УДК 577.212.3

ПОЛІМОРФІЗМ ІНТРОНІВ ГЕНІВ АКТИНУ ЯК ІНСТРУМЕНТ ГЕНОТИПУВАННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ *SOLANACEAE*

А. С. ПОСТОВОЙТОВА, аспірант*
Я. В. ПІРКО, кандидат біологічних наук, зав. відділу популяційної генетики
Я. Б.БЛЮМ, доктор біологічних наук,
директор ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»
*E-mail:*nastya.postovoytova@gmail.com

Анотація. *У сучасній селекції ДНК-маркери є незамінним інструментом для ідентифікації та добору генотипів господарсько цінних культур. Новим та багатообіцяючим напрямом розробки молекулярних маркерних систем є ген-специфічні ДНК-маркери (GTMs), зокрема маркери, що ґрунтуються на виявленні поліморфізму довжин інтронів цільових генів (ILP).*

Метою роботи було оцінити можливість використання поліморфізму інтронів генів актину, а саме довжин II-го інтрону генів актину (ABP-actin base polymorphism) для ДНК-профілювання сортів томату та картоплі (Solanaceae). ДНК виділяли із проростків за допомогою ЦТАБ-методу. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням власноруч розроблених універсальних праймерів. Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-му поліакриламідному гелі з подальшою візуалізацією шляхом забарвлення нітратом срібла. За результатами аналізу 12 сортів томату та 4 сортів картоплі виявлено, що кожен із сортів томату містив не менше 7 ампліконів II-го інтрону генів актину та лише в одному з них виявлений поліморфізм. ABP-профілі сортів картоплі виявилися більш гетерогенними і мали значно більше фрагментів. В цілому маркерна система, що ґрунтується на оцінці поліморфізму інтронів генів актину (ABP-маркерна система) дозволила диференціювати різні сорти томату та картоплі. Показана значна різниця між профілями проаналізованих видів. Загалом поліморфізм інтронів генів актину виявився надійним джерелом генетичної інформації і може використовуватися як додаткова для генотипування та генетичної диференціації господарсько цінних рослин родини Solanaceae.

Ключові слова: ДНК-маркер, гени актину, інтрон, поліморфізм довжини, томати, картопля

Актуальність. В результаті селекційної роботи з кожним роком збільшується кількість сортів цінних сільськогосподарських культур. Це спонукає до постійного вдосконалення систем їх генотипування. ДНК-маркери стали незамінним інструментом у вирішенні цього питання. Зокрема за їх допомогою проводиться оцінка батьківських форм генотипів, вивчення

* Науковий керівник - доктор біологічних наук, директор ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Я. Б.Блюм

© А. С. ПОСТОВОЙТОВА, Я. В. ПІРКО, Я. Б.БЛЮМ, 2018

генетичної однорідності сортів, створених в результаті селекції, а також оцінюється генетична мінливість, створюються карти геномів господарсько цінних культур тощо [1, с. 1044-1054,2, с. 554–560].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Сьогодні існує велика кількість різних ДНК-маркерних систем, які досить успішно реалізують себе в сучасній генетиці та молекулярній селекції. Більшість з них належить до великої групи довільних ДНК-маркерів (Random DNA markers), які використовують для аналізу некодуючих ділянок геному або ділянок з невизначеною функцією. Найбільш поширені такі маркерні системи, як RAPD (random amplified polymorphic DNA) [3, с. 887–898], AFLP (amplified fragment length polymorphism) [4, с. 29–40], RFLP (restriction fragment length polymorphism) [4, с. 29–40] та SSR (simple sequence repeats) [5, с. 685–691]. Однак, зважаючи на інтенсивний розвиток програм зі секвенування геномів господарсько-цінних видів рослин, загальнодоступною стала інформація щодо послідовностей закодованих генів, їх структури, копійності, розташування в хромосомах тощо. Такі дослідження дали поштовх щодо створення нових, цільових ДНК-маркерних систем. Саме тому сьогодні в генетико-селекційних дослідженнях спостерігається перехід від довільних ДНК-маркерів до ген-специфічних маркерів (gene-targeted markers (GTMs) [6, с. 139–162]. Ключовою відмінністю GTMs є використання генів із розшифрованими послідовностями та функціями. Одним з перспективних напрямів розробки GTMs є вивчення поліморфізму довжин інтронів генів – ILP (intron length polymorphism) [7, с. 417–427]. Екзони часто є найконсервативнішими ділянками генів, а інтрони – гіперваріабельними, тобто потенційно можуть бути джерелом генетичного поліморфізму [8]. Шляхом підбору ген-специфічних праймерів до консервативних ділянок екзонів під час проведення ПЛР можна отримати копії інтронів та в подальшому виявити їх поліморфізм.

