

ПОПУЛЯЦИОННЫЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В АНТРОПОГЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ СРЕДЕ

УДК 575.2:577.2

Я.В. Пірко

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ РІЗНИХ ВИДІВ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ АНАЛІЗУ ПОЛІМОРФІЗМУ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНА

молекулярно-генетичні маркери, поліморфізм, ген, інтрон, β -тубулін

Вступ

Оцінка генетичної мінливості є основою у вивченні біорізноманітності і філогенії видів, дослідженні динаміки популяцій, а також для оцінки впливу різних екологічних факторів на генетичну структуру популяцій [1–3]. Для вирішення цих питань досить широко використовують молекулярно-генетичні маркери, зокрема, ДНК-маркери. На сьогодні існує велика їх кількість. Кожен з них має свої переваги та недоліки, деякі використовуються тільки з певною метою. В той же час, у міру накопичення інформації про структуру геному, постійно продовжуються пошуки нових, більш ефективних, зручних і дешевих маркерних систем для проведення генетичного аналізу.

Досить популярними серед ДНК-маркерів, що використовуються у популяційно-генетичних дослідженнях, є SSR маркери (Simple Sequence Repeats) або мікросателіти, оскільки методика їх застосування відносно недорога та порівнянно легка [9, 14]. Крім того, вони мають кодомінантний характер успадкування, що також важливо у генетичних дослідженнях. До іншої корисної групи маркерів відносяться так звані STS маркери (Sequence Tagged Sites), які дозволяють аналізувати поліморфізми певних послідовностей в генах. STS маркери привабливі тим, що спираються на знання сиквенсів частин генів, що нерідко відповідають за ті чи інші ознаки, які ми можемо безпосередньо спостерігати [8, 15].

До нової генерації маркерів, що суміщають в собі простоту аналізу мікросателітів та інформаційність STS маркерів, можна віднести нещодавно відкриті маркери, що ґрунтуються на знанні структури генів, які кодують білки тубуліни. Варто зазначити, що тубуліни є ключовими білками клітинного циклу (входять до складу мікротрубочок) і відіграють дуже важливу роль у життєдіяльності клітини (наприклад, транспорт везикул, поділ клітин, формування клітинної стінки та інше) [5, 11–13, 16]. На сьогодні відомі декілька форм тубулінів (α -, β -, γ -тубуліни) і є інформація, що цих форм може бути набагато більше. Проте, до добре досліджених відносяться α - та β -тубуліни [11]. Враховуючи велику значимість цих білків, можна передбачити певну їхню консервативність у рослин різних систематичних груп (гомологію за амінокислотними послідовностями), відповідно, й нуклеотидних послідовностей генів, що їх кодують. У більшості випадків це стосується екзонів (кодуючих ділянок генів). В той же час інтрони тубулінів належать до гіперваріабельних ділянок генів і можуть мати різну довжину. Особливої уваги в цьому відношенні заслуговує перший (I-ий) інтрон β -тубуліна, який починається з 397 нуклеотиду після стартового кодону ATG. З обох боків цей інтрон оточують відносно консервативні ділянки екзонів [4]. Підбравши до цих консервативних ділянок праймери, можна за допомогою полімеразної ланцюгової реакції отримати багато копій послідовностей, що знаходяться між ними, тобто, інтронів. Завдяки тому, що довжина інтронів у різних таксономічних одиниць (і навіть рослин в межах однієї одиниці) може бути різною, то спостерігається поліморфізм. Таким чином, поліморфізм довжин інтронів (TBP, tubulin base polymorphism) – нова маркерна система, яка може використовуватися у генетичному аналізі рослин і яка ґрунтується на визначенні поліморфізму довжин інтронів генів β -тубуліна [4, 6, 7]. За допомогою цієї системи на цей час вже проаналізовано деякі види родів *Brassica* L., *Lotus* L., *Coffea* L., *Eleusine Gaertn.*, *Rosa* L. [4, 6, 7]. Варто зазначити, що в подальшому дослідникам вдалося залучити до аналізу і другий інтрон β -тубуліна, збільшивши тим самим диференціальну здатність методу [6, 7]. Однак цей інтрон може зустрічатися не у всіх рослин, наприклад, він відсутній у *Zea mays* L. [10], що може створити певні незручності у проведенні аналізу.

