

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ ИНТРОНОВ ГЕНОВ β-ТУБУЛИНА У РАСТЕНИЙ РОДА *LINUM L.*

Лен культурный (*Linum usitatissimum L.*) – древнейшее сельскохозяйственное растение, широко используемое в различных отраслях промышленности [1], является одной из пяти основных масличных культур мира и считается третьей по величине прядильной культурой. История возделывания льна как технической культуры насчитывает уже многие тысячи лет, и недавние исследования позволили обнаружить следы льняных волокон в пещерах Грузии еще периода палеолита (30 тыс. лет тому назад) [2]. Будучи однолетним самоопыляемым травянистым растением, лен является модельным видом для изучения волокнистых растений [2, 3].

Анализ видового и генотипического разнообразия является ключевым компонентом для эффективного использования генетических ресурсов льна [4]. Важным инструментом для однозначной и быстрой идентификации видов и генотипов является фингерпринтинг, основанный на использовании молекулярных маркеров [5]. Для генотипирования сельскохозяйственных культур используют различные системы молекулярных маркеров, которые различаются распределением по геному, уровнем выявляемого полиморфизма, специфичностью или универсальностью [5, 6]. Одной из сравнительно новых систем генотипирования является метод, основанный на использовании полиморфизма длины интронов генов β-тубулина (tubulin-based polymorphism – ТВР) [7, 8]. ТВР-метод основывается на том, что в связи с ключевой ролью α- и β-тубулина, составляющих основу микротрубочек [9], последовательности их экзонов, в частности β-тубулина, довольно консервативны у всех эукариотических организмов. У растений почти все гены β-тубулина имеют сходную организацию: два интрона, расположенные в четко фиксированных локусах в пределах экзонов (исключение – гены β-тубулина у кукурузы *Zea m. TUB1* и риса *Oryza TUB2*, в которых присутствует только первый интрон) [10, 11]. Длина первого интрона может варьировать между генами, кодирующими различные

изотипы β-тубулина [12]. Праймеры, подобранные к этим консервативным участкам, позволяют амплифицировать I-й интрон β-тубулина, являющийся более вариабельным и менее консервативным участком в генах β-тубулина по сравнению с экзонными последовательностями за счет разной скорости эволюции этих двух элементов [8, 10, 11].

На сегодняшний день различные виды и генотипы льна активно исследуются с помощью анонимных последовательностей, например, SSR, ISSR, RAPD [5, 6, 8, 13]. Вместе с тем маркеры, основанные на изучении последовательностей конкретных генов, в частности генов тубулинов, до сих пор еще не использовались. Поэтому целью работы стало оценить возможность использования ТВР-метода для молекулярно-генетической дифференциации различных видов льна.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили виды льна-долгунца *L. usitatissimum*, льна многолетнего *L. perenne L.*, льна-кудряша *L. humile Mill. (L. humile cv. Орфей и L. humile cv. Эврика)*, льна узколистного *L. angustifolium Huds.* и льна двулетнего *L. bienne Mill.*

Геномную ДНК экстрагировали из проростков с помощью бромида цетилтриметиламмония [14]. Качество и количество ДНК проверяли с помощью электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле и спектрофотометрически на биофотометре «Eppendorf». Образцы ДНК хранили при –20°C. ТВР-анализ проводили согласно Vardini et al. [11]. Последовательности использованных праймеров [11] приведены ниже:

ТВР-F: 5' – ААСТGGGCВААRGGNCAУТАУАС – 3';
ТВР-R: 5' – АССАТRCAУТCRТCDGCRТТУТС – 3'.

ПЦР осуществляли с помощью амплификатора Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакционная смесь (объемом 10 мкл) состояла из: десятикратного буфера для ПЦР, содержащего сульфат аммония 200 мМ,

2,5 ммоль $MgCl_2$, 50 нг растительной ДНК, 1 мкМ каждого из праймеров, 200 мкМ каждого дНТФ, 0,5 ед. Taq полимеразы («Fermentas», Литва). Амплификацию проводили в соответствии со следующим протоколом: начальная денатурация (94°C) – 3 мин, 35 циклов амплификации (денатурация 94°C – 30 с, отжиг праймеров 55°C – 40 с, элонгация 72°C – 1,5 мин), завершающая элонгация 72°C – 8 мин, 15 °C – удержание [10]. Каждую ПЦР проводили как минимум в двукратной повторности с использованием отрицательного контроля (не содержащего ДНК).