Родина Пасльонові (*Solanaceae*) є однією з найчисельніших родин покритонасінних рослин. Згідно з інформацією бази даних The Plant List (www.theplantlist.org) ця родина налічує близько 2 678 видів рослин, які поділені на 115 родів. Серед представників *Solanaceae* велика кількість господарсько цінних культур, зокрема томат (*Solanum lycopersicum*) та картопля (*Solanum tuberosum*). Також ці види вважаються модельними об’єктами родини та найбільш широко вивчаються сучасними генетиками та селекціонерами. В межах родини *Solanaceae* ДНК-маркери широко використовуються для встановлення філогенетичних зв’язків, створення генетичних карт господарсько цінних ознак, а також в порівняльній геноміці та селекційному доборі [9, с. 21-30]. Зокрема для томату та картоплі розроблено та протестовано різні ДНК-маркери, а саме: RAPD [3, с. 887–898,10, с. 127–136]], RFLP, AFLP [4, с. 29–40, 10, с. 127–136], SSR [5, с. 685–691, 10, с. 127–136] тощо.

Порівняно нещодавно були опубліковані дані щодо повного секвенування геному томату (The Tomato Genome Consortium 2012) [11, с. 635–641] та картоплі (The Potato Genome Sequencing Consortium 2011) [12, с. 189-195], в результаті чого стало можливим створення ген-специфічних ДНК-маркерних систем. Однією з таких маркерних систем є АВР (actin based polymorphism), що базується на виявленні поліморфізму довжин другого інтрону генів актину.

Мета дослідження. Метою даної роботи була оцінка можливості використання поліморфізму інтронів генів актину для генотипування та диференціації різних сортів томату та картоплі.

Матеріали і методи дослідження. Було проаналізовано 12 сортів томату (*S. lycopersicum*): Money Maker, Перлина, Волгоградський, Балконне Чудо золоте, Де Барао чорний, Тарасенко рожевий, Ефемер, Шапка Мономаха, Валютній, Американський Синій, Золотий Горіх та Де Барао рожевий, та 4 сорти картоплі (*S. tuberosum*): Зарево, Світанок, Левада та Вернісаж.

Тотальну геномну ДНК з десятиденних проростків виділяли за допомогою ЦТАБ-методу [13]. Кількість виділеної ДНК перевіряли спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» (США) з визначенням її концентрації, а також використовуючи 1,5 %-вий агарозний гель. ДНК зберігали за температури -20 °С.

ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора ThermalCycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) містила десятикратний ПЛР буфер з 200 мМ сульфатом амонію, 2,5 мМ$MgCl_2$, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мкМ кожного dNTPs, 0,5 од. Taq полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили з використанням наступного протоколу: початкова денатурація (95 °С) – 3 хв, 40 циклів ампліфікації (денатурація 95 °С – 45 с, віджиг праймерів 59 °С – 1хв, подовження 72 °С – 1 хв), кінцеве подовження 72 °С – 7 хв, 10 °С – утримання. Кожну ПЛР-реакцію проводили як мінімум в двократній повторності, щоб при подальшому електрофоретичному аналізі мати можливість виявити неспецифічні продукти ампліфікації.

