліморфізму культурних сортів льону-довгунця. Продемонстрована доцільність їх

подальшого використання для молекулярно-генетичного аналізу та оцінки генетичної однорідності відселекціонованого сортового матеріалу льону.

4.2.4. Оцінка ефективності ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з SSR-маркерами та TBP-методом на прикладі аналізу внутрішньосортової генетичної різноманітності у сортів льону-довгунця

Під час аналізу внутрішньосортової однорідності сортів льону-довгунця української селекції було перевірено ефективність методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з SSR-маркерами та TBP-методом. В підрозділі 4.2.3., на Рис. 4.9 – 4.11, в Табл. 4.1 представлені результати внутрішньосортового аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину у 16 сортів льону-довгунця української селекції. В результаті аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину 4 сорти льону-довгунця виявилися генетично мономорфними, а саме сорти: ‘Есмань’, ‘Сіверський’, ‘Глазур’ та ‘Чарівний’. Одночасно, 12 із 16 досліджуваних сортів льону-довгунця оцінені як генетично неоднорідні, оскільки у вибірках сортів ‘Іванівський’, ‘Зоря 87’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Надія’, ‘Вручий’, ‘Журавка’, ‘Рушничок’, ‘Каменярь’, ‘Міандр’, ‘Глінум’, ‘Гладіатор’ та ‘Глобус’ виявлені поліморфні зони з ампліконами інтронів генів актину.

Для порівняння ефективності роботи ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину було обрано SSR-маркери. Саме SSR-маркери, на сьогодні є однією з найрозповсюдженіших маркерних систем в сучасній генетиці та широко застосовуються для ідентифікації, диференціації та селекції сільськогосподарських культур, зокрема льону [26, 66, 67, 225].

Таблиця 4.1

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	0,00
‘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
‘Каменярь’	+	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
‘Іванівський’	+	2	0,28	-	1	0,0	+	2	0,32
‘Вручий’	+	2	0,28	-	1	0,0	+	2	0,28

SSR-маркери мають ряд корисних характеристик, а саме: висока щільність покриття геному, гіперваріабельність, кодомінантність, мультиалельність, відтворюваність, які роблять їх більш перспективними в порівнянні з іншими маркерними системами. Зокрема, для оцінки генетичної різноманітності льону-довгунця (*L. usitatissimum*) розроблено SSR-маркери для 28 локусів [67], які вважаються надійним та ефективним методом оцінки генетичної різноманітності на міжвидовому рівні.

Для аналізу внутрішньосортного поліморфізму у льону-довгунця були використані два SSR-маркери, а саме, LU 7 та LU 21, для яких згідно літературних даних притаманне високе значення *PIC*: для LU 7 – 0,750, для LU 21 – 0,625 [67]. Окрім того, для локусу LU 21 у льону-довгунця виявлено три алелі, а максимальна кількість алелів мікросателітного локусу LU 7 – чотири. Зважаючи на опрацьовані літературні дані, саме ці два SSR-локуси доцільно використовувати для оцінки генетичної однорідності сортів льону-довгунця.

На Рис. 4.12 представлені результати аналізу 16 сортів льону-довгунця української селекції за мікросателітним локусом LU 7. За результатами попередньо опрацьованих літературних даних очікувалась поява чотирьох алелей довжиною приблизно 134 – 154 п. н [67]. Проведений аналіз мікросателітного локусу LU 7 виявив утворення шести алелів з довжинами близько 154 п. н., 149 п. н., 147 п. н., 145 п. н., 141 п. н. та 135 п. н. Отримані дані частково не узгоджується з раніше опублікованими літературними даними. Більшість вибірок льону-довгунця містили по 2–3 різних алеля, що характеризує сорти як гетерогенні. Для зразків ДНК сортів ‘Гладіатор’, ‘Глінум’, ‘Журавка’, ‘Чарівний’, ‘Вручий’ та ‘Міандр’ характерною є поява двох алелей різної довжини та в різній кількості. В межах сортів ‘Іванівський’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Зоря 87’, ‘Каменярь’, ‘Рушничок’ та ‘Надія’ виявлено по три мікросателітних алеля. Важливо, що в зразках 46 (сорт ‘Надія’) та 20 (сорт ‘Вручий’) зафіксовано появу двох алелів одночасно (147 п. н. та 141 п. н. і 149 п. н. та 141 п. н. відповідно), що свідчить про

гетерозиготність рослин за SSR-маркером LU 7. Окрім того, у зразків 8 (сорт ‘Чарівний’) та 22 (сорт ‘Журавка’) виявлено фрагмент мікросателіту довжиною 134 п. н., а також лише проба 48 (сорт ‘Надія’) містив унікальний алель довжиною 145 п. н. Результати аналізу мікросателіту LU 7 показали, що чотири сорти льону-довгунця є мономорфними. Сорти ‘Сіверський’, ‘Глазур’ та ‘Глобус’ містили лише один алель довжиною 147 п. н., а сорт ‘Есмань’ – амплікон 141 п. н.

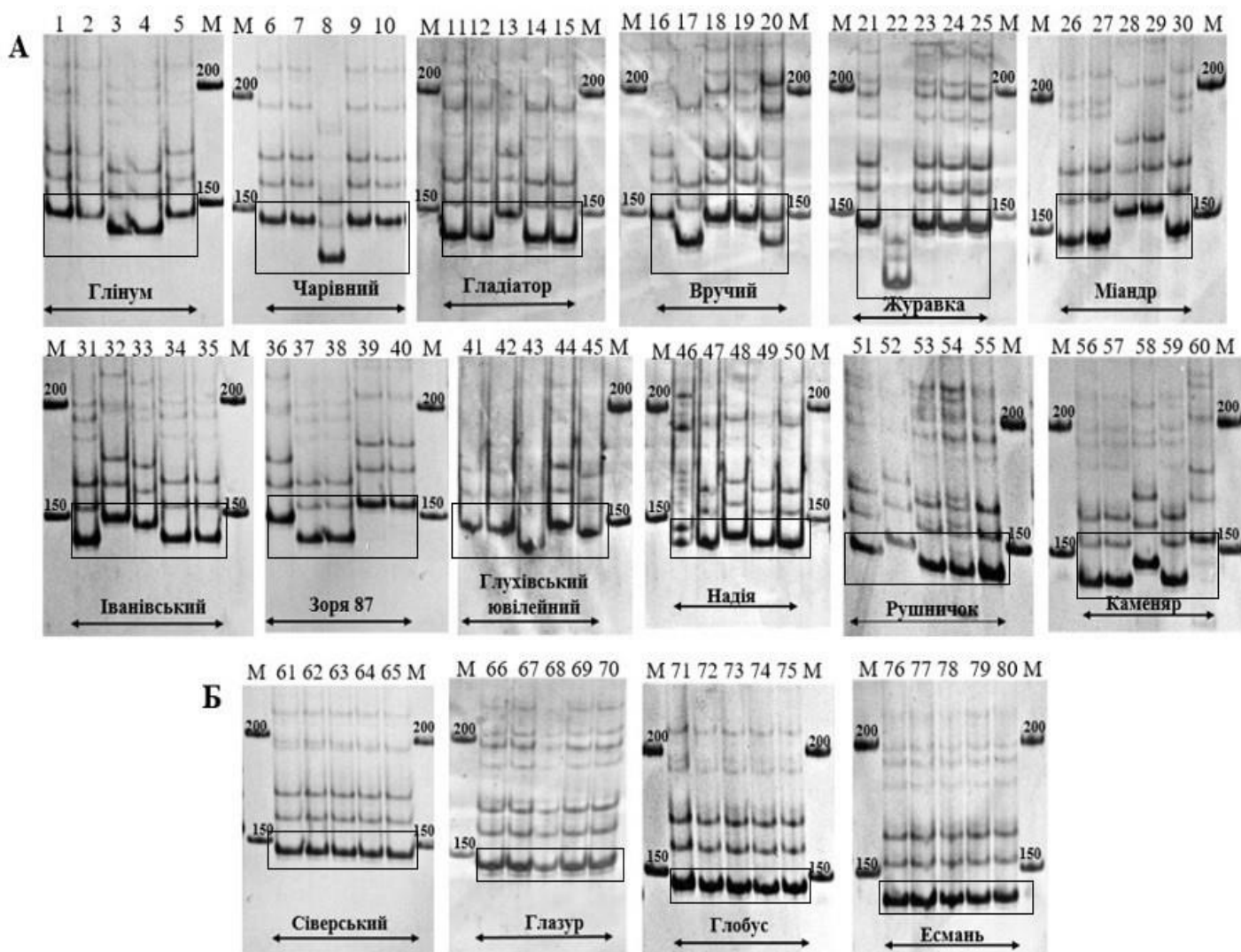


Рис. 4.12. Електрофореграма з SSR-профілями сортів льону-довгунця української селекції, отриманих з використанням SSR-маркеру LU 7: *А* – гетерогенні сорти, *Б* – гомогенні сорти, 1–5 – ‘Гліну́м’, 6–10 – ‘Ча́рівний’, 11–15 – ‘Гладіа́тор’, 16–20 – ‘Вру́чий’, 21–25 – ‘Жу́равка’, 26–30 – ‘Міа́ндр’, 31–35 – ‘Іва́нівський’, 36–40 – ‘Зо́ря 87’, 41–45 – ‘Глу́хівський ювіле́йний’, 46–50 – ‘На́дія’, 51–55 – ‘Ру́шничок’, 56–60 – ‘Ка́меняр’, 61–65 – ‘Сіве́рський’, 66–70 – ‘Глазу́р’, 71–75 – ‘Глобу́с’, 76–80 – ‘Есма́нь’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділено зони розташування алелей мікросателіту.

Рівень поліморфізму для кожного сорту льону-довгунця визначали шляхом розрахунку значення *PIS* через визначення частоти алельних фенотипів у вибірках. Якщо сортова вибірка льону-довгунця містить лише

один алель мікросателіту LU 7, то *PIC* дорівнює 0. *PIC* буде дорівнювати 1 у випадку, коли у вибірці не виявлено жодних спільних алельних фрагментів. В результаті аналізу сортів з використанням SSR-маркера LU 7 значення *PIC* визначені в межах від 0,32 до 0,64. Найнижчі значення *PIC* встановлені для сортів ‘Чарівний’ (0,32), ‘Гладіатор’ (0,32), ‘Журавка’ (0,32) та ‘Глінум’ (0,48). Одночасно найвищі значення *PIC* характерні для сортів ‘Міандр’ (0,64), ‘Зоря 87’ (0,64), ‘Іванівський’ (0,56), ‘Глухівський ювілейний’ (0,56), ‘Надія’ (0,56), ‘Вручий’ (0,56), ‘Рушничок’ (0,56) та ‘Каменярь’ (0,56), що свідчить про їх високий рівень внутрішньосортного поліморфізму та генетичної гетерогенності. В той же час, гомогенними сортами виявилися сорти ‘Есмань’, ‘Глобус’, ‘Глазур’ та ‘Сіверський’, для яких характерне нульове значення *PIC*. Детальні зведені дані наведені в Табл. 4.2.

При дослідженні внутрішньосортного поліморфізму сортів льону виявлено 5 алелей в локусі LU 21 з довжинами 155 п. н., 151 п. н., 147 п. н., 145 п. н. та 141 п. н. (Рис. 4.13). Більшість досліджуваних сортів виявилися гетерогенними, оскільки містили від 2 до 4 різних алелів. Зокрема, лише в межах сорту ‘Зоря 87’ ампліфікувалось по чотири фрагменти різної довжини (155 п. н., 151 п. н., 147 п. н. та 145 п. н.), а сорти ‘Каменярь’ та ‘Іванівський’ містили по три алелі.

Також по два алелі мікросателітного локусу LU 21 виявлено в сортах ‘Рушничок’, ‘Глінум’, ‘Міандр’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Надія’, ‘Гладіатор’, ‘Вручий’, ‘Журавка’ та ‘Чарівний’. Окрім того, в сортах ‘Рушничок’ та ‘Вручий’ виявили наявність двох алелей локусу LU 21 одночасно. Гетерозиготними є зразки 16 (сорт ‘Рушничок’) та зразок 48 (сорт ‘Вручий’) (151 п. н. та 145 п. н.). Унікальний алель довжиною 141 п. н. вирізняє сорт ‘Чарівний’ (зразок 59) серед усіх проаналізованих сортів льонувовгунця. Гомогенними сортами виявилися сорти ‘Есмань’ (145 п. н.), ‘Глобус’ (151 п. н.), ‘Глазур’ (151 п. н.) та ‘Сіверський’ (151 п. н.).

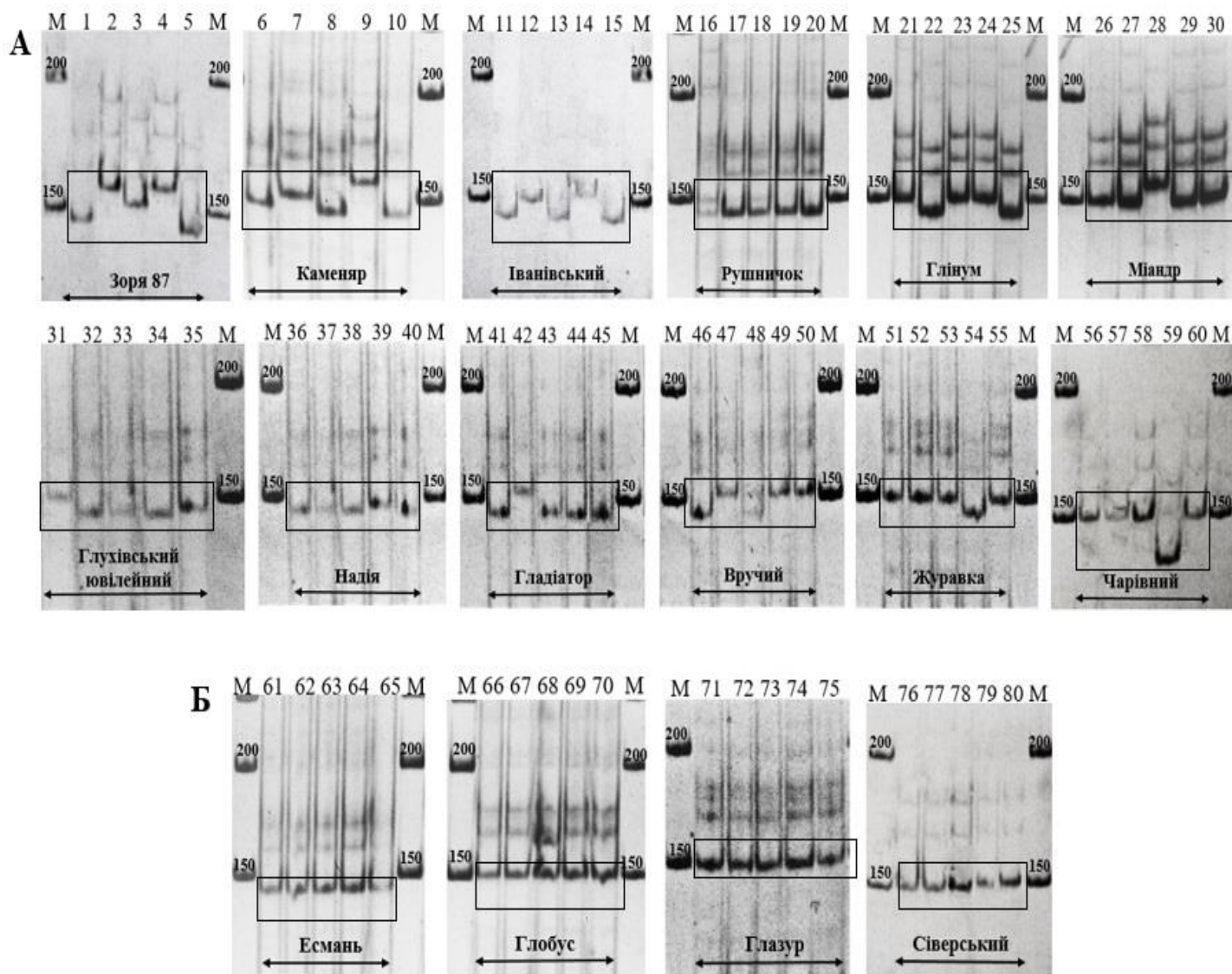


Рис. 4.13. Електрофореграма з SSR-профілями сортів льону-довгунця української селекції, отриманих з використанням SSR-маркера LU 21. *А* – гетерогенні сорти, *Б* – гомогенні сорти. 1–5 – ‘Зоря 87’, 6–10 – ‘Каменяр’, 11–15 – ‘Іванівський’, 16–20 – ‘Рушничок’, 21–25 – ‘Глілум’, 26–30 – ‘Міандр’, 31–35 – ‘Глухівський ювілейний’, 36–40 – ‘Надія’, 41–45 – ‘Гладіатор’, 46–50 – ‘Вручий’, 51–55 – ‘Журавка’, 56–60 – ‘Чарівний’, 61–65 – ‘Есмань’, 66–70 – ‘Глобус’, 71–75 – ‘Глазур’, 76–80 – ‘Сіверський’. М – маркер молекулярної маси. Прямокутниками виділено зони розташування алелей мікросателіту.