Мета роботи – оцінити можливості використання поліморфізму довжин інтронів у генетичних дослідженнях рослин систематичних груп, які раніше ще не досліджували за допомогою цієї маркерної системи, зокрема, видів родів *Hordeum* L., *Triticum* L., деяких представників родів *Pinus* L., *Picea* L. та *Achillea* L.

Матеріали та методи досліджень

Аналізували рослинні матеріали наступних видів рослин: ялина європейська (*Picea abies* L. Karst.) – хвоя, сосна гірська (*Pinus mugo* Turra) та с. звичайна (*P. sylvestris* L.) – насіння, різні сорти пшениці (*Triticum aestivum* L.) та ячміню (*Hordeum vulgare* L.) – етильовані проростки або зелена маса, деревій голий (*Achillea glaberrima* Klokov) та д. тонколистий (*Achillea leptophylla* Vieb.) – проростки. ДНК екстрагували за допомогою GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit («Sigma-Aldrich», США). Якість отриманої ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі, а також спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf» з визначенням її концентрації.

Послідовності праймерів для проведення полімеразної ланцюгової реакції взято з літературних джерел [7]. Було використано наступні праймери:

TBP F: 5'- AACTGGGCBAARGGNCAUTAYAC-3'

TBP R: 5'- ACCATRCAUTCRTCDGCRTTYTC -3'.

Праймери синтезовано на приладі AB 3400 DNA Synthesizer з наступною доочисткою (ЦККП «Гентест», Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України). В подальшому їх було використано для проведення ПЛР на ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 25 мкл) містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію («Helicon», Росія), 50 нг рослинної ДНК, по 0,2 мкМ праймерів, по 200 мкМ dNTPs, 0,5 од. Taq полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили за наступним температурним протоколом: початкова денатурація (94 °С) – 3 хвилини, 45 циклів ампліфікації (денатурація 94 °С – 30 секунд, віджиг праймерів 55 °С – 30 секунд, подовження 72 °С – 1 хвилина), кінцеве подовження 72 °С – 7 хвилин, 4 °С – утримання. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі в 1X TBE-буфері в присутності етидії броміду. Візуалізацію фрагментів проводили в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркери (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, ready-to-use та O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати досліджень та їх обговорення

Результати проведеного електрофоретичного аналізу свідчать, що під час ампліфікації утворюються амплікони довжиною приблизно від 120 до 1200 пар нуклеотидів (п.н.). Їх кількість у видів, що досліджували, варіювала і в цілому складала до 10 зон (рис. 1, 2, 3). Найбільшу кількість ампліконів було виявлено під час аналізу рослин роду *Achillea*, а найменшу – у видів родів *Pinus* та *Picea*. У пшениці амплікони мали розміри від 210 п.н. до 1000 п.н., в той час як у ячменю вони були в межах від 200 до 2000 п.н. За кількістю ампліконів (ділянками інтронів β-тубуліна) пшениця була представлена більшою кількістю зон, ніж ячмінь (див. рис. 1). Проаналізували 6 сортів ячменю та 4 сорти пшениці, поки не вдалося виявити внутрішньосортний та міжсортний поліморфізм в межах досліджуваних родів. Оскільки як ячмінь, так і пшениця відносяться до самозапильних рослин, то важко очікувати на наявність будь-якого поліморфізму за інтронами β-тубуліна в межах сорту. Враховуючи те, що TBP є кодомінантною маркерною системою, візуалізація за окремими зонами «гетерозигот» в межах одного сорту може свідчити про ймовірну наявність чужорідного генетичного матеріалу. Як буде в подальшому продемонстровано, поліморфізм за інтронами β-тубуліна більше характерний для перехреснозапильних рослин, хоча і у пшениці та ячменю він також не виключений за умов порівняння різних сортів.

Якщо аналізувати перехреснозапильні рослини, то тут спостерігається дещо інша картина. Наприклад, у *Pinus mugo* вдалося виявити три амплікона (210 п.н., 300 п.н., 340 п.н.), що відповідають інтронам тубулінів, а у *Pinus sylvestris* таких ампліконів виявилось лише два (300 п.н., 340 п.н.). У *Pinus sylvestris* був відсутній амплікон довжиною 210 п.н. (див. рис. 2).

Як видно з рисунку 2 досить чітко проявляється різниця між *Pinus mugo* та *P. sylvestris* за спектрами інтронів β-тубуліна. Не виключено, що цю властивість можна було б використати для диференціації цих двох видів, а також для вивчення процесів гібридизації між ними.