Для виявлення поліморфізму довжин II-го інтрону генів актину використовували власноруч розроблені вироджені праймери, дизайн яких був здійснений на підставі аналізу консенсусних послідовностей генів актину рослин, представлених у базі даних Phytozome (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html):

ABP-F: 5'– TGG CAT CAY ACN TTY TAC AAY GA –3'

ABP-R: 5'–CCMCCACTTDAGVACRATGTT –3'.

Розділення утворених під час ПЛР фрагментів проводили з використанням електрофорезу в 6 %-вому неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1Х ТВЕ-буфері [13]. В кожну лунку наносили по 1 мкл зразку. Для визначення довжин фрагментів застосовували ДНК-маркер молекулярної маси (O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва). Розділені фрагменти візуалізували за допомогою забарвлення їх нітратом срібла [14, с. 339–348]. Цифрові зображення гелів аналізували використовуючи програму GelAnalyzer (http://www.gelanalyzer.com/).

Результати дослідження та їх обговорення. Як відомо, актин – є основним білком мікрофіламентів клітини [15, с. 2009–2019] та характеризується значною консервативністю екзонних ділянок генів. Одночасно інтронам генів притаманна гіперваріабельність нуклеотидних послідовностей, що свідчить про можливість детекції поліморфізму довжин інтронів та подальшу оцінку генетичної мінливості вибірок за цією ознакою. Варто зазначити, що подібна робота проводилася з використанням різних

сортів льону-довгунця [16, с. 38–42, 17, с. 34] на підставі аналізу поліморфізму інтронів генів β-тубуліну – ТВР (tubulin based polymorphism) [18, с. 281–291]. На сьогодні ТВР широко використовується для вивчення мінливості та генотипування різноманітних рослин. Зокрема, показана доцільність використання ТВР для генотипування сортів льону [19, с. 1-10],пшениці, ячменю [20, с. 82-86], вивчення генетичної мінливості популяцій егілопсу [21], тощо.

На рис. 1 представлені результати аналізу 12 сортів томату за допомогою АВР. На електрофореграмі спостерігаються чіткі смуги інтронів, що мають довжину в діапазоні від 700 п. н. до 1500 п. н. Кожен із досліджуваних зразків (сортів) містить не менше ніж по 7 ампліконів. Довжини утворених фрагментів у більшості сортів складали близько 1486, 1411, 1033, 963, 870, 846 п. н. Варто зазначити, що нижня смуга складається з двох фрагментів 753 п. н. та 743 п. н., які під час електрофорезу погано розділяються. Проаналізовані сорти за електрофоретичними спектрами виявилися достатньо однорідними, однак у зразку 10 (сорт Американський Синій) був виявлений амплікон, довжиною близько 1351 п. н. (на рис. 1 позначено стрілкою), який вирізняє цей сорт з поміж інших.