Результати аналізу досліджуваних сортів льону-довгунця з використанням SSR-маркера LU 21 виявились не менш інформативними у порівнянні з результатами, отриманими внаслідок аналізу мікросателітного

локусу LU 7. Згідно літературних даних очікували отримати близько трьох алелів, довжини яких коливалися в межах від 140 до 155 п. н. [67], однак отримані дані відрізнялися від опублікованих раніше, оскільки було виявлено 5 різних алелей мікросателіту LU 21.

Результати оцінки рівня поліморфізму свідчать про те, що значення *PIC* для проаналізованих зразків коливалося в широких межах від 0,32 до 0,72 (Табл. 4.2). Найбільш неоднорідними за цим показником виявилися сорти ‘Зоря 87’ (0,72), ‘Каменяр’ (0,56), ‘Вручий’ (0,56) та ‘Іванівський’ (0,56). Найнижчі значення *PIC* характерні для сортів ‘Глухівський ювілейний’ (0,48), ‘Надія’ (0,32), ‘Гладіатор’ (0,32), ‘Журавка’ (0,32) та ‘Чарівний’ (0,32). Для сортів ‘Есмань’, ‘Глобус’, ‘Глазур’ та ‘Сіверський’ значення *PIC* дорівнювало 0,00, оскільки поліморфізм відсутній.

Загалом, результати аналізу досліджуваних сортів льону-довгунця за двома мікросателітними локусами достовірно ілюструють, що більшість з них є генетично неоднорідними. До цієї групи належать сорти ‘Зоря 87’, ‘Каменяр’, ‘Іванівський’, ‘Рушничок’, ‘Глінум’, ‘Міандр’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Надія’, ‘Гладіатор’, ‘Вручий’, ‘Журавка’, ‘Чарівний’. Гомогенними сортами виявилися сорти ‘Сіверський’, ‘Глазур’, ‘Глобус’ та ‘Есмань’ за обома SSR-маркерами. Зведені дані аналізу наведено в Табл. 4.2.

Таблиця 4.2

Аналіз сортів льону-довгунця з використанням SSR-маркерів

Назва сорту	LU 7			LU 21		
	Полімор- фізм (+/-)	Алельний фенотип (к-сть)	<i>PIС</i>	Полімор- фізм (+/-)	Алельний фенотип (к-сть)	<i>PIС</i>
‘Есмань’	-	1	0,0	-	1	0,0
‘Сіверський’	-	1	0,0	-	1	0,0
‘Глухівський ювілейний’	+	3	0,56	+	2	0,48
‘Глобус’	-	1	0,0	-	1	0,0
‘Глазур’	-	1	0,00	-	1	0,0
‘Гладіатор’	+	2	0,32	+	2	0,32
‘Чарівний’	+	2	0,32	+	2	0,32
‘Глінум’	+	2	0,48	+	2	0,48
‘Зоря 87’	+	3	0,64	+	4	0,72
‘Каменярь’	+	3	0,56	+	3	0,56
‘Міандр’	+	3	0,64	+	2	0,32
‘Журавка’	+	2	0,32	+	2	0,32
‘Надія’	+	3	0,56	+	2	0,32
‘Рушничок’	+	3	0,56	+	2	0,32
‘Іванівський’	+	3	0,56	+	3	0,56
‘Вручий’	+	3	0,56	+	3	0,56

Варто зазначити, що під час аналізу на електрофореграмах SSR-локусів (Рис. 4.12 і Рис. 4.13) візуалізували по декілька фрагментів ДНК в кожному зразку, однак нами були проаналізовані лише фрагменти, розташовані найнижче, оскільки саме вони за кількістю нуклеотидів відповідають мікросателітним алелям, описаним раніше в літературі (на рисунках зони, що аналізували виділено прямокутниками) [67]. Важливо, що отримані нами дані частково відрізняються від опублікованих раніше, а саме за кількістю виявлених алелей мікросателітних локусів.

Порівнюючи результати внутрішньосортного аналізу сортів льону-довгунця української селекції, отримані з використання двох принципово різних ДНК-маркерних систем, а саме аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину та SSR-маркерів, доведена ефективність застосування

їх для оцінки генетичної однорідності виборки сортів. Показано, що 11 із 16 сортів льону-довгунця є генетично неоднорідними за обома ДНК-маркерами, серед них сорти: ‘Зоря 87’, ‘Каменяр’, ‘Іванівський’, ‘Рушничок’, ‘Глінум’, ‘Міандр’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Надія’, ‘Гладіатор’, ‘Вручий’, ‘Журавка’. За результатами аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину та мікросателітні локуси виявилось, що 3 сорти льону-довгунця є генетично мономорфними (‘Есмань’, ‘Сіверський’ та ‘Глазур’). Одночасно, не співпадають дані, отримані в результаті аналізу лише двох сортів льону-довгунця, а саме сорти ‘Чарівний’ та ‘Глобус’. Сорт ‘Чарівний’ виявився генетично гетерогенним за LU 7 та LU 21 мікросателітними локусами, однак у нього не було виявлено поліморфізму довжини інтронів генів актину. Також, у вибірці насіння сорту ‘Глобус’ виявлені поліморфні зони з ампліконами інтронів генів актину, однак за мікросателітними локусами цей сорт виявився мономорфним.

Окрім того, нещодавно були опубліковані результати аналізу внутрішньосортового поліморфізму 16 сортів льону-довгунця української селекції з використанням ТВР-методу [9]. ТВР-маркерна система заснована на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну. В даному дослідженні були проаналізовані ті ж самі вибірки сортів льону-довгунця, які аналізувалися за допомогою SSR-маркерів та маркерів, що оцінюють поліморфізм довжини інтронів генів актину. Загалом, опубліковані авторами дані свідчать про те, що 10 із 16 сортів льону-довгунця виявилися генетично неоднорідними за ТВР-аналізом, серед них: ‘Зоря 87’, ‘Каменяр’, ‘Іванівський’, ‘Глінум’, ‘Міандр’, ‘Надія’, ‘Гладіатор’, ‘Вручий’, ‘Журавка’ та ‘Чарівний’. Одночасно гомогенними виявилися сорти ‘Есмань’, ‘Глобус’, ‘Рушничок’, ‘Глухівський ювілейний’, ‘Глазур’ та ‘Сіверський’.

Важливо зазначити, що підхід оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину є дещо подібними до ТВР-методу. Однак, принциповою різницею між цими маркерними системами є гени, поліморфізм інтронів яких аналізується (актин та β -тубулін). Порівнюючи результати аналізу сортів

льону-довгунця з використанням обох підходів, показано здатність кожної з цих маркерних систем ідентифікувати та диференціювати сорти та генотипи льону-довгунця на внутрішньосортовому рівні. Результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину та порівнявши з результатами аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну [9], свідчать про те, що 9 із 16 сортів льону-довгунця української селекції є генетично гетерогенними, серед них 'Зоря 87', 'Каменяр', 'Іванівський', 'Глінум', 'Міандр', 'Надія', 'Гладіатор', 'Вручий', 'Журавка'. Також показано, що 3 із 16 сортів льону-довгунця виявилися мономорфними за обома маркерами, а це сорти 'Есмань', 'Сіверський' та 'Глазур'.

Проведений внутрішньосортовий аналіз льону-довгунця та подальше порівняння результатів показали, що отримані дані дещо відрізняються. Сорти 'Рушничок', 'Глобус' та 'Глухівський ювілейний' визначені як мономорфні за ТВР. Однак вони виявилися гетерогенними під час аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину. Ще однією відмінністю є те, що сорт 'Чарівний' є генетично однорідний за ДНК-маркерами, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів актину, хоча ТВР-метод дозволив ідентифікувати поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у цьому сорті.

В Табл. 4.3 наведено дані внутрішньосортового аналізу сортів льону-довгунця за допомогою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, β -тубуліну (ТВР-метод) та поліморфізм мікросателітних локусів (SSR-маркери).

Проведене порівняння рівня поліморфізму у 16 сортів льону-довгунця для трьох використаних ДНК-маркерних систем, а саме ДНК-маркерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, SSR-маркерів та ТВР-методу. Порівнюючи рівень поліморфізму, показано, що в результаті аналізу вибірок сортів з використанням ДНК-маркерів, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів актину, значення *PIC* коливалося від 0,28 до 0,72. Дослідження сортів льону-довгунця за допомогою LU 7 та LU 21 SSR-

маркерів продемонструвало, що значення *PIC* становить від 0,32 до 0,72. Аналіз вибірок сортів льону-довгунця з використанням ТВР-маркерів показав значення *PIC* – від 0,28 до 0,61.

Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину є принципово новим підходом в генетичних дослідженнях, який ґрунтується на виявленні поліморфізму довжини інтронів таких високо консервативних генів, як гени актину. Тому досить прогнозованими є властивості цих маркерів у порівнянні з SSR-маркерами. Це підтверджено різними значеннями *PIC* під час оцінки однорідності сортового матеріалу льону-довгунця української селекції. Значення *PIC* для мікросателітних локусів виявилися вищі, в порівнянні з даними, отриманими за допомогою маркерів, що базуються на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів актину. Однак, це не свідчить про недостатню роздільну здатність нашого підходу, оскільки для цього дослідження навмисно обирали SSR-маркери з найвищими значеннями *PIC*, тобто, найбільш гіперваріабельні. Навпаки, отримані результати слід інтерпретувати на користь доповнюючих можливостей оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, як нових ДНК-маркерів, разом з широко розповсюдженими SSR-маркерами для молекулярної селекції господарсько-цінних сортів льону-довгунця.

Порівнявши результати оцінки однорідності сортів льону-довгунця з використанням методів оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину (див. в 4.2.3) та β -тубуліну (ТВР-метод) [9], значення *PIC* значно не відрізнялися. Це свідчить про не меншу інформативність новоствореної ДНК-маркерної системи, яка виявляє поліморфізм довжини інтронів генів актину, в порівнянні з популярними ТВР-маркерами. Окрім того, для сорту 'Чарівний' показаний значно вищий рівень поліморфізму інтронів генів актину (*PIC* – 0,72), ніж генів β -тубуліну (*PIC* – 0,32) (Табл. 4.3). Загалом порівняння результатів підтверджує доцільність використання обох ДНК-маркерних систем як інструменту для генотипування та диференціації геномів льону-довгунця.

Загалом проаналізовані сорти льону-довгунця було створено в результаті селекційних програм, в рамках яких чітко контролювали його запилення та схрещування. Внутрішньосортовий аналіз досліджуваних сортів льону-довгунця української селекції з використанням оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, SSR-маркерів та TBP-методу засвідчив генетичну неоднорідність більшості досліджуваних сортів льону-довгунця. Встановлено придатність використання маркерної системи, заснованої на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів актину, для ідентифікації та диференціювання сортів та генотипів льону-довгунця. В даному випадку розроблений підхід оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину продемонстрував вищу ефективність та виявився більш інформативним в порівнянні з широко розповсюдженим TBP-методом. Отримані результати внутрішньосортного аналізу 16 сортів льону-довгунця української селекції доводять той факт, що розроблена ДНК-маркерна система для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину є так само ефективним інструментом як і SSR-маркери. Загалом, підтверджено доцільність використання всіх трьох ДНК-маркерних систем в різноманітних генетичних дослідженнях як разом, так і окремо. Отримані результати, безперечно, мають бути взяті до уваги селекціонерами та можуть бути використані для розробки подальших стратегій відбору сортового матеріалу.

Таким чином за допомогою принципово різних підходів, таких як виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину, оцінка алельного складу мікросателітних локусів, а також результатів аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну, було отримано дані, які підтверджують доцільність подальшого використання цих маркерних систем для оцінки генетичної різноманітності сортів льону-довгунця.

Таблиця 4.3

Оцінка ефективності ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з SSR-маркерами та TBP-методом на прикладі внутрішньосортного 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
‘Каменяр’	+	0,32	+	0,56	+	0,56
‘Міандр’	+	0,48	+	0,64/0,32	+	0,5
‘Журавка’	+	0,48	+	0,32	+	0,61

Продовження таблиці 4.3

‘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 [9].

Результати експериментальних досліджень підрозділів 4.2.3, 4.2.4 наведено в публікації:

1. **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).

4.3. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у представників родини *Solanaceae*

Родина Пасльонові (*Solanaceae*) є однією з найчисельніших родин покритонасінних рослин, до складу якої входять харчові, технічні, лікарські та декоративні культури. Згідно з інформацією бази даних The Plant List (www.theplantlist.org) ця родина налічує близько 2 678 видів рослин, які поділені на 115 родів. Найбільш поширеними сільськогосподарськими культурами серед представників родини *Solanaceae* є томат (*S. lycopersicum*) та картопля (*S. tuberosum*). В межах родини *Solanaceae* ДНК-маркери широко використовуються для дослідження генетичного різноманіття, встановлення філогенетичних зв'язків, створення генетичних карт господарськоцінних ознак, а також в порівняльній геноміці та селекційному доборі [226]. Зокрема для томату та картоплі розроблено та протестовано різні ДНК-маркери, а саме: RAPD [31, 227], RFLP, AFLP [26, 27, 31, 227], SSR [26, 75, 227, 228] тощо. Однак данні, щодо використання ген-специфічних ДНК-маркерних систем та зокрема, ІЛР-маркерів, для молекулярно-генетичного аналізу представників родини *Solanaceae* є досить обмеженими. Саме тому, на сьогодні існує необхідність впровадження нових ефективних підходів, які дозволять виявити поліморфізм довжини інтронів різних генів закодованих в

рослинному геномі, як інструменту для дослідження геномів видів родини *Solanaceae*.

4.3.1. Поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних сортів картоплі

Раніше в підрозділах 3.1 та 3.2 нами були представлені результати біоінформатичного пошуку генів актину в геномі картоплі та з'ясування особливостей їх екзон-інтронної структури. Окрім того, послідовності екзонних ділянок генів актину картоплі були використані для дизайну вироджених універсальних праймерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину у вищих рослин (див. в 3.5). Саме тому дослідженню можливості використання оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для ДНК-профілювання, генотипування та диференціації картоплі на сортовому рівні.

На Рис. 4.14 продемонстровані результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину у 4 сортів картоплі (*S. tuberosum*). Для кожного сорту вдалося отримати специфічні ДНК-профілі, що містили набір ампліконів інтронів генів актину. Кожен сорт картоплі мав не менше 15 фрагментів інтронів генів актину, які розподілялися в діапазоні від 780 п. н. до 2000 п. н. Найбільш щільний розподіл фрагментів ДНК спостерігається в діапазоні від 700 п. н. до 900 п. н. Присутність великої кількості мономорфних ампліконів інтронів актину у ДНК-профілі кожного сорту свідчить про приналежність проаналізованих зразків до одного виду *S. tuberosum*. Однак, сорти картоплі виявилися генетично гетерогеними, оскільки містили поліморфні фрагменти інтронів генів актину, розташування яких на Рис. 4.14 позначено стрілками. Для сортів 'Світанок' та 'Вернісаж' (Рис. 4.14, зразки 1, 4) виявлений амплікон інтрону гену актину довжиною близько 1515 п. н., а у сортів 'Левада' та 'Зарево' (Рис. 4.14, зразки 2, 3) такий амплікон відсутній, однак присутні фрагменти довжинами 1551 п. н. та

1557 п. н. відповідно. Наприклад, у зразку 2 (сорт ‘Левада’) є унікальний амплікон довжиною близько 625 п. н., а в зразку 3 (сорт ‘Зарево’) – 630 п. н.