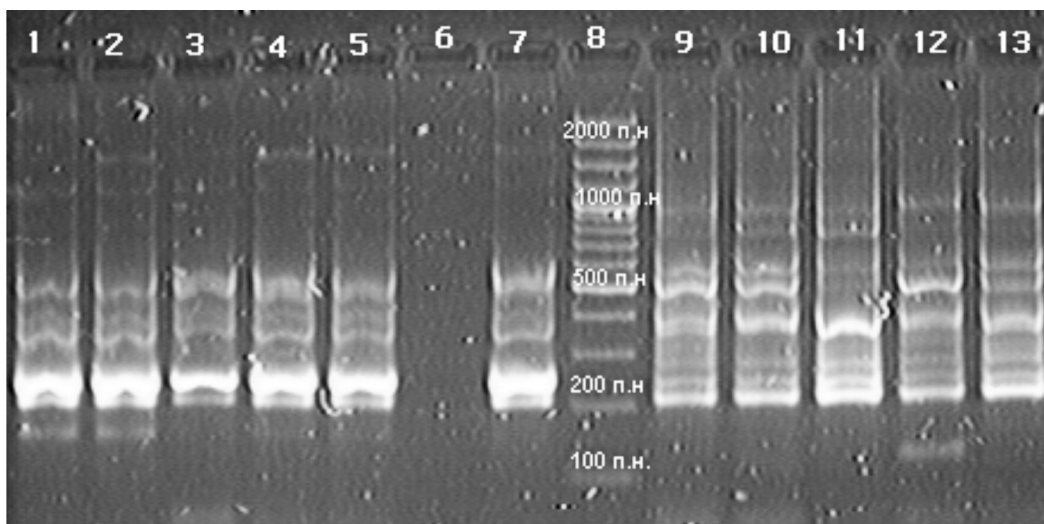


Рис. 1. Електрофореграма інтронів β -тубуліна у сортів ячменю та пшениці. Зразки 1–5, 7 – сорти ячменю (Султан, Бад'орій, Сталкер, Гамбрінус, Джерело, Звершення); 6 – контроль (без додавання ДНК); 8 – ДНК-маркер – (O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder); 9 – 13 – сорти пшениці (Ліана, Селянка, Дюк, Жайвір, Гурт СГІ)

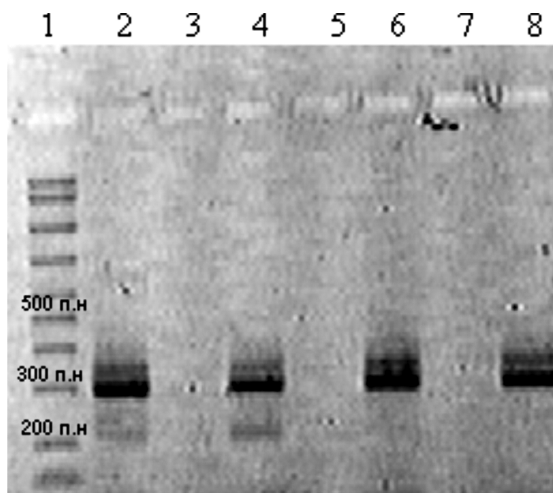


Рис. 2. Електрофореграма інтронів β -тубуліна у *Pinus mugo* Turra (зразки 2, 4) та *P. sylvestris* L. (зразки 6,8); 1 – ДНК-маркер – (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder)

Схожий спектр інтронів тубулінів спостерігається у *Picea abies* (див. рис. 3). Візуалізується три досить чітких зони – 210 п.н., 300 п.н. та 350 п.н. Найбільш вдалим ТВР аналіз може виявитися у дослідженні генетичного різноманіття та філогенетичних взаємовідносин у перехреснозапильних покритонасінних рослин. В якості прикладу можна навести ТВР спектри двох видів деревію *Achillea leptophylla* та *A. glaberrima*. Як видно з рисунка 4, на електрофореграмі спостерігається досить значна кількість ампліконів задовільної якості (120 п.н., 160 п.н., 210 п.н., 230 п.н., 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н.), які можна використовувати у аналізі. До речі, у обох видів вдалося виявити внутрішньовидовий поліморфізм за деякими з них, а саме: 230 п.н. – у *A. leptophylla*, 480 п.н., 550 п.н., 700 та 720 п.н., 1000 та 1200 п.н. – у *A. glaberrima* та *A. leptophylla* (рис. 4).