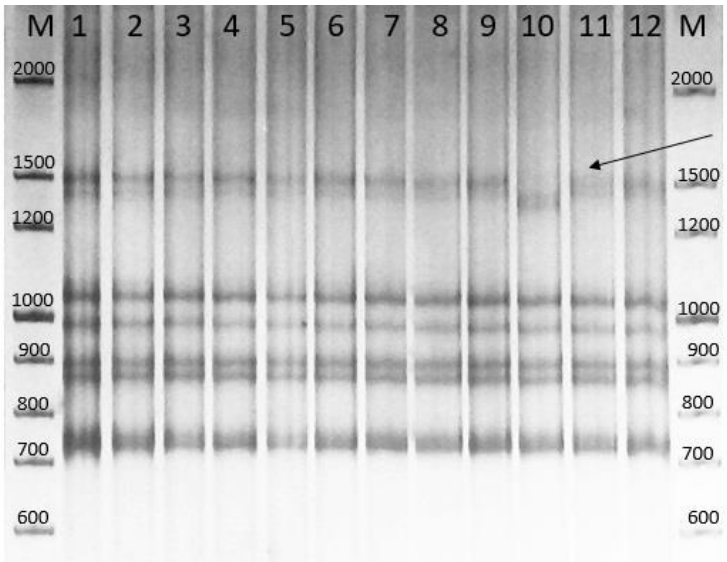

Рис. 1. АВР-профілі 12 сортів томату (*S. lycopersicum*); М – маркер; 1 – 12 (у верхній частині рисунків) – номери зразків: 1– MoneyMaker, 2 – Перлина, 3 – Волгоградський, 4 – Балконне Чудо золоте, 5 – Де Барао чорний, 6 – Тарасенко рожевий 7 – Ефемер, 8 – Шапка Мономаха, 9 – Валютній, 10 – Американський Синій, 11 – Золотий Горіх, 12 – Де Барао рожевий; стрілкою позначена поліморфна зона

На електорофореграмі (рис. 2) показані результати аналізу 4 сортів картоплі з використанням АВР-аналізу. АВР-профілі картоплі мають значну кількість фрагментів, що розподіляються в діапазоні від 780 п. н. до 2000 п. н. Смуги, які розташовуються в зоні вище 2000 п. н. не аналізувалися, оскільки вони є нечіткими, нестабільними та не були передбачені біоінформаційним аналізом (відсутні інтрони такої довжини на підставі аналізу геному картоплі в базі даних Phytozome). В межах кожної проби візуалізується не менше 15 ампліконів різної довжини. Найбільш щільний розподіл фрагментів спостерігається в діапазоні від 700 п. н. до 900 п. н. Серед чотирьох проаналізованих сортів картоплі визначено різні фенотипи

через присутність різної кількості поліморфних зон (на рис. 2 деякі позначені стрілками). Наприклад, у зразку 3 (сорт Зарево) був виявлений унікальний амплікон, довжиною близько 630 п. н.

Таким чином, в результаті проведеного аналізу було порівняно АВР-профілі двох сільськогосподарських культур родини *Solanaceae*: томату (S. *lycopersicum*) та картоплі (*S. tuberosum*). Виявилося, що види S. *lycopersicum* та*S. tuberosum* значно відрізняються між собою як за кількістю фрагментів, так і за їх розподілом на електрофореграмах, однак безперечно мають спільні амплікони, що свідчить про їх генетичну спорідненість та спільні філогенетичні зв'язки. Значно більша кількість ампіконів візуалізувалася у сортів картоплі. Також АВР-профілі картоплі виявилися більш гетерогенними. Імовірно це пов'язано з особливостями селекційного добору сортів картоплі та томату, а також з особливостями запилення представників родини *Solanaceae*.

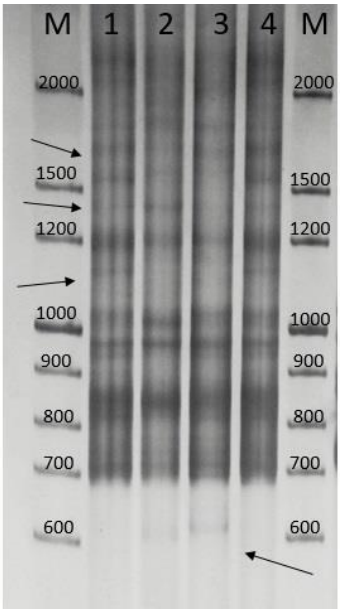

Рис. 2. АВР-профілі 4 сортів картоплі (*S. tuberosum*); М – маркер; 1 – 4 (у верхній частині рисунків) – номера зразків: 1– Світанок, 2 – Левада, 3 – Зарево, 4 – Вернісаж; стрілками позначені поліморфні зони

Висновки та перспективи. АВР – маркерна система, що заснована на оцінці поліморфізму довжин другого інтрону генів актину, в цілому виявилася придатною для ДНК-профілювання сортів томату та картоплі, незважаючи на те, що диференціація сортів томату за цим видом маркерів виявилася невисокою. Ймовірно, що АВР доцільно використовувати разом з іншими молекулярними маркерами для генотипування та диференціації сортів рослин під час проведення генетико-селекційних досліджень.