Зважаючи на кількість та розподіл поліморфних фрагментів інтронів генів актину серед чотирьох проаналізованих сортів картоплі визначено 3 різні алельні фенотипи. Значення *PIC* склало 0,625, що вказує на досить високий рівень поліморфізму в даній сортовій вибірці.

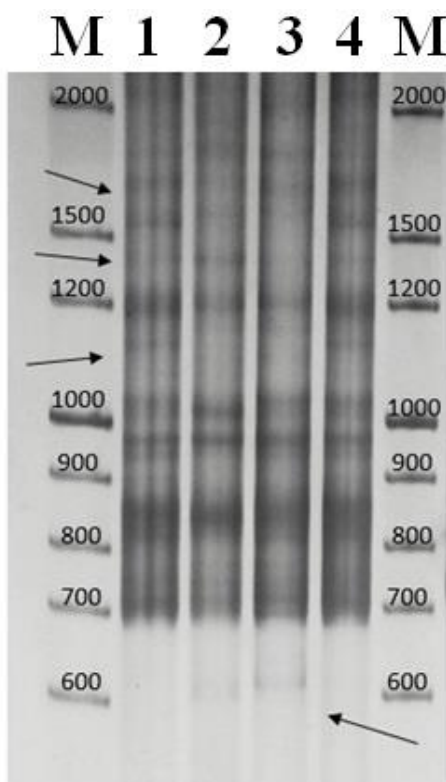


Рис. 4.14. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів картоплі: 1 – ‘Світанок’, 2 – ‘Левада’, 3 – ‘Зарево’, 4 – ‘Вернісаж’. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначені поліморфні фрагменти інтронів генів актину.

Загалом проведений міжсортний аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину картоплі дозволив генотипувати та диференціювати кожен із сортів та отримати ДНК-профілі зі специфічним набором ампліконів інтронів генів актину. У чотирьох сортів картоплі показана поява трьох унікальних алельних фенотипів, а сама вибірка сортів охарактеризована як генетично

гетерогенна. Загалом доведено, що розроблений підхід оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, є ефективним інструментом для проведення молекулярно-генетичного аналізу генотипів картоплі, зокрема під час селекції.

4.3.2. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів томату

Було проведено ДНК-профілювання, генотипування та диференціацію 12 сортів томату (*S. lycopersicum*) шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Для проведення ПЛР використовували власно розроблені універсальні вироджені праймери ActIn (Табл. 2.3). На електрофореграмі продемонстровані ДНК-профілі сортів томату (Рис. 4.15), в межах яких візуалізувалися чіткі смуги фрагментів інтронів генів актину, розташовані в діапазоні довжин від 700 п. н. до 1500 п. н. Варто зазначити повну відсутність нечітких ампліконів на електрофореграмі, які є результатом неспецифічного зв'язування праймерів в процесі ПЛР. Кожен зразок сорту томату містив не менше 7 ампліконів інтронів генів актину. Для кожного зі проаналізованих ДНК-профілів томатів характерним є утворення фрагментів довжинами близько 1486, 1411, 1033, 963, 870 та 846 п. н. Доречно зазначити, що найімовірніше нижня смуга фрагментів складається з двох ампліконів інтронів генів актину довжинами близько 753 п. н. та 743 п. н., які погано розділяються.

Дані, отриманні з використанням ДНК-маркерної системи, що базується на виявленні поліморфізму довжини інтронів генів актину, показали, що 11 із 12 проаналізованих сортів томату виявилися генетично мономорфними, оскільки жодних поліморфних фрагментів інтронів генів актину виявлено не було. Однак у сорту 'Американський Синій' був виявлений амплікон, довжиною близько 1351 п. н. (Рис. 4.15, зразок 10) та показана відсутність

фрагменту інтрону гена актину довжиною близько 1486 п. н., що і вирізняє цей сорт з поміж інших.

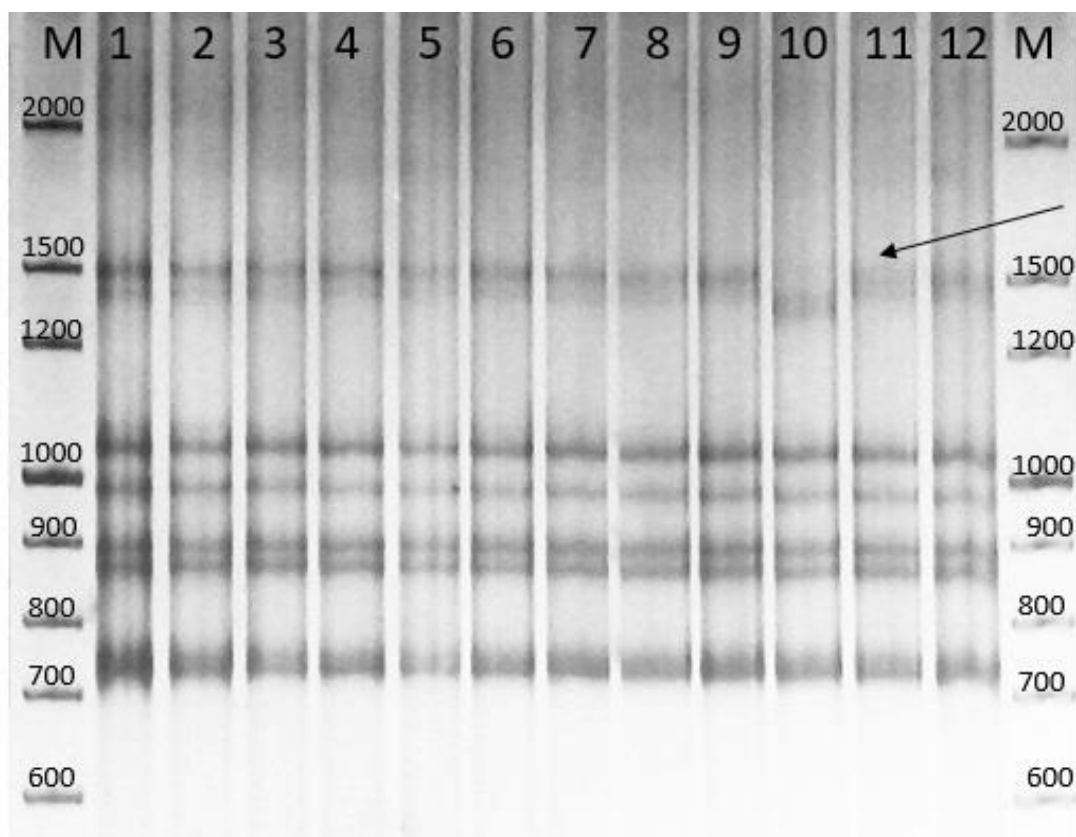


Рис. 4.15. Електрофореграма з ампліконами інтронів генів актину сортів томату: 1 – ‘Money Maker’, 2 – ‘Перлина’, 3 – ‘Волгоградський’, 4 – ‘Балконне Чудо золоте’, 5 – ‘Де Барао чорний’, 6 – ‘Тарасенко рожевий’ 7 – ‘Ефемер’, 8 – ‘Шапка Мономаха’, 9 – ‘Валютний’, 10 – ‘Американський Синій’, 11 – ‘Золотий Горіх’, 12 – ‘Де Барао рожевий’. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначені поліморфні фрагменти інтронів генів актину.

В результаті генотипування сортів томату продемонстровано утворення 2 різних аельних фенотипів, один з яких характерний лише для сорту ‘Американський Синій’. Значення *PIS* дорівнює 0,15, що характеризує дану сортову вибірку як низькополіморфну.

Загалом було отримано видоспецефічні ДНК-профілі кожного з сортів томату, що містили переважну більшість мономорфних фрагментів інтронів

генів актину. Відповідно, вибірка сортів томату може бути охарактеризована як низько поліморфна, оскільки лише сорт 'Американський Синій' вирізнявся серед інших і мав амплікон інтрону гена актину довжиною близько 1351 п. н.

Порівнюючи результати, отримані в результаті аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів томату та картоплі (див. в 4.3.1) показано, що розподіл та кількість утворених фрагментів інтронів генів актину значно відрізнялися. Зокрема, сорти картоплі містять значно більше фрагментів інтронів генів актину, які розподіляються значно щільніше ніж у сортів томату (Рис. 4.14, 4.15). Імовірно, це пов'язано з особливостями селекційного добору сортів картоплі та томату, а також з особливостями запилення представників родини *Solanaceae*.

Важливим є те, що виявлено ряд спільних ампліконів як у сортів томату, так і картоплі. Ці фрагменти інтронів генів актину мають довжини близько 870, 846, 753 та 743 п. н. Наявність спільних ампліконів є передбачуваним явищем та ясно свідчить про приналежність томату та картоплі як видів до одного роду *Solanum* та родини *Solanaceae*. Отримані результати підтверджують генетичну спорідненість та спільне філогенетичне походження даних видів сільськогосподарських культур.

Отже, ДНК-маркерна система для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину в цілому виявилася придатною для ДНК-профілювання та генотипування видів родини *Solanaceae*, незважаючи на те, що диференціація сортів томату за цим видом маркерів виявилася невисокою. Дану маркерну систему доцільно використовувати як окремо, так і в парі з іншими ДНК-маркерами для генотипування та диференціації сортів родини *Solanaceae* під час проведення генетико-селекційних досліджень.

Результати експериментальних досліджень підрозділу 4.3 наведено в публікації:

1. **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. – 287 – С.70-78. (Здобувачем разом зі співавторами проведено дослідження, опрацьовано отримані дані та написано статтю).

4.4. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у різних представників родини *Brassicaceae*

Родина Капустяні (*Brassicaceae* Burnett.) є однією з найчисельніших родин вищих рослин, яка включає близько 360 родів та 3 700 різних видів рослин [229], яка включає велику кількість видів, які мають сільськогосподарську, економічну та наукову цінність. Повне секвенування геному *A. thaliana*, як модельної рослини, відкрило нові можливості в геноміці та порівняльній біології. На сьогодні, всебічно досліджуються склад та структура геному представників родини *Brassicaceae*, створюються генетичні карти, аналізуються філогенетичні зв'язки між видами, ідентифікуються господарсько корисні риси тощо [230].

В результаті цитогенетичних та молекулярно-генетичних досліджень встановлено, що представники родини *Brassicaceae* мають різноманітну хромосомну будову. Диплоїдні геноми мають *A. thaliana* ($2n = 10$), ріпа (*Brassica rapa*) ($2n = 20$), гірчиця чорна (*Brassica nigra*) ($2n = 16$) та капуста (*Brassica oleracea*) ($2n = 18$), амфіплоїдні геноми характерні для гірчиці сизої (*B. juncea* L.) ($2n = 36$), ріпаку (*B. napus*) ($2n = 38$) тощо. Через поліплоїдію деякі види можуть мати до 256 окремих хромосом, до таких належать види роду *Cardamine*. Окрім того, в межах родів *Arabis*, *Rorippa*, *Cardamine* та *Boechera* відомі випадки гібридизації [230]. Зважаючи на це, представники

ролини *Brassicaceae* є надзвичайно цікавими об'єктами для сучасних генетичних досліджень.

На сьогодні, ДНК-маркери широко використовуються у молекулярно-генетичних дослідженнях видів родини *Brassicaceae*, зокрема для дослідження генетичної різноманітності, встановлення філогенетичних зв'язків, картування геномів та хромосом тощо. Серед найбільш розповсюджених ДНК-маркерних систем, що використовуються для дослідження *Brassicaceae*, належать RFLP, RAPD, AFLP, SSR [231-233]. Також існують дані щодо використання ген-специфічних ДНК-маркерів для молекулярно-генетичного аналізу різних видів *Brassicaceae*. Зокрема, розроблені ILP-маркери для картування геномів *B. juncea* та *A. thaliana* [118], а також оцінений поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну (TBP) у *B. napus* та сортів *Camelina* Crantz. [7, 8, 124, 125, 127, 235].

4.4.1. Ідентифікація міжвидових гібридів ріпаку з дикорослими видами шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину

На сьогодні факт утворення міжвидових гібридів рослин можливо підтвердити використовуючи ряд загальнодоступних методик, зокрема оцінки морфологічних характеристик, цитологічного або молекулярно-генетичного аналізу. Метод головних компонент (PCA, principal component analysis) полягає в візуалізації подібностей між морфологічними ознаками гібридів та батьківських форм за рядом характеристик використовуючи цифрові зображення (наприклад, зображення зерна тощо). Оцінюються такі показники як площа, периметр, діаметер зерна, округлості, колір тощо [235]. Однак це потребує використання додаткових підходів, оскільки спираючись лише на порівняння морфології гібридних та висхідних форм рослин можна отримати недостовірні дані. В таких випадках доцільними є паралельне використання цитогенетичних та молекулярно-генетичних підходів. Цитогенетичний (каріологічний) аналіз базується на підрахунку кількості

хромосом в клітинному ядрі [236]. Однак це не завжди дозволяє підтвердити факт гібридної природи досліджуваних організмів. Більш надійним методом аналізу гібридів вважається молекулярно-генетичний аналіз з використанням різноманітних ДНК-маркерних систем. Як ДНК-маркери для диференціації та ідентифікації рослинних гібридів використовують RAPD [237, 238], RFLP [239] та SSR-маркери [240-245]. Однак аналіз літературних даних свідчить про те, що далеко не всі ДНК-маркерні системи доцільно використовувати для встановлення гібридної природи рослинних організмів та відкритим залишається питання щодо пошуку нових маркерних систем, які здатні повноцінно та без великих матеріальних затрат ідентифікувати гібриди та батьківські рослини різних таксономічних груп рослин. Зважаючи на це було проведено генотипування та ідентифікацію міжвидових гібридів ріпаку з його дикорослими видами з флори України з використанням розробленої нами ДНК-маркерної системи для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину.

Для аналізу використовували міжвидові гібриди ріпаку олійного (*B. napus*) з рядом дикорослих видів родини *Brassicaceae*. Батьківськими формами були гібриди, отримані раніше шляхом примусового схрещування між лініями ріпаку (*B. napus* L. var. *oleifera* annua) MS1 x RF1 (ACS-BN004-7xACS-BN001-4) та MS1 x RF1 (ACS-BN004-7 x ACS-BN002-5) компанії Bayer CropScience, а також деякі дикорослі види родини *Brassicaceae* з флори України. Як дикорослі батьківські види були проаналізовані рогачка мілова (*E. cretaceum*), дворядник тонколистий (*D. tenuifolia*) та гірчиця сиза (*B. juncea*). Поліморфізм довжини інтронів генів актину оцінювали з використанням власнорозроблених універсальних вироджених ПЛР-праймерів ActIn (Табл. 2.3).

В цілому з використанням було генотиповано 16 зразків рослин, з яких 5 були лініями ріпаку (Рис. 4.16, зразки 2, 5, 9, 12, 15), 5 – дикорослі види *E. cretaceum*, *D. tenuifolia* та *B. juncea* (Рис. 4.16, зразки 1, 4, 8, 11, 14) та 6 –

міжвидові гібриди від відповідних схрещувань (Рис. 4.16, зразки 3, 6, 7, 10, 13, 16).