Продукты амплификации (образец объемом 0,4 мкл) разделяли с помощью электрофореза в 6 %-ном неденатурирующем полиакриламидном геле в 1хТВЕ-буфере [14] при 360 В в течение 4 часов с последующим окрашиванием нитратом серебра [15, 16]. Цифровые фотографии гелей анализировали с использованием программы GelAnalyzer [17]. Размер воспроизводимых и наиболее четких фрагментов (полос) определяли, используя ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Если результаты электрофореза ампликонов совпадали, то учитывали все полосы. В тех случаях, когда результаты отличались, проводили повторную амплификацию и учитывали лишь сходные полосы для двух последовательных ПЦР. Коэффициент сходства Нея и Ли [18] между генотипами определяли при помощи программы FreeTree [19] на основе наличия/отсутствия амплифицированных фрагментов у проанализированных образцов. Значения сходства были использованы для кластерного анализа и построения филогенетических деревьев с применением метода невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA). Результаты кластеризации оценивали на основе 1000 бутстрепов [20]. Полученные дендрограммы визуализировали с помощью программы FigTree [18]. Уровень полиморфизма маркеров оценивали по среднему значению Polymorphism Information Content (PIC), рассчитываемого по формуле:

$$PIC = \frac{\sum_{i=1}^n (1 - f_{ai}^2 - f_{bi}^2)}{n},$$

где n – общее количество фрагментов, f_a – частота образцов, в которых отсутствовал i -й фрагмент, f_p – частота образцов, в которых присутствовал i -й фрагмент [21].

Результаты и обсуждение

Дифференцирующая способность ТВР-метода была проверена на пяти видах льна, а именно: *L. usitatissimum*, *L. perenne*, *L. humile*, *L. angustifolium* и *L. bienne*. Однако сразу необходимо отметить, что таксономия рода *Linum* L. и по сей день остается неоднозначной. Ряд авторов некоторые из приведенных выше видов считают подвидами *L. usitatissimum* или рассматривают *L. angustifolium* и *L. bienne* как один вид. На рис. 1А представлена электрофореграмма с результатами анализа различных образцов льна с помощью ТВР-метода. Результаты электрофоретического анализа свидетельствуют о том, что основная зона распределения фрагментов находится в диапазоне от 400 п.н. до 1900 п.н. Всего было зафиксировано 46 амплифицированных фрагментов различной длины, однако 17 из них являются уникальными, встречаясь только у вида *L. perenne*. При совместном рассмотрении образцов *L. humile* (cv. *Эврика* и cv. *Орфей*), *L. usitatissimum*, *L. angustifolium* и *L. bienne* зафиксировано 29 различных фрагментов, из которых 16 являются полиморфными с приблизительным размером ампликонов 400 п.н., 457 п.н., 460 п.н., 480 п.н., 670 п.н., 690 п.н., 795 п.н., 800 п.н., 815 п.н., 1030 п.н., 1080 п.н., 1130 п.н., 1600 п.н., 1700 п.н., 1865 п.н. При сравнении всех образцов, за исключением *L. perenne*, значение PIC составило 0,210.

Образец *L. perenne* значительно отличается от других анализируемых видов. Для него характерен набор фрагментов размером 407 п.н., 415 п.н., 440 п.н., 457 п.н., 480 п.н., 515 п.н., 530 п.н., 580 п.н., 595 п.н., 680 п.н., 690 п.н., 710 п.н., 760 п.н., 795 п.н., 810 п.н., 820 п.н., 940 п.н., 1070 п.н., 1080 п.н., 1150 п.н., 1180 п.н., 1350 п.н., 1470 п.н., 1570 п.н., 1865 п.н. При этом две трети фрагментов являются уникальными для этого образца (17 полос), и лишь 8 фрагментов (размером 457 п.н., 480 п.н., 580 п.н., 690 п.н., 760 п.н., 795 п.н., 1080 п.н., 1865 п.н.) схожи с остальными образцами. Очевидно, это объясняется тем, что *L. perenne* является более удаленным родственником исследуемых видов, что подтверждается высокими различиями в морфологии и экологии данного вида. Значение PIC для *L. perenne* составило 0,323. Среднее значение PIC во всех случаях составляет около 0,3 (0,266), что сопоставимо, например, с оценками, полученными для *Eleusine Gaertn.* [22], и является достаточно высоким значением.