References

1. Khlestkina, E. K. (2013). Molecular markers in genetic studies and breeding. Vavilov J. Genetics Breed., 17, 1044-1054. doi:10.1134/S2079059714030022

2. Andersen, J. R., Lubberstedt, T. (2003). Functional markers in plants. Trends Plant Sci., 8, 554–560.

3. Bernatzky, R., Tanksley, S. D. (1986). Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. Genetics, 112, 887–898.

4. Saliba-Colombani, V., Causse, M., Gervais, L., Philouze, J. (2000). Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. Genome, 43, 29–40.doi: 10.1139/gen-43-1-29

5. Ohyama, A., Asamizu, E., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H., Tabata, S., Fukuoka, H. (2009). Characterization of tomato SSR markers developed using BAC-end and cDNA sequences from genome databases. Mol. Breed., 23, 685–691. doi:10.1007/s11032-009-9265-z

6. Gupta, P. K., Rustgi, S. (2004). Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. Funct. Integr. Genomics., 4, 139–162.doi: 10.1007/s10142-004-0107-0

7. Wang, X., Zhao, X., Zhu, J., Wu, W. (2005). Genome-wide investigation of intron length polymorphisms and their potential as molecular markers in rice (*Oryza sativa L*.). DNARes., 12, 417–427.doi:10.1093/dnares/dsi019

8. Postovoitova, A. S., Bayer, G. Ya., Pydiura, N. A., Pastukhova, N. L., Pirko, Ya.V., Yemets, A. I., Blume, Ya.B. (2015). Poshuk ta analiz poslidovnostey geniv aktinu v genomi l'onu [Search and analysis of sequences of the actin genes in flax genome]. NUBIP scientific reports, 8(57). UPL: http://nd.nubip.edu.ua/2015_8/index.html/

9. Shirasawa, K., Hirakawa, H. (2013). DNA marker applications to molecular genetics and genomics in tomato. Breed. Sci., 63, 21-30. doi:10.1270/jsbbs.63.21

10. Milbourne, B. D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J. (2010). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Mol. Breed., 3(2), 127–136.

11. Sato, Sh., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamozu, E. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature, 485, 635–641. doi:10.1038/nature11119

12. Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. Nature, 475(7355), 189-195. doi:10.1038/nature10158

13. Sambrook, J., David, W. R. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manua. Cold Spring Harbor, 2, 2344.

14. Rahman, M. H., Jaquish, B., Khasa, P. D. (2000). Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains. Plant Mol. Biol. Rep., 18, 339–348.

15. Gunning, P. W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., Robinson, R. C. (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments.J. Cell Sci., 128(11), 2009–2019. doi: 10.1242/jcs.165563

16. Postovoitova, A. S., Pirko, Ya.V., Blume, Ya.B. (2016). Polimorfizm dovgin drugogo intronu geniv actinu v genomi *Linum usitatissimum* L. [The second intron length polymorphism of actin genes in *Linum usitatissimum* L. genome]. Factors of experimental evolution of organisms, 19, 38 – 42.

17. Postovoitova, A. S., Yotka, O. Y., Pirko, Ya. V., Blume, Ya. B. (2017). Analysis of polymorphism of the lengths of introns of actin genes in representatives of the genus LINUM. Plant biology and biotechnology: materials of the III conference of young scientists. Kyiv (Ukraine), 34.

18. Bardini, M., Lee, D., Donini, P., Mariani, A., Giani, S., Toschi, M., Lowe, C., Breviario, D. (2004). Tubulin–based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species. Genome, 47, 281–291. doi: 10.1139/g03-132

19. Rabokon, A. N., Pirko, Ya.V., Demkovych, A. Ye., Blume, Ya.B. (2018). Comparative analysis of the efficiency of intron-length polymorphism of β–tubulin genes and microsatellite loci for flax varieties genotyping. Cytol. Genet., 52(1),1-10.