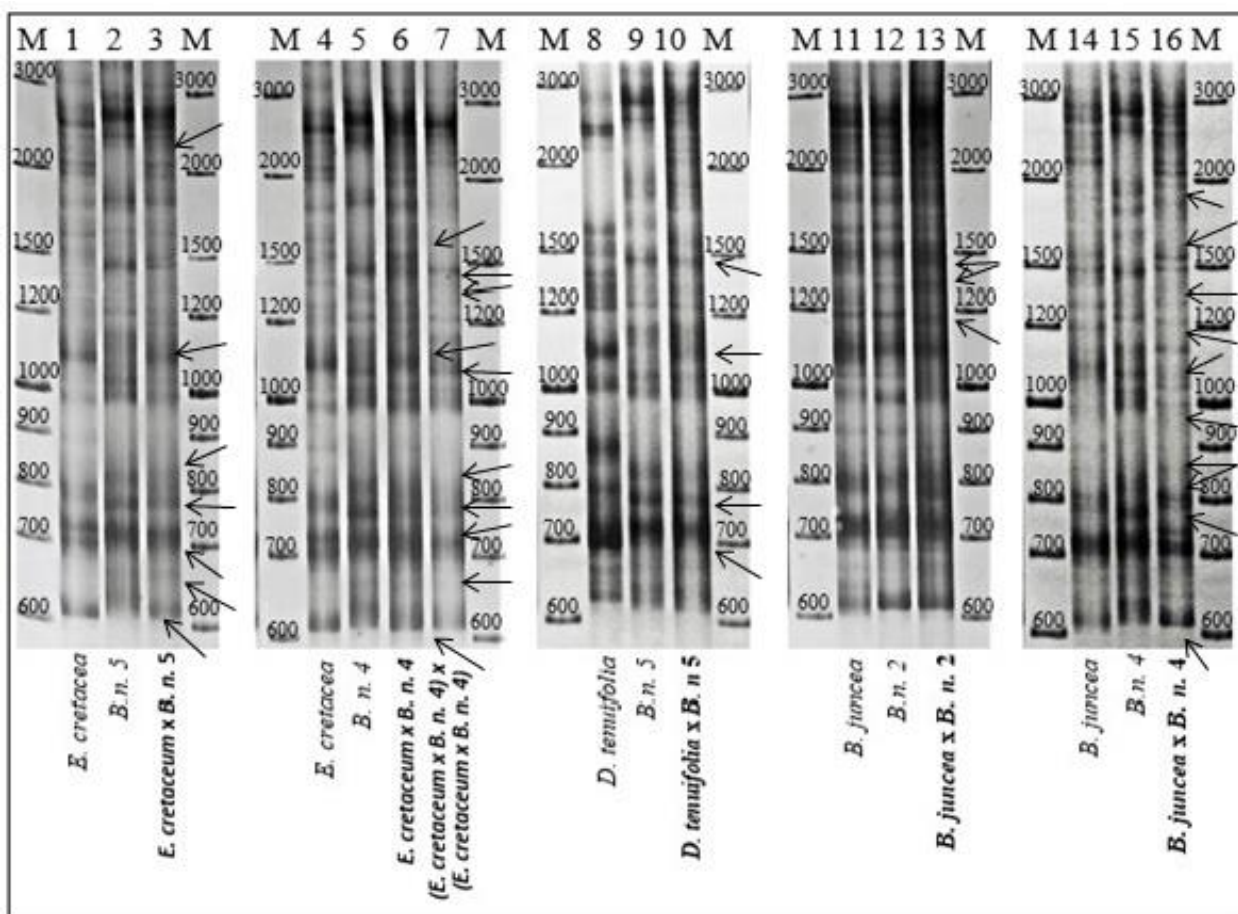


Рис. 4.16. Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину батьківських форм та міжвидових гібридів, отриманих в результаті схрещування ріпаку і диких видів родини *Brassicaceae*: 1 – *E. cretaceum*, 2 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-579 (*B.n.* 5), 3 – *E. cretaceum* × *B. n.* 5, 4 – *E. cretaceum*, 5 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-515 (*B.n.* 4), 6 – *E. cretaceum* × *B. n.* 4, 7 – (*E. cretaceum* × *B. n.* 4) × (*E. cretaceum* × *B. n.* 4), 8 – *D. tenuifolia*, 9 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-579 (*B.n.* 5), 10 – *D. tenuifolia* × *B. n.* 5, 11 – *B. juncea*, 12 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-460 (*B.n.* 2), 13 – *B. juncea* × *B. n.* 2, 14 – *B. juncea*, 15 – *B. napus* L. ssp. ol. PHS-97-515 (*B.n.* 4), 16 – *B. juncea* × *B. n.* 4. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначені фрагменти інтронів генів актину, які дозволяють ідентифікувати генотипи міжвидових гібридів ріпаку.

В результаті проведеного генотипування ліній ріпаку, міжвидових гібридів та диких близькоспоріднених видів з флори України з використанням оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, було продемонстровано утворення специфічних ДНК-профілів, які містили значну кількість фрагментів інтронів генів актину. Основна область розподілення ампліконів інтронів генів актину знаходиться в діапазоні від 595 п. н. до 3000 п. н. Утворені ДНК-профілі видів *B. napus*, *E. cretaceum*, *D. tenuifolia* та *B. juncea* (Рис. 4.16, зразки 1, 2, 4, 8, 11, 14), значно відрізнялися один від одного за кількістю та розподілом утворених ампліконів інтронів генів актину. Загалом, використання ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволило продемонструвати значну різницю між генотипами видів родини *Brassicaceae*.

Результати аналізу генотипу міжвидового гібрида, який є результатом схрещування ріпаку (*B.n.* 5) з диким видом *E. cretaceum* (Рис. 4.16, зразок 3) показали наявність фрагментів з інтронами генів актину, що притаманні обом батьківським генотипам (Рис. 4.16, зразки 1, 2). Зокрема у ДНК-профілі міжвидового гібриду (Рис. 4.16, зразок 3) наявні амплікони інтронів генів актину з довжинами близько 659 п. н., 726 п. н., 777 п. н., 823 п. н., 1045 п. н., які є ідентичними до ампліконів однієї з батьківських форм, а саме ріпаку (*B.n.* 5) (Рис. 4.16, зразок 2). Одночасно ДНК-профіль міжвидового гібриду містить фрагменти інтронів актину, які за походженням належать дикому батьківському виду *E. cretaceum* (зразок 1), а саме, фрагменти з довжинами близько 609 п. н., 1086 п. н., а також два чіткі амплікони в зоні 2000 п. н. Ряд проаналізованих фрагментів інтронів генів актину виявилися спільними як для міжвидового гібриду, так і для його батьківських форм, тому їх походження потребує більш детального дослідження.

Зразки 4–7 на Рис. 4.16 ілюструють результат аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину батьківських форм і гібридів першого (F_1) та другого (F_2) поколінь між ріпаком (*B. n.* 4) та *E. cretaceum*. Генотипування

міжвидових гібридів продемонструвало одночасне поєднання ряду фрагментів інтронів генів актину, притаманних як обом батьківським видам одночасно, так і окремо кожному. Зокрема в ДНК-профілях гібридів першого та другого покоління (*E. cretaceum* × *B. n. 4*) візуалізуються амплікони інтронів з довжинами близько 609 п. н., 1086 п. н., 1288 п. н., 1535 п. н., які найімовірніше за походженням належать до геному *E. cretaceum*. Також чіткі фрагменти генів актину з довжинами близько 659 п. н., 726 п. н., 777 п. н., 823 п. н., 1045 п. н., 1478 п. н. та інші у зразках 6 та 7 є спільними з батьківською лінією ріпаку (*B. n. 4*). Проведений аналіз також показав появу ряду фрагментів спільних як для батьківських форм, так і для гібридів.

Результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину міжвидового гібриду між ріпаком (*B. n. 5*) та *D. tenuifolia* (Рис. 4.16, зразок 10) показав стабільну появу ряду ампліконів інтронів генів актину, характерних обом батьківським генотипам. Зважаючи на результати електрофоретичного аналізу, варто зазначити, що більшість ампліконів інтронів генів актину, що утворилися в межах гібриду *D. tenuifolia* × *B. n. 5*, є ідентичними з ампліконами батьківського гібриду ріпаку *B. n. 5* (Рис. 4.16, зразок 9). Однак, донором фрагментів з довжинами близько 1088 п. н., 1500 п. н. є геном батьківського виду *D. tenuifolia* (Рис. 4.16, зразок 8). Загалом ДНК-профіль міжвидового гібриду (*D. tenuifolia* × *B. n. 5*), який утворився в результаті оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, поєднує в собі унікальні фрагменти інтронів генів актину від обох батьківських форм.

Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину міжвидового гібриду між ріпаком (*B. n. 2*) та *B. juncea* показав, що переважна більшість утворених фрагментів інтронів є характерними для обох батьківських форм (рис.4.16, зразок 13). Результати проведеного генотипування батьківських ліній *B. juncea* та *B. n. 2* (Рис. 4.16, зразки 11, 12) засвідчило, що утворені ДНК-профілі є подібними за розподілом та кількістю ампліконів інтронів, однак відрізняються лише декількома фрагментами. Зокрема, амплікони довжиною близько 1261 п. н. та 1379 п. н. батьківського виду *B. juncea*

візуалізуються у ДНК-профілі міжвидового гібриду (*B. juncea* × *B. n.* 2). Також, унікальний фрагмент інтрону довжиною близько 1331 п. н., що є у ріпаку (*B.n.* 2), присутній в межах генотипу гібриду (*B. juncea* × *B. n.* 2). Саме ці амплікони і дають можливість ідентифікувати гібрид (*B. juncea* × *B. n.* 2), та підтверджують походження його генотипу внаслідок схрещування саме цих батьківських видів.

На Рис. 4.16 (зразки 14, 15 та 16) наведено результати генотипування батьківських видів та міжвидового гібриду ріпаку (*B. n.* 4) та *B. juncea* з використанням оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. В межах кожного генотипу візуалізувалася велика кількість фрагментів інтронів генів актину, які утворювали унікальні ДНК-профілі. Результати аналізу отриманих даних засвідчили, що у генотипі міжвидового гібриду (*B. juncea* × *B. n.* 4) наявні фрагменти з інтронами генів актину, притаманні обом батьківським видам. Зокрема, амплікони з довжинами близько 609 п. н., 797 п. н., 804 п. н., 897 п. н., 988 п. н., 1200 п. н., 1280 п. н., 1564 п. н. та інші, які фіксуються у гібриду *B. juncea* × *B. n.* 4, походять з геному *B. juncea*. Також фрагменти інтронів генів актину з довжинами близько 1015 п. н., 1120 п. н., 1980 п. н. візуалізуються як у батьківського виду ріпаку, так і у міжвидового гібриду *B. juncea* × *B. n.* 4. Ряд ампліконів інтронів однакові для всіх трьох зразків.

Таким чином було показано, що під час порівняння ДНК-профілів міжвидових гібридів ріпаку з близькоспорідненими видами з флори України фіксували появу значної кількості фрагментів інтронів генів актину, що є характерною ознакою представників родини *Brassicaceae*. Загалом, продемонстровано, що в ДНК-профілях міжвидових гібридів візуалізувалися амплікони інтронів генів актину, притаманні обом батьківським генотипам. 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 гібридів рослин.

Результати експериментальних досліджень розділу 4.4, наведено в публікації:

1. 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.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

У дисертаційній роботі представлені результати досліджень щодо розробки універсальної ДНК-маркерної системи для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у видів вищих рослин та подальшого її впровадження для генотипування, ДНК-профілювання та диференціації рослин на різних таксономічних рівнях. З цією метою був проведений біоінформатичний пошук генів актину однодольних та дводольних рослин, проаналізовано особливості їх екзон-інтронної структури, а також здійснено дизайн та синтез праймерів, що дозволяють одночасно оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону всіх генів актину, закодованих в рослинному геномі. Був проведений аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину сортів господарськоцінних культур, серед яких пшениця, ячмінь, рис, льон-довгунець, томат та картопля, оцінена внутрішньосортова однорідність сортів льону-довгунця української селекції, а також здійснено порівняння ефективності роботи розроблених ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину з SSR-маркерами та TBP-методом. За допомогою розробленого підходу було оцінено поліморфізм довжини інтронів генів актину у природних популяцій егілопсу двухдюймового (*Ae. biuncialis*), проведене генотипування представників родини *Brassicaceae* та продемонстровано доцільність використання оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для ідентифікації міжвидових гібридів між ріпаком (*B. napus*) та деякими дикими видами родини *Brassicaceae*.

На першому етапі дисертаційного дослідження здійснено біоінформатичний пошук генів актину вищих видів рослин з використанням загальнодоступних баз даних GeneBank та Phytozome v 9.1. Зокрема для цього було обрано п'ять видів однодольних та дводольних рослин, геноми яких повністю сиквензовані: різушка Таля (*A. thaliana*), рис посівний (*O. sativa*), льон-довгунець (*L. usitatissimum*), томат (*S. lycopersicum*) та

картопля (*S. tuberosum*), які є або модельними об'єктами в сучасних генетичних дослідженнях, або представляють практичний інтерес для сучасних селекційних програм. На сьогодні в базі даних GeneBank присутні 8 анотованих послідовностей генів актину *A. thaliana* з встановленою екзон-інтронною структурою, які були взяті для дослідження. Окрім того, в геномній базі даних Phytozome v 9.1 здійснено біоінформатичний пошук генів актину, закодованих в геномах *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. tuberosum* та *S. lycopersicum*. Для цього було використано онлайн-інструмент BLASTN та послідовність гену *act1* *A. thaliana* як матричну послідовність для пошуку. В геномі *O. sativa* знайдено 9 послідовностей генів актину, у *L. usitatissimum* – 15, у *S. lycopersicum* та *S. tuberosum* – по 11 генів актину.

На наступному етапі був проведений аналіз особливостей екзон-інтронної структури генів актину *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*, *S. lycopersicum* та *S. tuberosum*. Показано, що переважна більшість генів актину модельних видів рослин містять 4 екзони та 3 інтрони. Продемонстровано сталість у кількісному складі нуклеотидів екзонних ділянок генів рослин, оскільки в переважній більшості I-й екзон складається з 60 п. н., II-й екзон – з 394 п. н., III-й екзон – з 614 п. н., а IV-й екзон – з 66 п. н. Одночасно сталості у кількісному складі інтронів генів актину не виявлено, а також встановлено, що ступінь ідентичності кодуючих ділянок генів актину складає 77 %, а їх амінокислотних послідовностей – 92 %. Загалом результати проведеного біоінформатичного пошуку та аналізу генів актину однодольних та дводольних видів рослин продемонстрували, що гени актину є висококонсервативними генами та переважно мають сталу екзон-інтронну структуру. Окрім того доведено, що екзони актину є найбільш консервативними ділянками цих генів, в той час як інтрони – гіперваріабельні. В цілому отримані дані свідчать про можливість подальшого використання генів актину для створення нового підходу для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у вищих видів рослин.

Спираючись на дані, отримані в результаті біоінформатичного аналізу генів актину *L. usitatissimum*, здійснено дизайн та синтез трьох пар специфічних праймерів, що дозволило оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону у окремих генів актину. Зокрема, пара праймерів Lus виявляє поліморфізм довжини II-го інтрону у генів Lus10021057 та Lus10029286 *L. usitatissimum*, а також дві пари відповідних праймерів до генів актину Lus10016259 та Lus10040826. Також синтезована пара вироджених універсальних праймерів (ActIn) для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у рослин, яка побудована таким чином, що прямий та зворотній праймери відпалюються на консервативних ділянках II-го та III-го екзонів всіх генів актину, закодованих в рослинному геномі.

В подальшому досліджено особливості застосування розробленої ДНК-маркерної системи для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для представників однієї з найбільш розповсюджених родин однодольних рослин – родини Злакових (*Poaceae*). Було досліджено поліморфізм довжини інтронів генів актину у сортів пшениці (*T. aestivum*), ячміню (*H. vulgare*) та рису посівного (*O. sativa*). Було генотиповано 7 сортів пшениці ярої, 29 сортів ячміню та 6 сортів рису посівного і зафіксовано утворення видоспецифічних ДНК-профілів, які містили амплікони інтронів генів актину. Був виявлений поліморфізм довжини інтронів генів актину у вибірках сортів пшениці та ячменю, що дозволило диференціювати сорти між собою. При цьому сорти рису посівного виявилися генетично однорідними. Показано доцільність подальшого використання ДНК-маркерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для молекулярно-генетичного аналізу пшениці, ячменю, рису та інших культурних видів злаків в процесі селекції, зокрема для оцінки чистоти сортового матеріалу тощо.

Також проведено оцінку поліморфізму довжини інтронів генів актину у поляцій егілопса двухдюмового (*Ae. biuncialis*), який є близьким диким родичем роду *Triticum*. З використанням розробленого підходу проведено генотипування та отримані специфічні ДНК-профілі 14 природних популяцій

Ae. biuncialis, зібраних на території Кримського півострову (Україна). Виявлена значна кількість поліморфних ампліконів інтронів генів актину у широкому діапазоні довжин, які відрізняють кожен з проаналізованих зразків між собою. Окрім того, виявлені фрагменти інтронів генів актину, які присутні у всіх зразках та характеризують досліджувані зразки як представників одного виду. В результаті проведеного аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину природні популяції *Ae. biuncialis* охарактеризовано як високополіморфні та гетерогенні, що узгоджується з раніше опублікованими даними, отриманими з використанням інших ДНК-маркерів. Загалом, ДНК-маркери, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів актину, дозволили якісно генотипувати та диференціювати природні популяції *Ae. biuncialis* між собою.