Слід зазначити, що, наприклад, під час дослідження різних культиварів *Brassica napus* L. var. *napus* завдяки ТВР було виявлено 13 поліморфних зон в інтервалі (205 – 275 п.н.). Встановлено чіткий збіг між специфічними смугами (зонами) та певними індивідами культиварів [4]. Досліджуючи ТВР у *Coffea arabica* L., *C. eugenoides* S. Moore та *C. canephora* Pierre ex A. Froehner за допомогою ТВР вдалося виявити внутрішньовидовий поліморфізм у *C. canephora*, тоді як він був відсутній у *C. arabica*. В цілому для цих трьох видів було виявлено 7 смуг у діапазоні 587 – 1000 п.н. ТВР метод дозволив чітко диференціювати всі три види, а також підтвердити

Рис. 3. Електрофореграма інтронів β -тубуліна у *Picea abies* L. Karst. (зразки 1, 3); 5 – ДНК-маркер – (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder)

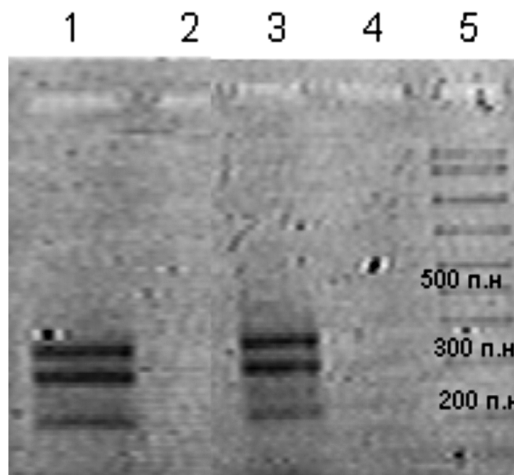
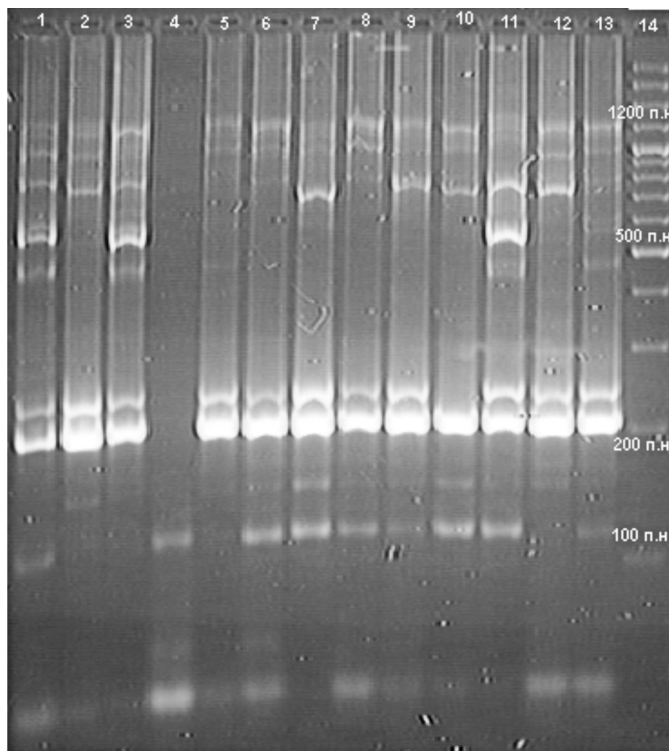


Рис. 4. Електрофореграма інтронів β -тубуліна у двох видів роду *Achillea* L. Зразки 1–3 – *Achillea glaberrima* Klokov; 4 – зразок без додавання ДНК (контроль); зразки 5–13 – *Achillea leptophylla* M. Bieb.; 14 – ДНК-маркер – (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder)

гіпотезу, що *C. eugenoides* є одним з прабатьків *C. arabica* [4]. Проведений кластерний аналіз на базі ТВР у *Rosa* ssp. продемонстрував узгодженість результатів досліджень з напрямками селекційних програм для 20 різних різновидів *Rosa*, які мали різні властивості і були виведені для різних цілей [6].

Заключення

За результатами проведених досліджень, можна з впевненістю говорити про непогану диференціюючу спроможність методу поліморфізму довжини інтронів і про можливість його використання у генетичних дослідженнях перехреснозапильних видів рослин, зокрема популяційно-генетичного та філогенетичного спрямування. Менш доцільним є використання цього методу у дослідженнях самозапильних рослин, хоча, враховуючи простоту методу, він може бути використаний як додатковий засіб для «насичення» об'єкта генетичними маркерами.