20. Rabokon, A. N., Demkovych, A., Pirko, Ya., Blume, Ya. (2015). Doslidgennya polimorfizmu dovgeni introniv geniv β-tubulinu u sortiv *Triticum aestivum* L. ta *Hordeum vulgare* L. [Studing of β-tubulin gene intron length polymorphism of *Triticum aestivum* L.

and *Hordeum vulgare* L.varieties]. Factors of experimental evolution of organisms, 1, 82 – 86.

21. Rabokon, A., Demkovych, A., Sozinov, A., Kozub, N., Sozinov, I., Pirko, Ya., Blume, Y. (2017). Intron length polymorphism of β-tubulin genes of *Aegilops biuncialis* Vis. Cell Biol. Intl. doi: 10.1002/cbin.10886.

POLYMORPHISM OF ACTIN GENE INTRONS AS AN INSTRUMENT FOR GENOTIVING OF THE REPRESENTATIVES FROM *SOLANACEAE* FAMILY

A. S. Postovoitova, Ya. V. Pirko, Ya. B.Blume

Abstract. *In modern selection, DNA markers are an indispensable tool for identifying and selecting genotypes of economically valuable crops. New and promising direction of development of molecular markers is a gene-targeted markers (GTMs), namely markers, which are based on the identified intron length polymorphism of genes (ILP). The aim of the study is to evaluate the usefulness of the length polymorphism of the second actin gene intron (ABP-actinbasepolymorphism) for DNA-profiling varieties of plants from family Solanaceae.DNA was isolated from seedlings using CTAB-method. PCR was conducted using our own universal ABP primers. The fragments were separated by electrophoresis in a 6% polyacrylamide gel, and visualized by silverstains. 12 varieties of tomato (S. lycopersicum) and 4 potato varieties (S. tuberosum) were analyzed. Each tomato variety contained at least 7 fragments of II-nd intron, but only one polymorphic bend was detected. The ABP-profiles of the potato varieties were more heterogeneous. The different varieties of tomatoes and potatoes were identificated by ABP marker system. It was shown the significant difference between the profiles of the analyzed species. In general, ABP-markers are a reliable source of genetic information and can be widely used for genotyping and evaluating of the differentiation of commercially valuable plantsof Solanaceae.*

Keywords: DNA marker, actin genes, intron, length polymorphism, tomato, potato.

ПОЛИМОРФИЗМ ИНТРОНОВ ГЕНОВ АКТИНА КАК ИНСТРУМЕНТ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *SOLANACEAE*

А. С. Постовойтова, Я. В. Пирко, Я. Б. Блюм

Аннотация. *В современной селекции ДНК-маркеры являются незаменимым инструментом для идентификации и отбора генотипов хозяйственно ценных культур. Новым и перспективным направлением разработки молекулярных маркерных систем являются ген-специфические ДНК-маркеры (GTMs), в том числе маркеры, основанные на выявлении полиморфизма длины интронов целевых генов (ILP).*

Целью работы было оценить возможность использования полиморфизма интронов генов актина, а именно длин II-го интрона генов актина (ABP-actin base polymorphism) для генотипирования сортов томата и картофеля (Solanaceae). ДНК выделяли из проростков с помощью ЦТАБ-метода. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием собственноручно разработанных универсальных

праймеров. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 6 %-ном полиакриламидном геле с последующей визуализацией путем окраски нитратом серебра. В результате анализа 12 сортов томата и 4 сортов картофеля обнаружено, что каждый из сортов томата содержал не менее 7 ампликонов II-го интрона генов актина и только в одном из них обнаружен полиморфизм. ABP-профили сортов картофеля оказались более гетерогенными и имели значительно больше фрагментов. Маркерная система, основанная на оценке полиморфизма интронов генов актина (ABP-маркерная система), позволила идентифицировать различные сорта томата и картофеля. Показана значительная разница между профилями проанализированных видов. В общем полиморфизм интронов генов актина оказался надежным источником генетической информации и может использоваться для генотипирования и генетической дифференциации хозяйственно ценных растений семейства Solanaceae.

Ключевые слова: ДНК-маркер, гены актина, интрон, полиморфизм длины, томат, картофель