Досліджено поліморфізм довжини інтронів генів актину у представників роду *Linum*, зокрема видів льону (*L. angustifolium* та *L. bienne*) та сортів льону-довгунця (*L. usitatissimum*) на сортовому та внутрішньосорттовому рівнях. Попередньо був проведений дизайн та синтез трьох пар ген-специфічних праймерів для оцінки поліморфізму довжини II-го інтрону окремих генів актину льону-довгунця, зокрема Lus10021057 та Lus10029286 одночасно, та генів Lus10040826 та Lus10016259. Було досліджено поліморфізм довжини інтронів генів Lus10021057 та Lus10029286 у сортів *L. usitatissimum* різної селекції та показано утворення двох специфічних цільових фрагментів інтронів генів актину, що за очікуваними розмірами відповідають інтронам досліджуваних генів. Поліморфні зони з інтронами генів актину присутні лише у нижній смузі з довжинами фрагментів близько 820 п. н. та 780 п. н., що відповідають інтрону гена Lus10021057. Окрім того, був проведений аналіз 16 сортів льону-довгунця (*L. usitatissimum*) української селекції за допомогою праймерів до генів актину Lus10021057 та Lus10029286, Lus10040826 та Lus10016259. Спостерігалось утворення як цільових ампліконів інтронів генів актину, так і ряду фрагментів, природа яких потребує подальших додаткових досліджень.

В цілому виявлений поліморфізм довжини інтронів за двома праймерами до генів актину льону-довгунця Lus10021057 та Lus10029286, і гена Lus10016259. Загалом використання ген-специфічних праймерів дозволило вперше оцінити поліморфізм довжини II-го інтрону деяких генів актину *L. usitatissimum* та підтверджено перспективність використання поліморфізму інтронів генів актину для генетичного аналізу представників роду *Linum*.

Надалі було проведено генотипування сортів льону-довгунця української селекції та білоруських ландрас льону шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Було отримано специфічні ДНК-профілі кожного сорту, що містили щонайменше по 10 фрагментів з інтронами генів актину, в результаті чого вдалося виявити ряд поліморфних ампліконів, що дозволило диференціювати сорти між собою. Загалом, більш гетерогенною виявилася вибірка білоруських ландрас льону-довгунця. Оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину виявилася ефективним підходом для аналізу льону-довгунця на міжсортівному рівні.

Окрім сортів льону-довгунця, проведено аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у різних видів льону, а саме *L. bienne* та *L. angustifolium*. Отримані ДНК-профілі цих видів виявилися подібними до ДНК-профілю льону-довгунця та між собою. Поліморфізму довжини інтронів генів актину у видів *L. bienne* та *L. angustifolium* виявлено не було, що свідчить про високу генетичну спорідненість даних видів льону.

Якісна та достовірна оцінка генетичної чистоти сортового насінневого матеріалу є одним з важливих напрямків використання ДНК-маркерів в сучасній селекції. Зважаючи на це, була перевірена можливість використання ДНК-маркерної системи, що дозволяє виявляти поліморфізм довжини інтронів генів актину, для оцінки внутрішньосортової генетичної однорідності сортів льону-довгунця (*L. usitatissimum*) української селекції. Зцією метою аналізувалися по 5 – 6 випадково обраних рослин кожного з 16 сортів льону-довгунця за допомогою специфічних праймерів до генів актину льону Lus10016259 та Lus10040826, а також з використанням вироджених

праймерів (ActIn) для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Було продемонстровано, що з використанням праймерів до гена льону Lus10016259, поліморфізм довжини інтронів генів актину продемонстрований для 9 сортів льону-довгунця. В той час результати, отримані за допомогою праймерів до гена Lus10040826, свідчать про те, що у всіх сортів (окрім сорту 'Зоря 87') відсутні поліморфні амплікони інтронів цього гена. Найбільш інформативними стали вироджені універсальні ДНК-маркери для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, оскільки продемонстровано, що переважна більшість сортів льону-довгунця української селекції (12 із 16 сортів) є генетично гетерогенними.

Була порівняна ефективність оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину з ефективністю використання SSR-маркерів та ТВР-методу, для чого провели внутрішньосортовий аналіз сортів льону-довгунця за двома мікросателітними локусами (LU 7 та LU 21) та показана генетична неоднорідність 12 сортів. При цьому варто зазначити, що за результатами ТВР-аналізу у 10 сортів льону був виявлений поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну на внутрішньосортовому рівні. Загалом, виявилось, що розроблена ДНК-маркерна система для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину є таким же ефективним інструментом для вивчення генетичної мінливості та однорідності сортових вибірок, як і SSR-маркери та ТВР-метод. Продемонстрована доцільність подальшого використання всіх трьох ДНК-маркерних систем в різноманітних генетичних дослідженнях, зокрема для оцінки чистоти сортового матеріалу як разом, так і окремо.

Був також оцінений поліморфізм довжини інтронів генів актину у представників родини Пасльонові (*Solanaceae*), а саме у сортів томату (*S. lycopersicum*) та картоплі (*S. tuberosum*). Загалом було отримано видоспецифічні ДНК-профілі сортів томату та картоплі, що містили цільові фрагменти інтронів генів актину. Встановлено, що вибірка сортів томату за цим видом ДНК-маркерів виявилася низькополіморфною, оскільки поліморфізм довжини інтронів генів актину виявлений лише в одному сорті

‘Американський Синій’. Одночасно вибірка сортів картоплі містила значну кількість поліморфних ампліконів інтронів генів актину та була охарактеризована як високополіморфна. Загалом підхід для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволив якісно генотипувати сорти томату та картоплі, що засвідчило придатність його для використання у подальших генетико-селекційних дослідженнях рослин родини *Solanaceae*.

На заключному етапі дисертаційного дослідження було проаналізовано поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних представників родини Хрестовітні (*Brassicaceae*), які є надзвичайно цікавими об’єктами для генетичних досліджень, зважаючи на особливості їх хромосомної будови, плоїдності, перехресного запилення, можливої гібридизації тощо. Саме тому було оцінено можливість використання оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для генотипування та ідентифікації міжвидових гібридів між ріпаком (*B. napus*) та його дикими родичами з флори України. Загалом проаналізовано по п’ять зразків батьківських форм, а саме лінії ріпаку та дикорослі родичі олійного ріпаку *E. cretaceum*, *D. tenuifolia* та *B. juncea*, а також 6 міжвидових гібридів від відповідних схрещувань. Для всіх зразків отримано чіткі відтворювані ДНК-профілі зі специфічним набором ампліконів інтронів генів актину. Продемонстровано значні відмінності між ДНК-профілями диких видів *E. cretaceum*, *D. tenuifolia* та *B. juncea*. Показано, що ДНК-профілі міжвидових гібридів поєднують в собі фрагменти інтронів генів актину обох батьківських форм одночасно. Загалом вдалося достовірно ідентифікувати як батьківські генотипи, так і генотипи міжвидових гібридів. Таким чином, в подальшому оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину може повноцінно використовуватися для молекулярно-генетичного аналізу генотипів та ідентифікації їх гібридної природи у представників родини Хрестоцвітні (*Brassicaceae*).

Отже в дисертаційній роботі представлені результати біоінформатичного пошуку та аналізу генів актину однодольних та дводольних рослин, серед яких *A. thaliana*, *O. sativa*, *L. usitatissimum*,

S. tuberosum та *S. lycopersicum*, досліджені особливості їх екзон-інтронної структури та здійснено дизайн та синтез праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Протестовано розроблену універсальну ДНК-маркерну систему для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, на різних рослинних вибірках однодольних та дводольних рослин на різних класифікаційних рівнях. Зокрема у однодольних проаналізовано міжпопуляційний поліморфізм довжини інтронів генів актину у природних популяцій егілопсу, сортів пшениці, ячменю та рису. У дводольних рослин проведено генотипування та диференціація сортів льону-довгунця, видів льону (*L. bienne*, *L. angustifolium*), сортів томату та картоплі. Оцінено можливості використання ДНК-маркерної системи для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для ідентифікації міжвидових гібридів між ріпаком і його дикими родичами з флори України. Продемонстровано високу ефективність розробленого підходу оцінки поліморфізму довжини інтронів в порівнянні з популярними SSR-маркерами та TBP-методом на прикладі оцінки внутрішньосортової однорідності сортів льону-довгунця.

Загалом метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину зарекомендував себе як новий, ефективний та надійний підхід для проведення молекулярно-генетичного аналізу, генотипування, ДНК-профілювання та диференціації вищих рослин на різних рівнях організації: видовому, популяційному, сортовому та внутрішньосортовому. В подальшому підхід може бути використаний в популяційно-генетичних та селекційних дослідженнях, для молекулярно-генетичної характеристики будь-яких вибірок вищих рослин та при визначенні чистоти сортового матеріалу господарськоцінних культур.

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 кодуючі 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 кодуючих 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 двухдоймового (*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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Nadeema M.A. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing / M.A. Nadeema, M.A. Nawaz, M.Q. Shahid, Y. Dogan et al. // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* – 2017. – Vol. 32. – P. 261-285.
2. Andersen J.R. Functional markers in plants / J.R. Andersen, T. Lübberstedt // *Trends Plant Sci.* – 2003. – Vol. 8(11). – P. 554-560.
3. Poczai P. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review / P. Poczai, I. Varga, M. Laos, A. Cseh et al. // *Plant Methods.* – 2013. – Vol. 9. – P. 6-37.
4. Wang X. Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa* L.) / X.Wang, X. Zhao, J. Zhu, W. Wu // *DNA Res.* – 2005. – Vol. 12(6). – P. 417-427.
5. He C. Genome-wide identification of candidate phosphate starvation responsive genes and the development of intron length polymorphism markers in maize / C. He, H. Liu, S. Su, Y. Lu et al. // *Plant Breed.* – 2015. – Vol. 134(1). – P. 11-16.
6. Vali U. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations / U. Vali, M. Brandstrom, M. Johansson, H. Ellegren // *BMC Genetics.* – 2008. – Vol. 9(1). – P. 1-8.
7. Bardini M. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species / M. Bardini, D. Lee, P. Donini, A. Mariani et al. // *Genome.* – 2004. – Vol. 47(2). – P. 281-291.
8. Galasso I. Genomic Fingerprinting of *Camelina* Species Using cTBP as Molecular Marker / I. Galasso, A. Manca, L. Braglia, E. Ponzoni, D. Breviario // *American J. Plant Sci.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1184-1200.

9. Rabokon A.N. Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β -tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping / A.N. Rabokon, Ya.V. Pirko, A.Ye. Demkovych, Ya.B. Blume // *Cytol. Genet.* – 2018. – Vol. 52(1). – P. 1-10.
10. Pirko Ya.V. Studying of genetic diversity different species of plants by analyzing polymorphism of introns of β -tubulin genes / Ya.V. Pirko // *Industr. Botany.* – 2011. – Vol. 11. – P. 152-156.
11. Gavazzi F. The Tubulin-Based-Polymorphism Method Provides a Simple and Effective Alternative to the Genomic Profiling of Grape / F. Gavazzi, L. Braglia, F. Mastromauro, S. Gianì et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11(9). – P. e0163335.
12. Пірко Я.В. Вивчення поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну як метод аналізу генетичної диференціації рослин / Я.В. Пірко, А.С. Постовойтова, А.М. Рабокoнь, Л.О. Калафат та ін. // *Укр. Бот. Журнал.* – 2018а. – Т. 75(6). – С. 576-584.
13. Пірко Я.В. Поліморфізм довжини інтронів генів γ -тубуліну як новий підхід до генотипування рослин / Я.В. Пірко, Д.Д. Буй, А.С. Постовойтова, А.М. Рабокoнь та ін. // *Допов. Нац. Акад. наук Укр.* – 2018b. – Т. 12. – С. 87-92.
14. McDowell J.M. Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana* / J.M. McDowell, S.R. Huang, E.C. McKinney, Y.Q. An, R.B. Meagher // *Genetics.* – 1996. – Vol. 142(2). – P. 587-602.
15. Cole C.T. Genetic variation in rare and common plants / C.T. Cole // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* – 2003. – Vol. 34. – P. 213-237.
16. Hamrick J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations // *Isozymes Plant Bio.* (D.E. Soltis, P.S. Soltis, T.R. Dudley, ed.), USA: Chapman and Hall Ltd. – 1989. – P. 87–105.
17. Karakoy T. Variation for selected morphological and quality-related traits among 178 faba bean landraces collected from Turkey / T. Karakoy,

F.S. Baloch, F. Toklu, H. Ozkan // *Plant Genet. Resour.* – 2014. – Vol. 12(1). – P. 5-13.

18. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2013. – Vol. 7(4/2). – P. 1044-1054.

19. Mondini L. Assessing plant genetic diversity by molecular tools / L. Mondini, A. Noorani, M.A. Pagnotta // *Diversity.* – 2009. – Vol. 1(1). – P. 19-35.

20. Gupta P.K. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants / P.K. Gupta, S. Rustgi // *Funct. Integr. Genomics.* – 2004. – Vol. 4(3). – P. 139-162.

21. Semagn K. An overview of molecular marker methods for plants / K. Semagn, A. Bjornstad, M.N. Ndjondjop // *Afr. J. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 5(25). – P. 2540-2568.

22. Mishra K.K. Potential and application of molecular markers techniques for plant genome analysis / K.K. Mishra, R.S Fougat, A. Ballani, V. Thakur et al. // *Int. J. Pure App. Biosci.* – 2014. – Vol. 2(1). – P. 169-188.

23. Mo X.C. Molecular Markers in Whole Genome Evolution of *Brachypodium* / X.C. Mo, D.Q. Zhang, C. Kou, L.J. Yin // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 1667. – P. 119-137.

24. Garcia A.A.F. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines / A.A.F. Garcia, L.L. Benchimol, A.M.M. Barbosa, I.O. Geraldi et al. // *Genet. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 27(4). – P. 579-588.

25. Benchimol L.L. Genetic diversity in tropical maize inbred lines: Heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP marker / L.L. Benchimol, C.L.Jr. Souza, A.A.F. Garcia, P.M.S. Kono et al. // *Plant Breed.* – 2000. – Vol. 119(6). – P. 491-496.

26. McGregor C.E. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato

(*Solanum tuberosum* L.) germplasm / C.E. McGregor, C.A. Lambert, M.M. Greyling, J.H. Louw, L. Warnich // *Euphytica*. – 2000. – Vol. 113.- P. 135-144.

27. Zimnoch-Guzowska E. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers / E. Zimnoch-Guzowska, W. Marczewski, R. Lebecka, B. Flis et al. // *Crop Sci.* – 2000. – Vol. 40(4). – P. 1156-1167.

28. Bohn M. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance / M. Bohn, H.F. Utz, A.E. Melchinger // *Crop Sci.* – 1999. – Vol. 39. – P. 228-237.

29. Davierwala A.P. Use of three different marker systems to estimate genetic diversity of Indian elite rice varieties / A.P. Davierwala, K.V. Chowdari, S. Kumar, A.P. Reddy et al. // *Genetica*. – 2000. – Vol. 108(3). – P. 269-284.

30. Anderson P.A. The inheritance of restriction fragment length polymorphisms in the flax rust *Melampsora lini* / P.A. Anderson, G.J. Lawrence, A. Pryor // *Theor. Appl. Genet.* – 1992. – Vol. 84(7/8). – P. 845-850.

31. Saliba-Colombani V. Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome / V. Saliba-Colombani, M. Causse, L. Gervais, J. Philouze // *Genome*. – 2000. – Vol. 43(1). – P. 29-40.

32. Cirovic N. Differentiation of *Cannabis* subspecies by THCA synthase gene analysis using RFLP / N. Cirovic, M. Kecmanovic, D. Keckarevic // *J. Forensic Leg. Med.* – 2017. – Vol. 51. – P. 81-84.

33. Joshi M. Polymerase chain reaction: methods, principles and application / M. Joshi, J.D. Deshpande // *Int. J. Biomed. Res.* – 2011. – Vol. 2(1). – P. 81-97.

34. Williams J.G. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers / J.G. Williams, M.K. Hanafey, J.A. Rafalski, S.V. Tingey // *Meth. Enzymol.* – 1993. – Vol. 218. – P. 704-740.