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях / Юрий Петрович Алтухов. – М.: Академкнига, 2003. – 432 с.
2. Алтухов Ю.П. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука, 2004. – 622 с.
3. Коршиков И.И. Популяционно-генетические проблемы дендротехногенной интродукции (на примере сосны крымской) / И.И. Коршиков, Н.С. Терлыга, С.А. Бычков. – Донецк: ООО «Лебедь». – 2002. – 328 с.
4. 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 [et al.] // Genome. – 2004. – Vol. 47. – P. 281 – 291.

5. *Blume Ya.* Plant tubulin phosphorylation / Ya. Blume // The plant cytoskeleton: key tool for agrobiotechnology, [Eds. Ya. Blume, W. Baird, A. Yemets and D. Breviario]. – Berlin; Heidelberg; NY: Springer-Verlag. – 2008. – P. 145 – 159.
6. *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.
7. *Breviario D.* High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined b-tubulin introns/ D. Breviario, W. V. Baird, S. Sangoi [et al.] // Mol. Breeding. – 2007. – Vol. 20. – P. 249 – 259.
8. *Lagudah E.S.* Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens / E. S. Lagudah, S. G. Krattinger, S. Herrera-Foessel [et al.] // Theor. Appl. Genetics. – 2009. – Vol. 119, № 5. – P. 889 – 898.
9. *Li Y.-C.* Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review / Y.-C. Li, A.B. Korol, T. Fahima [et al.] // Molecular Ecology. – 2002. – Vol. 11. – P. 2453–2465.
10. *Liaud M.-F.* The β -tubulin gene family of pea: primary structures, genomic organization and intron-dependent evolution of genes / M.-F. Liaud, H. Brinkmann, R. Cerff // Plant Mol. Biol. – 1992.– Vol. 18. – P. 639 – 651.
11. *McKean P. G.* The extended tubulin superfamily / P.G. McKean, S. Vaughan, K. Gull // Journal of Cell Science. – 2001. – Vol. 114. – P. 2723 – 2733.
12. *Nogales E.* Structural insights in to microtubule function / E. Nogales // Annu. Rev. Biochem. – 2000. – Vol. 69. – P. 277 – 302.
13. *Peter N.* Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants / N. Peter // Int. Rev Cytol. – 1998. – Vol. 184. – P. 33 – 80.
14. *Rahman M. H.* Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains / M.H. Rahman, B. Jaquish, P.D. Khasa // Plant Molecular Biology Reporter. – 2000. – Vol. 18. – P. 339 – 348.
15. *Smith P.H.* STS markers for the wheat yellow rust resistance gene *Yr5* suggest a NBS–LRR-type resistance gene cluster / P.H. Smith, J. Hadfield, N.J. Hart [et al.] // Genome. – 2007. – Vol. 50. – P. 259 – 265.
16. *Yemets A.* Does tubulin phosphorylation correlate with cell death in plant cells? / A. Yemets, Y. Sheremet, Ya. Blume // BMC Plant Biology. – 2005. – Vol. 5, № 36 – P. 1–3.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України

Надійшла 25.08.2011

УДК 575.2:577.2

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ РІЗНИХ ВИДІВ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ АНАЛІЗУ ПОЛІМОРФІЗМУ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНА

Я.В. Пірко

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України

Описано нову маркерну систему, що базується на поліморфізмі першого інтрона генів β -тубуліна. Розглядається використання її для характеристики генетичного поліморфізму деяких видів рослин, описано умови проведення експерименту та електрофоретичні спектри. Встановлено, що кількість ампліконів, які відповідають першому інтрону β -тубуліна, може варіювати в досить широких межах. Показано використання цієї системи для перехреснозапильних та самозапильних видів рослин.

UDC 575.2:577.2

STUDYING OF GENETIC DIVERSITY DIFFERENT SPECIES OF PLANTS BY ANALYZING POLYMORPHISM OF INTRONS OF β -TUBULIN GENES

Ya. V. Pirko

Institute of food biotechnology and genomics NAS of Ukraine

The new marker system based on the first intron polymorphism of β -tubulin genes is represented. The conditions of the experiment, electrophoretic data and genetic polymorphism of some species of plants with using this system are described. It was found that the number of the amplicons that correspond to the first intron of β -tubulin can be varying quite widely. The using of this system for cross-pollinated and self-pollinated plants species was shown.