35. Wang X. Effects of different preservation methods on inter simple sequence repeat (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers in botanic samples / X. Wang, L. Li, J. Zhao, F. Li et al. // C. R. Biol. – 2017. – Vol. 340(4). – P. 204-213.
36. Xena E.N. A decade of the RAPD method: possibilities and limitations for plant genetics relationship studies / E.N. Xena // Acta. Cient. Venez. – 2000. – Vol. 51(4). – P. 197-206.
37. Bishoyi A.K. Varietal discrimination and genetic variability analysis of *Cymbopogon* using RAPD and ISSR markers analysis / A.K. Bishoyi, A. Sharma, A. Kavane, K.A. Geetha // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2016. – 179(4). – P. 659-670.
38. Kalkıs O. Relationships among some pears genotypes (*Pyrus communis* L.) based on ISSR and RAPD analysis / O. Kalkıs, M. Okcu, Z. Okcu, B. Karabulut et al. // Erwerbs-Obstbau. – 2016. – 58(4). – P. 259-264.
39. Sunar S. Genetic diversity and relationships detected by ISSR and RAPD analysis among *Aethionema* species growing in Eastern Anatolia (Turkey) / S. Sunar, N. Yildirim, M. Sengul, G. Agar // C. R. Biol. – 2016. – Vol. 339. – P. 147-151.
40. Gostimskiĭ S.A. Studying plant genome variation using molecular markers / S.A. Gostimskiĭ, Z.G. Kokaeva, F.A. Konovalov // Genetika. – 2005. – Vol. 41(4). – P. 480-492. (in Russian)
41. Qiu T. Analysis of allopolyploidy-induced rapid genetic and epigenetic changes and their relationship in wheat / T. Qiu, Y.Z. Dong, X.M. Yu, N. Zhao, Y.F. Yang // Genet. Mol. Res. – 2017. – Vol. 16(2). – P. 1-14.
42. Pakniyat H. RAPD markers associated with drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / H. Pakniyat, E. Tavakol // Pak. J. Biol. Sci. – 2007. – Vol. 10(18). – P. 3237-3239.
43. Erturk F.A. Determination of genotoxic effects of boron and zinc on *Zea mays* using protein and random amplification of polymorphic DNA analyses /

F.A. Erturk, G. Nardemir, A.Y. Hilal, E. Arslan, G. Agar // *Toxicol. Ind. Health.* – 2015. – Vol. 31(11). – P. 1015-1023.

44. Molin D. Genetic diversity in the germplasm of tropical maize landraces determined using molecular markers / D. Molin, C.J. Coelho, D.S. Maximo, F.S. Ferreira et al. // *Genet. Mol. Res.* – 2013. – Vol. 12(1). – P. 99-114.

45. Demirkiran A. Genetic and epigenetic effects of salinity on in vitro growth of barley / A. Demirkiran, S. Marakli, A. Temel, N. Gozukirmizi // *Genet. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 36(4). – P. 566-570.

46. Okumus A. Genetic and geographic variation of bulbous barley (*Hordeum bulbosum* L.) assessed by RAPD markers / A. Okumus, F. Uzun // *Genetika.* – 2007. – Vol. 43(3). – P. 377-381.

47. Stegniñ V.N. RAPD analysis of the flax (*Linum usitatissimum* L.) varieties and hybrids of various productivity / V.N. Stegnii, Iu.V. Chudinova, E.A. Salina // *Genetika.* – 2000. – Vol. 36(10). – P. 1370-1373. (in Russian).

48. Abou-Taleb E.M. Genetic diversity among late blight resistant and susceptible potato genotypes / E.M. Abou-Taleb, S.M. Aboshosha, E.M. El-Sherif, M.H. El-Komy // *Saudi. J. Biol. Sci.* – 2010. – Vol. 17(2). – P. 133-138.

49. Ghislain M. Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs / M. Ghislain, D. Andrade, F. Rodríguez, R.J. Hijmans, D.M. Spooner // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – Vol. 113(8). – P. 1515-1527.

50. Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans et al. // *Nucleic. Acids. Res.* – 1995. – Vol. 24. – P. 4407-4414.

51. Meudt H.M. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances / H.M. Meudt, A.C. Clarke // *Trends Plant. Sci* – 2007. – Vol. 12(3). – P. 106-117.

52. Shirasawa K. Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence /

K. Shirasawa, S. Kishitani, T. Nishio // *Mol. Breed.* – 2004. – Vol. 14(3). – P. 283-292.

53. El-Rabey H.A. Speciation and Species Separation in *Hordeum* L. (*Poaceae*) Resolved by Discontinuous Molecular Markers / H. A. El-Rabey, A. Badr, R. Schafer-Pregl, W. Martin, F. Salamini // *Plant Biol.* – 2002. – Vol. 4. – P. 567-575.

54. Cervera M.T. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers / M.T. Cervera, L. Ruiz-Garcia, J.M. Martínez-Zapater // *Mol. Genet. Genomics.* – 2002. – Vol. 268. – P. 543-552.

55. Kalia R.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants / R.K. Kalia, M.K. Rai, S. Kalia, R. Singh, A.K. Dhawan // *Euphytica.* – 2011. – Vol. 177(3) – P. 309-334.

56. Morgante M. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes / M. Morgante, M. Hanafey, W. Powell // *Nat. Genet.* – 2002. – Vol. 30(2). – P. 194-200.

57. Ebert D. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species / D. Ebert, R.O. Peakall // *Mol. Ecol. Resour.* – 2009. – Vol. 9(3). – P. 673-690.

58. Liu Y. The mitochondrial genomes of the early land plants *Treubia lacunosa* and *Anomodon rugelii*: dynamic and conservative evolution / Y. Liu, J.Y. Xue, B. Wang, L. Li, Y.L. Qiu // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6(10). – P. e25836.

59. Castelo A.T. ROLL--tandem repeat occurrence locator / A.T. Castelo, W. Martins, G.R. Gao // *Bioinformatics.* – 2002. – Vol. 18(4). – P. 634-636.

60. Thiel T. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) / T. Thiel, W. Michalek, R.K. Varshney, A. Graner // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 106(3). – P. 411-422.

61. Gao L. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches / L. Gao, J. Tang, H. Li, J. Jia // *Mol. Breed.* – 2003. – Vol. 12(3). – P. 245-261.
62. Kofler R. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation / R. Kofler, C. Schlotterer, T. Leley // *Bioinformatics.* – 2007. – Vol. 23(13). – P. 1683-1685.
63. Vieira M.L. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful / M.L. Vieira, L. Santini, A.L. Diniz, F. Munhoz Cde // *Genet. Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 39(3). – P. 312-328.
64. Демкович А.Є. Використання мікросателітних локусів у молекулярно-генетичному аналізі видів роду *Vincetoxicum Wolf* флори України / А.Є. Демкович // *Промышленная ботаника.* – 2012. – Т. 12. – С. 152-156.
65. Kim J. Identification of new microsatellite markers in *Panax ginseng* / J. Kim, B.H. Jo, K.L. Lee, E.S. Yoon et al. // *Mol. Cells.* – 2007. – Vol. 24(1). – P. 60-68.
66. Pali V. Molecular diversity in flax (*Linum usitatissimum* L.) as revealed by DNA based markers / V. Pali, N. Mehta, V.S. Balkrishna, M.S. Xalxo, R.R. Saxena // *Vegetos.* – 2015. – Vol. 28(1). – P. 157-165.
67. Pali V. Identification of microsatellite markers for fingerprinting popular Indian flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars and their utilization in seed genetic purity assessments / V. Pali, K.S. Verma, M.S. Xalxo, R.R. Saxena et al. // *Austral. J. Crop Sci.* – 2014. - Vol. 8(1). – P. 119-126.
68. Shehata A.I. Application of simple sequence repeat (SSR) markers for molecular diversity and heterozygosity analysis in maize inbred lines / A.I. Shehata, H.A. Al-Ghethar, A.A. Al-Homaidan // *Saudi J. Biol. Sci.* – 2009. – Vol. 16(2). – P. 57-62.
69. Van Inghelandt D. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers / D. Van

Inghelandt, A.E. Melchinger, C. Lebreton, B. Stich // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 120(7). – P. 1289-1299.

70. Temnykh S. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential / S. Temnykh, G. DeClerck, A. Lukashova, L. Lipovich, S. Cartinhour, S. McCouch // Genome Res. – 2001. – Vol. 11(8). – P. 1441-1452.

71. Li Y.H. Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci / Y.H. Li, W. Li, C. Zhang, L. Yang et al. // New Phytol. – 2010. – Vol. 188(1). – P. 242-253.

72. Hai L. Quantitative structure analysis of genetic diversity among spring bread wheats (*Triticum aestivum* L.) from different geographical regions / L.Hai, C. Wagner, W. Friedt // Genetica. – 2007. – Vol. 130(3). – P. 213-225.

73. Senturk Akfirat F. Genetic diversity of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) revealed by SSR markers / F. Senturk Akfirat, A.A. Uncuoglu // Biochem. Genet. – 2013. – Vol. 51(3/4). – P. 223-229.

74. Elakhdar A. Population structure and marker-trait association of salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) / A. Elakhdar, M.A. El-Sattar, K. Amer, A. Rady, T. Kumamaru // C. R. Biol. – 2016. – Vol. 339(11/12). – P. 454-461.

75. Zhou R. Genetic diversity of cultivated and wild tomatoes revealed by morphological traits and SSR markers / R. Zhou, Z. Wu, X. Cao, F.L. Jiang // Genet. Mol. Res. – 2015. – Vol. 14(4). – P. 13868-13879.

76. Zietkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. – 1994. – Vol. 20(2). – P. 176-183.

77. Stefunova V. Detection of the genetic variability of amaranthus by RAPD and ISSR markers / V. Stefunova, M. Bezo, J. Ziarovska, K. Razna // Pak. J. Bot. – 2015. – Vol. 47(4). – P. 1293-1301.

78. Chaudhary V. Assessment of genetic diversity and population structure in gladiolus (*Gladiolus hybridus* Hort.) by ISSR markers / V. Chaudhary, M. Kumar, S. Sharma, N. Kumar et al. // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 2018. – Vol. 24(3). – P. 493-501.

79. Abdollahi Mandoulakani B. Preliminary evidence for associations between molecular markers and quantitative traits in a set of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and breeding lines / B. Abdollahi Mandoulakani, S. Nasri, S. Dashchi, S. Arzhang et al. // *C. R. Biol.* – 2017. – Vol. 340(6/7). – P. 307-313.

80. Bornet B. Genetic diversity in european and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs) / B. Bornet, F. Goragner, G. Joly, M. Branchard // *Genome.* – 2002. – Vol. 45(3). – P. 481-484.

81. Kolodinska Brantestam A. Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin / A. Kolodinska Brantestam, R. von Bothmer, C. Dayteg, I. Rashal et al. // *Hereditas.* – 2004. – Vol. 141(2). – P. 186-192.

82. Fernandez E. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin / E. Fernandez, M. Figueiras, C. Benito // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – Vol. 104(5). – P. 845-851.

83. Rajwade A.V. Relatedness of Indian flax genotypes (*Linum usitatissimum* L.): an inter-simple sequence repeat (ISSR) primer assay / A.V. Rajwade, R.S. Arora, N.Y. Kadoo, A.M. Harsulkar et al. // *Mol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 45(2). – P. 161-170.

84. SanMiguel P. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons / P. SanMiguel, J.L. Bennetzen // *Ann. Bot.* – 1998. – Vol. 82(1). – P. 37-44.

85. Li W. Sequence composition, organization, and evolution of the core Triticeae genome / W. Li, P. Zhang, J.P. Fellers, B. Friebe, B.S. Gill // *Plant J.* – 2004. – Vol. 40(4). – P. 500-511.
86. Kalendar R. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting / R. Kalendar, A.H. Schulman // *Nat. Protoc.* – 2006. – Vol. 1(5). – P. 2478-2484.
87. Kalendar R. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation / R. Kalendar, K. Antonius, P. Smykal, A.H. Schulman // *Theor. Appl. Genet.* – 2010. – Vol. 121(8). – P. 1419-1430.
88. Schulman A.H. The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants / A.H. Schulman, A.J. Flavell, T.H. Ellis // *Methods Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 260. – P. 145-173.
89. Kalendar R. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers / R. Kalendar, A.J. Flavell, T.H. Ellis, T. Sjakste et al. // *Heredity.* – 2011. – Vol. 106(4). – P. 520-530.
90. Kalendar R. Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS / R. Kalendar, A.H. Schulman // *Methods Mol. Biol.* – 2014. – Vol. 1115. – P. 233-255.
91. Брик А.Ф. IRAP и REMAP-анализ сортов ячменя одесской селекции / А.Ф. Брик, Р.Н. Календарь, О.Р. Стратула, Ю.М. Сиволап // *Цитол. генет.* — 2006. — Т. 40(3). — С. 24-33.
92. Nasri S. Retrotransposon insertional polymorphism in Iranian bread wheat cultivars and breeding lines revealed by IRAP and REMAP markers / S. Nasri, B. Abdollahi Mandoulakani, R. Darvishzadeh, I. Bernousi // *Biochem. Genet.* – 2013. – Vol. 51(11/12). – P. 927-943.
93. Sharma V. Assessment of genetic diversity among Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) collection using microsatellite and retrotransposon based marker systems / V. Sharma, M.R. Nandineni // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2014. – Vol. 73. – P. 10-17.

94. Kuhn B.C. Genetic diversity of maize germplasm assessed by retrotransposon-based markers / B.C. Kuhn, I. Lopez-Ribera, F. da Silva Machado Mde, C.M. Vicent // *Electrophoresis*. – 2014. – Vol. 35(12-13). – P. 1921-1927.
95. Branco C.J. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice / C.J. Branco, E.A. Vieira, G. Malone, M.M. Kopp et al. // *J. Appl. Genet.* – 2007. – Vol. 48(2). – P. 107-113.
96. Varshney R.K. Genetic molecular markers in plants: development and applications / R.K. Varshney, T. Mahendar, R.K. Aggarwal, A. Borner // *Genom. Assist. Crop Improv.* – 2007. – Vol. 1. – P. 13-29.
97. Collard B.C.Y. Conserved DNA-derived polymorphism (CDDP): a simple and novel method for generating DNA markers in plants / B.C.Y. Collard, D.J. Mackill // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2009. – Vol. 27. – P. 558-562.
98. Xie Z. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells / Z. Xie, Z.L. Zhang, X. Zou, J. Huang et al. // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 137(1). – P. 176-189.
99. Nagasaki H. Functional analysis of the conserved domains of a rice KNOX homeodomain protein, OSH15 / H. Nagasaki, T. Sakamoto, Y. Sato, M. Matsuoka // *Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13(9). – P. 2085-2098.
100. Lim J. Two rice MADS domain proteins interact with OsMADS1 / J. Lim, Y.H. Moon, G. An, S.K. Jang // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 44(4). – P. 513-527.
101. Hamidi H. Comparative efficiency of functional gene-based markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived polymorphism (CDDP) with ISSR markers for diagnostic fingerprinting in wheat (*Triticum aestivum*L.) / H. Hamidi, R. Talebi, F. Keshavarzi // *Cereal Res. Commun.* – 2014. – Vol. 42(4). – P. 558-567.
102. Poczai P. Genetic diversity assessment of bittersweet (*Solanum dulcamara*, *Solanaceae*) germplasm using conserved DNA-derived

polymorphism and intron-targeting markers / P. Poczai, I. Varga, N.E. Bell // *Ann. Appl. Biol.* – 2011. – Vol. 159. – P. 141-153.

103. Li Y.Y. Screening of CDDP molecular marker primers for Tree Peony and analysis of its polymorphism / Y.Y. Li // *J. Nucl. Agric. Sci.* – 2013. – Vol. 27(8). – P. 1099-1105.

104. Jiang L. Analysis of genetic relationships in *Rosa rugosa* using conserved DNA-derived polymorphism markers / L. Jiang, D. Zang // *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* – 2018. – Vol. 32(1). – P. 88-94.

105. Yamanaka S. Assessment of cytochrome P450 sequences offers a useful tool for determining genetic diversity in higher plant species / S. Yamanaka, E. Suzuki, M. Tanaka, Y. Takeda et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 108. – P. 1-9.

106. Schalk M. Role of unusual amino acid residues in the proximal and distal heme regions of a plant P450, CYP73A1 / M. Schalk, S. Nedelkina, G. Schoch, Y. Batard, D. Werck-Reichhart // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38(19). – P. 6093-6103.

107. Riechmann J.L. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes / J.L. Riechmann, J. Heard, G. Martin, L. Reuber et al. // *Science.* – 2000. – Vol. 290(5499). – P. 2105-2110.

108. Choi H.K. A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa* / H.K. Choi, D. Kim, T. Uhm, E. Limpens et al. // *Genetics.* – 2004. – Vol. 166(3). – P. 1463-1502.

109. Yang L. PIP: a database for potential intron polymorphism markers / L. Yang, G. Jin, X. Zhao, Y. Zheng et al. // *Bioinformatics.* – 2007. – Vol. 23. – P. 2174-2177.

110. Zhao X.Q. Construction of a genetic map based on ILP markers in rice / X.Q. Zhao, W.R. Wu // *Yi Chuan.* – 2008. – Vol. 30(2). – P. 225-230.

111. Zhao X. Subspecies-specific intron length polymorphism markers reveal clear genetic differentiation in common wild rice (*Oryza rufipogon* L.) in

relation to the domestication of cultivated rice (*O. sativa* L.) / X. Zhao, L. Yang, Y. Zheng, Z. Xu, W. Wu // J. Genet. Genom. – 2009. – Vol. 36(7). – P. 435-442.

112. Zhou R. RGA-ILP, a new type of functional molecular markers in bread wheat / R. Zhou, J. Jia, L. Gao // Euphytica. – 2010. – Vol. 172(2). – P. 263-273.

113. Wang Y. Discovery of intron polymorphisms in cultivated tomato using both tomato and *Arabidopsis* genomic information / Y. Wang, J. Chen, D.M. Francis, H. Shen et al. // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 121. – P. 1199-1207.

114. Gupta S.K. Development of intron length polymorphism markers in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] and their transferability to other *Vigna* species / S.K. Gupta, R. Bansal, T. Gopalakrishna // Mol. Breed. – 2012. – Vol. 30. – P. 1363-1370.

115. Muthamilarasan M. Development of 5123 intron-length polymorphic markers for large-scale genotyping applications in foxtail millet / M. Muthamilarasan, B. Venkata Suresh, G. Pandey, K. Kumari et al. // DNA Res. – 2014. – Vol. 21(1). – P. 41-52.

116. Gupta S. Development and utilization of novel intron length polymorphic markers in foxtail millet (*Setaria italica* (L.) P. Beauv.) / S. Gupta, K. Kumari, J. Das, C. Lata et al. // Genome. – 2011. – Vol. 54(7). – P. 586-602.

117. Shu Y. Genome-wide identification of intron fragment insertion mutations and their potential use as SCAR molecular markers in the soybean / Y. Shu, Y. Li, Y. Zhu, Z. Zhu et al. // Theor. Appl. Genet. – 2010. – Vol. 121(1). – P. 1-8.

118. Panjabi P. Comparative mapping of *Brassica juncea* and *Arabidopsis thaliana* using Intron Polymorphism (IP) markers: homoeologous relationships, diversification and evolution of the A, B and C *Brassica* genomes / P. Panjabi, A. Jagannath, N.C. Bisht, K.L. Padmaja et al. // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9(1). – P. 113-122.

119. Nogales E. Structural insights into microtubule function / E. Nogales // *Annu. Rev. Biochem.* – 2000. – Vol. 69. – P. 277-302.
120. Blume Ya. Plant tubulin phosphorylation / Ya. Blume, C.V. Lloyd, A.I. Yemets // *The Plant Cytoskeleton: Key Tool for agrobiotechnology* (Ya. Blume, W. Baird, A. Yemets, D. Breviario, ed.), Berlin; Heidelberg; NY: Springer-Verlag. – 2008. – P. 145-159.
121. Snustad D.P. The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed beta-tubulin genes / D.P. Snustad, N.A. Haas, S.D. Kopczak, C.D. Silflow // *Plant Cell.* – 1992. – Vol. 4(5). – P. 549-556.
122. Gian S. Rice β -tubulin mRNA levels are modulated during flower development and in response to external stimuli / S. Gian, D. Breviario // *Plant Sci.* – 1996. – Vol. 116. – P. 147-157.
123. Breviario D. Plant tubulin intronics / D. Breviario, S. Giani, T. Ponzoni, F. Mastromauro, L. Morell // *Cell Biol. Int.* – 2008. – Vol. 32. – P. 571-573.
124. Gavazzi F. Technical improvement of the TBP (tubulin-based polymorphism) method for plant species detection, based on capillary electrophoresis / F. Gavazzi, A.P. Casazza, C. Depedro, F. Mastromauro, D. Breviario // *Electrophoresis.* – 2012. – Vol. 33(18). – P. 2840-2551.
125. Galasso I. 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 / I. Galasso, A. Manca, L. Braglia, T. Martinelli et al. // *Mol. Breed.* – 2011. – Vol. 28. – P. 635-645.
126. Braglia L. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs / L. Braglia, A. Manca, F. Mastromauro, D. Breviario // *Diversity.* – 2010. – Vol. 2. – P. 572-585.
127. Breviario D. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined b-tubulin introns / D. Breviario, W.V. Baird, S. Sangoi, K. Hilu et al. // *Mol. Breed.* – 2007. – Vol. 20. – P. 249-259.

128. Braglia L. TBP-assisted species and hybrid identification in the genus *Passiflora* / L. Braglia, F. Gavazzi, A. Giovannini, F. Nicoletti et al. // Mol. Breed. – 2014. – Vol. 33(1). – P. 209-219.

129. Рабоконь А.М. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. / А.М. Рабоконь, А.Є. Демкович, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Фактори експ. еволюції орг. – 2015. – Т. 17. – С. 82-86.

130. Рабоконь А.М. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. / А.М. Рабоконь, А.Є. Демкович, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Фактори експ. еволюції орг.– 2016. – Т.19. – С. 43-46.

131. Rabokon A. Intron length polymorphism of β -tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. / A. Rabokon, A. Demkovich, A. Sozinov, N. Kozub et al. // Cell Biol. Int. – 2017. – Vol. 43(9). – P. 1031-1039.

132. Рабоконь А.М. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у *Deschampsia antarctica* Desv. з морської Антарктики / А.М. Рабоконь, А.Є. Демкович, Я.В. Пірко, І.О. Андреев та ін. // Фактори експ. еволюції орг. – 2017. – Т.20. – С. 104-108.

133. Pirko N.N. Intron length polymorphism of β -tubulin genes in different representatives of *Pinaceae* Lindl. family / N.N. Pirko, A.Ye. Demkovych, L.O. Kalafat, S.N. Privalikhin et al. // Journal of botany. – 2016. – Vol. 2(13). – P. 5-9.

134. Tang F. In vitro production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*) / F. Tang, Y. Tao, T. Zhao, G. Wang // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2006. – Vol. 84(2). – P. 233-237.

135. Wu J. Polyploidy enhances F1 pollen sterility loci interactions that increase meiosis abnormalities and pollen sterility in autotetraploid rice / J. Wu, M.Q. Shahid, L. Chen, Z. Chen et al. // Plant Physiol. – 2015. – Vol. 169(4). – P. 2700-2717.

136. Angaji S.A. QTL mapping: a few key points / S.A. Angaji // Int. J. Appl. Res. Nat. Prod. – 2009. – Vol. 2(2). – P. 1-3.
137. Dhingani R.M. Introduction to QTL mapping in plants / R.M. Dhingani, V.V. Umrana, R.S. Tomar, M.V Parakhia, B.A. Golakiya // Ann. Plant Sci. – 2015. – Vol. 4(04). – P. 1072-1079.
138. Slafer G.A. Promising eco-physiological traits for genetic improvement of cereal yields in Mediterranean environments / G.A. Slafer, J.L. Araus, C. Royo, L.F.G. Del Moral // Ann. Appl. Biol. – 2005. – Vol. 146(1). – P. 61-70.
139. Trethowan R.M. Adapting wheat cultivars to resource conserving farming practices and human nutritional needs / R.M. Trethowan, M. Reynolds, K. Sayre, I.O. Monasterio // Ann. Appl. Biol. – 2005. – Vol. 146. – P. 405-413.
140. Collard B.C. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century / B.C. Collard, D.J. Mackill // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2008. – Vol. 363(1491). – P. 557-572.
141. Moose S.P. molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement / S.P. Moose, R.H. Mumm // Plant Physiol. – 2008. – Vol. 147. – P. 969-977.
142. Steele K.A. Marker-evaluated selection in rice: shifts in allele frequency among bulks selected in contrasting agricultural environments identify genomic regions of importance to rice adaptation and breeding / K.A. Steele, G. Edwards, J. Zhu, J.R. Witcombe // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 109(6). – P. 1247-1260.
143. Алтухов Ю.П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю.П. Алтухов, Е.А. Салменкова // Генетика. – 2002. – Т. 38. – С. 1173-1195.
144. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих / А.А. Банникова // Журн. общей биологии. – 2004. – Т. 65. – С. 278-305.
145. Jiang Y. Potential and limits to unravel the genetic architecture and predict the variation of *Fusarium head blight* resistance in European winter wheat

(*Triticum aestivum* L.) / Y. Jiang, Y. Zhao, B. Rodemann, J. Plieske et al. // *Heredity*. – 2015. – Vol. 114(3). – P. 318-326.

146. Nocente F. Evaluation of leaf rust resistance genes Lr1, Lr9, Lr24, Lr47 and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection / F. Nocente, L. Gazza, M. Pasquini // *Euphytica*. – 2007. – Vol. 155. – P. 329-336.

147. Sivasamy M. Introgression of useful linked genes for resistance to stem rust, leaf rust and powdery mildew and their molecular validation in wheat (*Triticum aestivum* L.) / M. Sivasamy, Vinod, S. Tiwari, R.S. Tomar et al. // *Indian J. Genet.* – 2009. – Vol. 69(1). – P. 17-27.

148. Yang L. Marker-assisted selection for pyramiding the waxy and *opaque-16* genes in maize using cross and backcross schemes / L. Yang, W. Wang, W. Yang, M. Wang // *Mol. Breed.* – 2013. – Vol. 31(4). – P. 767-775.

149. Castro A.J. Mapping and pyramiding of qualitative and quantitative resistance to stripe rust in barley / A.J. Castro, F. Capettini, A.E. Corey, T. Filichkina et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 107(5). – P. 922-930.

150. Lang N.T. Molecular mapping and marker assisted selection for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) / N.T. Lang, B.C. Buu, A. Ismail // *Omonrice*. – 2008. – Vol. 16. – P. 50-56.

151. Miah G. A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance / G. Miah, M.Y. Rafii, M.R. Ismail, A.B. Puteh et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14(11). – P. 22499-22528.

152. Schmierer D.A. Molecular marker-assisted selection for enhanced yield in malting barley / D.A. Schmierer, N. Kandemir, D.A. Kudrna, B.L. Jones et al. // *Mol. Breed.* – 2004. – Vol. 14(4). – P. 463-473.

153. Han F. Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley / F.Han, I. Romagosa, S.E. Ullrich, B. L. Jones et al. // *Mol. Breed.* – 1997. – Vol. 3(6). – P. 427–437.

154. Bouchez A. Marker-assisted introgression of favorable alleles at quantitative trait loci between maize elite lines / A. Bouchez, F. Hospital, M. Causse, A. Gallais, A. Charcosset // *Genetics*. – 2002. – Vol. 162(4). – P. 1945-1959.
155. Joseph M. Combining bacterial blight resistance and Basmati quality characteristics by phenotypic and molecular marker assisted selection in rice / M. Joseph, S. Gopalakrishnan, R.K. Sharma, V.P. Singh et al. // *Mol. Breed.* – 2004. – Vol. 13(4). – P. 377-387.
156. Werner K. Strategies for pyramiding resistance genes against the barley yellow mosaic virus complex (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) / K. Werner, W. Friedt, F. Ordon // *Mol. Breed.* – 2005. – Vol. 16(1). – P. 45-55.
157. Dominguez R. Actin Structure and Function / R. Dominguez, K.C. Holmes // *Annu. Rev. Biophys.* – 2011. – Vol. 40. – P. 169-186.
158. Le Gall L. Characterization of an actin gene family in *Palmaria palmata* and *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) / L. Le Gall, C. Lelong, A.M. Rusig, P. Favrel // *Cah. Biol. Mar.* – 2005. – Vol. 46. – P. 311-322.
159. Wu M. Unexpected dynamic gene family evolution in algal actins / M. Wu, J.M. Comeron, H.S. Yoon, D. Bhattacharya // *Mol. Biol. Evol.* – 2009. – Vol. 26(2). – P. 249-253.
160. Schwarzerova K. The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce / K. Schwarzerova, Z. Vondrakova, L. Fischer, P. Borikova et al. // *BMC Plant Biol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 89-102.
161. Meagher R.B. Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family / R.B. Meagher, E.C. McKinney, M.K. Kandasamy // *Plant Cell*. – 1999. – Vol. 11(6). – P. 995-1005.
162. Baird W.V. A complex gene superfamily encodes actin in petunia / W.V. Baird, R.B. Meagher // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6(11). – P. 3223-3231.

163. Perrin B.J. The actin gene family: function follows isoform / B.J. Perrin, J.M. Ervasti // *Cytoskeleton* (Hoboken). – 2010. – Vol. 67(10). – P. 630-634.
164. Bhattacharya D. Actin gene duplication and the evolution of morphological complexity in land plants / D. Bhattacharya, J. Aubry, E.C. Twait, S. Jurk // *J. Phycol.* – 2000. – Vol. 36(5). – P. 813-820.
165. Slajcherova K. Multiple actin isotypes in plants: diverse genes for diverse roles? / K. Slajcherova, J. Fiserova, L. Fischer, K. Schwarzerova // *Front. Plant Sci.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1-8.
166. Gilliland L.U. *Arabidopsis* actin gene *ACT7* plays an essential role in germination and root growth / L.U. Gilliland, L.C. Pawloski, M.K. Kandasamy, R.B. Meagher // *Plant J.* – 2003. – Vol. 33(2). – P. 319-328.
167. Vitale A. Multiple conserved 5' elements are required for high-level pollen expression of the *Arabidopsis* reproductive actin *ACT1* / A. Vitale, R.J. Wu, Z.Q. Cheng, R.B. Meagher // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 52. – P. 1135-1151.
168. McDowell J.M. The *Arabidopsis* *ACT7* actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli / J.M. McDowell, Y.Q. An, S.R. Huang, E.C. McKinney, R.B. Meagher // *Plant Physiol.* – 1996. – Vol. 111(3). – P. 699-711.
169. Huang S.R. The *Arabidopsis* *ACT11* actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules / S.R. Huang, Y.Q. An, J.M. McDowell, E.C. McKinney, R.B. Meagher // *Plant Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 33. – P. 125-139.
170. Goodstein D.M. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics / D.M. Goodstein, S. Shu, Howson R, R. Neupane et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – P. 1178-1186.
171. Larkin M.A. Clustal W and Clustal X version 2.0 / M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna et al. // *Bioinformatics.* – 2007. – Vol. 23. – P. 2947-2948.

172. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. – P. 1166-1167.

173. Kalendar R. FastPCR: an *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis / R. Kalendar, B. Khassenov, Y. Ramankulov, O. Samuilova, K.I. Ivanov // *Genomics*. – 2017. – Vol. 109(4-5). – P. 312-319.

174. Doyle J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // *Phytochem. Bulletin*. – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.

175. Rogers S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – Vol. 5. – P. 69-76.

176. Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / J. Sambrook, W. R. David // Cold Spring Harbor. – 2001. – Vol. 2. – P. 763.

177. Демкович А.Є., Рабоконь А.М., Пірко Я.В., Блюм Я.Б., винахідники; заявник і патентовласник ДУ «ІХБГ НАН України». Прилад для вертикального гел-електрофорезу; Патент України на корисну модель № 102060. 2015 Жовт. 12.

178. Benbouza H. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels / H. Benbouza, J. Jean-Marie, B. Jean-Pierre // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2006. – Vol. 10(2). – P. 77-81.

179. Kondratyuk A.V. Microsatellite loci polymorphism analysis of Belarusian and foreign breeding potato varieties / A.V. Kondratyuk, A.V. Kilchevsky, E.I. Kuzminova // *Mol. Appl. Genet.* – 2005. – Vol. 13. – P. 24-29.

180. Kaul S. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* / S. Kaul, H.L. Koo, J. Jenkins, M. Rizzo et al. // *Nature*. – 2000. – Vol. 408(6814). – P. 796-815.

181. Eckardt N.A. Sequencing the Rice Genome / N.A. Eckardt // *Plant Cell*. – 2000. – Vol. 12(11). – P. 2011-2018.
182. Wang Z. The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled de novo from short shotgun sequence reads / Z. Wang, N. Hobson, L. Galindo, S. Zhu et al. // *Plant J. Cell Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 72(3). – P. 461-473.
183. Sato Sh. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution / Sh. Sato, S. Tabata, H. Hirakawa, E. Asamozu et al. // *Nature* – 2012. – Vol. 485(7400). – P. 635-641.
184. Raker C.M. Chilean Tetraploid Cultivated Potato, *Solanum tuberosum*, is Distinct from the Andean Populations: Microsatellite Data / C.M. Raker, D.M. Spooner // *Crop Sci.* – 2002. – Vol. 42. – P.1451-1458.
185. Xu X. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato / X. Xu, S. Pan, S. Cheng, B. Zhang // *Nature*. – 2011. – Vol. 475(7355). – P. 189-195.
186. Sorek R. The birth of new exons: Mechanisms and evolutionary consequences / R. Sorek // *RNA*. – 2007. – Vol. 13(10). – P. 1603-1608.
187. Kim E. Crosslinking constraints on F-actin structure / E. Kim, W. Wriggers, M. Phillips, K. Kokabi et al. // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 299. – P. 421-429.
188. Holmes K.C. Atomic model of the actin filament / K.C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard, W. Kabsch // *Nature*. – 1990. – Vol. 347(6288). – P. 44-49.
189. Dos Remedios C.G. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments / C.G. Dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova et al. // *Physiol. Rev.* – 2003. – Vol. 83(2). – P. 433-473.
190. Christenhusz M.J.M. The number of known plants species in the world and its annual increase / M.J.M. Christenhusz, J.W. Byng, // *Phytotaxa*. – 2016. – Vol. 261(3). – P. 201-217.
191. Гончаров Н.П. Происхождение, domestикация и эволюция пшениц / Н.П. Гончаров, Е.Я. Кондратенко // *Информ. вестник ВОГиС*. – 2008. – Т. 12(1/2). – С. 159-179.

192. Zohary D. Domestication of Plants in the Old World: The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley / D. Zohary, M. Hopf // Oxford University Press – 2000. – Vol. 3. – P. 316.

193. Campbell B.C. IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley / B.C. Campbell, S. LeMare, G. Piperidis, I.D. Godwin // Mol. Breed. – 2011. – Vol. 27(2). – P. 193-206.

194. Carvalho A. Genetic variability of Old Portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers / A. Carvalho, H. Guedes-Pinto, P. Martins-Lopes, J. Lima-Brito // Ann. Appl. Biol. – 2010. – Vol. 156(3). – P. 337-345.

195. Song Q.J. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat / Q.J. Song, J.R. Shi, S. Singh, E.W. Fickus // Theor. Appl. Genet. – 2005. – Vol. 110(3). – P. 550-560.

196. Khaled A.G.A. Identification of ISSR and RAPD markers linked to yield traits in bread wheat under normal and drought conditions / A.G.A. Khaled, M.H. Motawea, A.A. Said // J. Genet. Engineer. Biotechnol. – 2015. – Vol. 13(2). – P. 243-252.

197. Li Y. Novel and favorable QTL allele clusters for end-use quality revealed by introgression lines derived from synthetic wheat / Y. Li, R. Zhou, J. Wang, X. Liao et al. // Mol. Breed. – 2012. – Vol. 29(3). – P. 627-643.

198. Abdollahi Mandoulakani B. Development of IRAP- and REMAP-derived SCAR markers for marker-assisted selection of the stripe rust resistance gene *Yr15* derived from wild emmer wheat / B. Abdollahi Mandoulakani, E. Yaniv, R. Kalendar, D. Raats et al. // Theor. Appl. Genet. – 2015. – Vol. 128(2). – P. 211-219.

199. Salameh A. Effects of introgression of two QTL for fusarium head blight resistance from Asian spring wheat by marker-assisted backcrossing into European winter wheat on fusarium head blight resistance, yield and quality traits / A. Salameh, M. Buerstmayr, B. Steiner, A. Neumayer et al. // Mol. Breed. – 2011. – Vol. 28(4). – P. 485-494.

200. Spunarova M. The use of molecular markers for characterisation of spring barley for breeding to Fusarium head blight resistance / M. Spunarova, J. Ovesna, L. Tvaruzek, L. Kucera et al. // *Plant Soil Environ.* – 2005. – Vol. 51(11). – P. 483-490.

201. Molina J. Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice / J. Molina, M. Sikora, N. Garud, J.M. Flowers et al. // *PNAS.* – 2011. – Vol. 108(20). – P. 8351-8356.

202. Herrera T.G. Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers // T.G. Herrera, D.P. Duque, I.P. Almeida, G.T. Nunez et al. // *Electron. J. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 11(5). – P. 3-4.

203. Fuentes J.L. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers / J.L. Fuentes, F. Escobar, A. Alvarez, G. Gallago et al. // *Euphytica.* – 1999. – Vol. 109(2). – P. 107-115.

204. Безуглий М.Д. ДНК-ідентифікація сортів рису (*Oryza sativa* L.) української селекції / М.Д. Безуглий, Ю.М. Сиволап, О.В. Галаєв, В.В. Дудченко, Р.А. Вожегова // *Цитология и генетика.* — 2011. — Т. 45(1). — С. 35-40.

205. Wang J. Molecular cytogenetic characterization of the *Aegilops biuncialis* karyotype / J. Wang, W. Zhang, H. Zhao, F.R. Li et al. // *Genet. Mol. Res.* – 2013. – Vol. 12. – P. 683-692.

206. Schneider A. Molecular cytogenetic characterization of *Aegilops biuncialis* and its use for the identification of 5 derived wheat-*Aegilops biuncialis* disomic addition lines / A. Schneider, G. Linc, I. Molnar, M. Molnar-Lang // *Genome.* – 2005. – Vol. 48. – P. 1070-1082.

207. Dulai S. Wheat-*Aegilops biuncialis* amphiploids have efficient photosynthesis and biomass production during osmotic stress / S. Dulai, I. Molnar, D. Szopko, E. Darko et al. // *J. Plant Physiol.* – 2014. – Vol. 171(7). – P. 509-517.

208. Kozub N.A. Identification of alleles at gliadin loci Gli-U1 and Gli-M(b)1 in *Aegilops biuncialis* Vis. / N.A. Kozub, I.A. Sozinov, A.A. Sozinov // Russ. J. Genet. – 2012. – Vol. 48. – P. 390-395.

209. Makkouk K. Resistance to barley yellow dwarf luteovirus in *Aegilops* species / K. Makkouk, W. Ghulam, A. Comeau // Can. J. Plant Sci. – 1994. – Vol. 74. – P. 631-634.

210. Dhaliwal H.S. Transfer of rust resistance from *Aegilops ovata* into bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and molecular characterisation of resistant derivatives / H.S. Dhaliwal, D. Harjit-Singh, M. William // Euphytica. – 2002. – Vol. 126(2). – P. 153-159.

211. Kozub N.A. Allelic variation at high-molecular-weight glutenin subunit loci in *Aegilops biuncialis* Vis. / N.A. Kozub, I.A. Sozinov, I.N. Ksinias, A.A. Sozinov // Russ. J. Genet. – 2011. – Vol. 47. – P. 1078-1083.

212. Pester T.A. Genetic diversity of jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) determined with RAPD and AFLP markers / T.A. Pester, S.M. Ward, A.L. Fenwick, P. Westra, S.J. Nissen // Weed Sci. – 2003. – Vol. 51(3). – P. 287-293.

213. Kaya I. Genetic diversity and relationship analysis among accessions of *Aegilops* ssp. in Turkey using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers / I. Kaya, A.C. Kirisozu, F.Y. Ersoy, S. Dere, M.S. Akkaya // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – Vol. 10(72). – P. 16167-16174.

214. Baranduzi A.J. Assessment of genetic diversity in *Aegilops* species in North-West of Iran using ISSR marker / A.J. Baranduzi, O. Sofalian, R.A. Zakaria, A. Asghari, M. Skokrpooor // Agric. Sci. – 2013. – Vol. 23(2). – P. 1–10.

215. Galaev A.V. Detection of the introgression of genome elements of the *Aegilops cylindrica* Host. into the *Triticum aestivum* L. genome by ISSR and SSR analysis / A.V. Galaev, L.T. Babayants, Yu.M. Sivolap // Russ. J. Genetics. – 2004. – Vol. 40(12). – P. 1371-1377.

216. Giorgi D. RFLP analysis of *Aegilops* species belonging to the Sitopsis section / D. Giorgi, R. D'Ovidio, O.A. Tanzarella, E. Porceddu // Genet. Resour. Crop Evol. – 2002. – Vol. 49(2). – P. 145-151.
217. Karg S. New research on the cultural history of the useful plant *Linum usitatissimum* L. (flax), a resource for food and textiles for 8,000 years / S. Karg, V. Hist // Archaeobot. – 2011. – Vol. 20. – P. 507-508.
218. Jhala A.J. Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current uses and future applications / A.J. Jhala, L.M. Hall // Austral. J. Basic Appl. Sci. – 2010. – Vol. 4(9). – P. 4304-4312.
219. Рабоконь А.М. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. / А.М. Рабоконь, А.Є. Демкович, Я.В. Пірко, Я.Б. Блюм // Фактори експ. еволюції орг. – 2016. – Vol. 19. – P. 43-46.
220. Рабоконь А.М. Поліморфізм довжини інтронів генів β -тубуліну у білоруських ландрас *Linum usitatissimum* L. / А.М. Рабоконь, Я.В. Пірко, Л.О. Калафат, Є.В. Гузенко // Фактори експ. еволюції орг. – 2018. – Vol. 22. – P. 180-185.
221. Vromans J. Molecular genetic studies in flax (*Linum usitatissimum* L.) / J. Vromans // Ph.D. thesis, Wageningen. – 2006. – P. 144.
222. Tutin T.G. Flora Europaea: *Rosaceae* to *Umbelliferae* / T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. H. Valentine, S. M. Walters, D. A. Webb, ed. // Cambridge: Cambridge University Press. – 1968. – Vol. 2. – P. 486.
223. Zohary D. Domestication of plants in the old world / D. Zohary, M. Hopf, ed. // Oxford: Oxford University Press. — 1993. – Vol. 2. – P. 278.
224. Muravenko O.V. Genome comparisons with chromosomal and molecular markers for three closely related flax species and their hybrids / O.V. Muravenko, V.A. Lemesh, T.E. Samatadze, A.V. Amosova et al. // Russ. J. Genet. – 2003. – Vol. 39. – P. 414-421.
225. Singh P. Genetic purity assessment in linseed (*Linum usitatissimum* L.) varieties using microsatellite markers / P. Singh,

N. Mehta, A. Sao // *Suppl. Genet. Plant Breed.* – 2015. – Vol. 10(4). – P. 2031-2036.

226. Shirasawa K. DNA marker applications to molecular genetics and genomics in tomato / K. Shirasawa, H. Hirakawa // *Breed. Sci.* – 2013. – Vol. 63. – P. 21-30.

227. Milbourne B.D. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato / B.D. Milbourne, R. Meyer, J.E. Bradshaw, E. Baird et al. // *Mol. Breed.* – 2010. – Vol. 3(2). – P. 127-136.

228. Ohyama A. Characterization of tomato SSR markers developed using BAC-end and cDNA sequences from genome databases / A. Ohyama, E. Asamizu, S. Negoro, K. Miyatake, // *Mol. Breed.* – 2009. – Vol. 23. – P. 685-691.

229. Warwick S.I. *Brassicaceae*: species checklist and database on CD-ROM / S.I. Warwick, A. Francis, I.A. Al-Shehbaz // *Plant Syst. Evol.* – 2006. – Vol. 259. – P. 249-258.

230. Sharma A. Comparative genomics of *Brassicaceae* crops / A. Sharma, X. Li, Y.P. Lim // *Breed. Sci.* – 2004. – Vol. 64. – P. 3-13.

231. Pradhan A.K. A high density linkage map in *Brassica juncea* (Indian mustard) using AFLP and RFLP markers / A.K. Pradhan, V. Gupta, A. Mukhopadhyay, N. Arumugam et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 106. – P. 607-614.

232. Bett K.E. Genetic analysis and genome mapping in *Raphanus* / K.E. Bett, D.J. Lydiate // *Genome.* – 2003. – Vol. 46. – P. 423-430.

233. Piquemal J.E. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers / J.E. Piquemal, F. Cinquin, C. Couton, E. Rondeau et al. // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – Vol. 111. – P. 1514-1523.

234. Рабоконь А.Н. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений / А.Н. Рабоконь, Я.В. Пирко, А.Е. Демкович, Я.Б. Блюм // *Молекулярная и прикладная генетика (Минск).* – 2015. – Т. 19. – С. 35-44.

235. Wiwart M. Identification of hybrids of spelt and wheat and their parental forms using shape and color descriptors / M. Wiwart, E. Suchowilska, W. Lajszner, L. Graban // *Comp. Electron. Agricul.* – 2012. – Vol. 83. – P. 68-76.

236. Твардовська М.О. Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різних локалітетів прибережної антарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів / М.О. Твардовська, І.О. Андрєєв, А.В. Амосова, К.В. Спірідонова // *Фактори експ. еволюції орг.* – 2014. – Т. 14. – С. 133-137.

237. Samuel R. Identification of hybrids between *Quercus petraea* and *Q. robur* (*Fagaceae*): results obtained with RAPD markers confirm allozyme studies based on the Got-2 locus / R. Samuel // *Plant System. Evol.* – 1999. – Vol. 217(1/2). – P. 137-146.

238. Liu L.W. Evaluation of genetic purity of F₁ hybrid seeds in cabbage with RAPD, ISSR, SRAP, and SSR markers / L.W. Liu, G. Liu, Y.Q. Gong, W.H. Dai et al. // *Hortscience.* – 2007. – Vol. 2. – P. 724-727.

239. Kaplan Z. Molecular identification of hybrids from a former hot spot of Potamogeton hybrid diversity / Z. Kaplan, J. Fehrer // *Aqua. Botany.* – 2013. – Vol. 105. – P. 34-40.

240. Turchetto C. Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species / C. Turchetto, A.L. Segatto, J. Beduschi, S.L. Bonatto, L.B. Freitas // *AoB Plants.* – 2015. – Vol. 7. – P. 1-12.

241. Zhao X. Hybrid identification and genetic variation of *Elymus sibiricus* hybrid populations using EST-SSR markers / X. Zhao, J. Zhang, Z. Zhang, Y. Wang, W. Xie // *Hereditas.* – 2017. – Vol. 154. – P. 15-23.

242. Iqbal A. Identification of sunflower (*Helianthus annuus*, *Asteraceae*) hybrids using simple-sequence repeat markers / A. Iqbal, H.A. Sadaqat, A.S. Khan, M. Amjad // *Genet. Mol. Res.* – 2011. – Vol. 10(1). – P. 102-106.

243. Zhao Z. Genetic purity testing of loose-curd cauliflower hybrids using SSR markers and grow out test / Z. Zhao, H. Gu, X. Sheng, H. Yu et al. // *Seed Sci. Technol.* – 2012. – Vol. 40. – P. 209-214.

244. Zhao Y.F. Morphological and genetic characteristics of hybrid combinations of *Dactylis glomerata* / Y.F. Zhao, X.Q. Zhang, X. Ma, W.G. Xie, L.K. Huang // Genet. Mol. Res. – 2014. – Vol. 13(2). – P. 2491-2503.

245. Xie W.G. Identification and genetic variation analysis of Orchardgrass hybrids (*Dactylis glomerata*) by SSR molecular markers / W.G. Xie, X.Q. Zhang, Y.X. Cheng // Acta. Pratac Sin. – 2010. – Vol. 19. – P. 212-217.

Додаток А

Список публікацій здобувача

Статті:

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).*

Продовж. дод. А

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. Анализ гомологов генов основных белков цитоскелета у различных видов высших растений / **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).*

Тези:

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

Продовж. дод. А

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. Рабоконець, **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-интронной структури генів “домашнього господарства” у різних видів рослин / Я.В. Пірко, **А.С. Постовойтова**, А.М. Рабоконець, Я.Б. Блюм // Матеріали II конференції

Продовж. дод. А

молодих учених «Біологія рослин та біотехнологія», 23-24 грудня 2013, Київ, Україна: тези доп. – Київ, 2013. – С. 34.