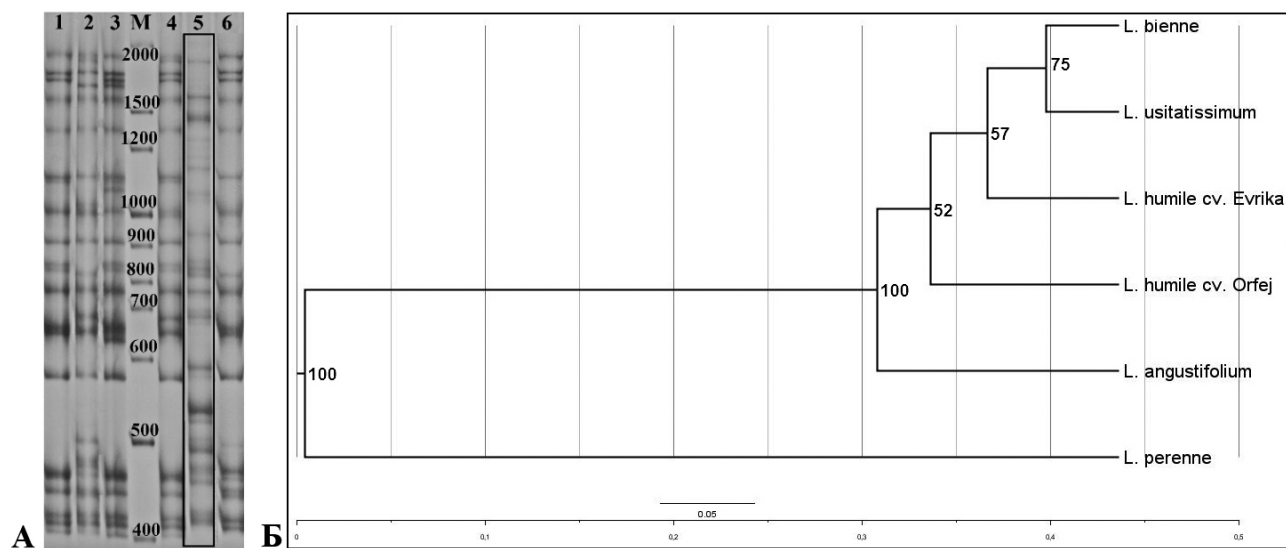


Рис. 1. А – Электрофореграмма с ампликонами интронов генов β -тубулина изученных представителей рода *Linum* L.; м – ДНК-маркер; 1–7 (в верхней части рисунка) – номера образцов: 1 – *L. bienne*; 2 – *L. angustifolium*; 3 – *L. usitatissimum*; 4 – *L. humile* cv. Эврика; 5 – *L. perenne*; 6 – *L. humile* cv. Орфей; Б – UPGMA дендрограмма, основанная на полиморфизме длин интронов генов β -тубулина у исследованных представителей рода *Linum* L.

Коэффициент сходства Нея и Ли колеблется от минимум 0,046 у пары образцов *L. perenne* и *L. bienne* до максимум 0,923 у пары *L. usitatissimum* и *L. bienne*, обладающих наиболее схожим набором ампликонов. Данные фингерпринтинга вовлеченных в анализ образцов использованы для отражения закономерностей генетической дифференциации видов на основе кластерного анализа методом UPGMA (рис. 1Б). Из полученной дендрограммы видно, что все образцы льна отличаются по ТВР профилю.

Анализируемые образцы дифференцируются следующим образом: *L. perenne* и *L. angustifolium* выделяются в отдельные ветви дерева со 100 % бутстреп поддержкой, к ним примыкает *L. humile* cv. Орфей с бутстреп поддержкой 52 %, затем *L. humile* cv. Эврика (57 % поддержка), а *L. bienne* и *L. usitatissimum* образуют одну общую группу (75 % бутстреп поддержка). Таким образом, результаты проведенного исследования, выполненного с использованием

метода ТВР, позволяют однозначно идентифицировать изученные виды рода *Linum*.

Выводы

В результате проведенного анализа установлено, что метод, основанный на оценке длины первого интрона генов β -тубулина, является источником полезной информации для генетической дифференциации растений рода *Linum*. С помощью ТВР-метода можно достаточно четко дифференцировать различные виды льна, характеризующиеся уникальными паттернами ампликонов на электрофореграммах. Показано, что ТВР-метод представляет собой удобную и надежную систему молекулярных маркеров, для которой не требуется предварительной информации о конкретной последовательности интронов генов β -тубулина. Метод может быть применен в молекулярно-филогенетическом анализе видов рода *Linum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jhala A.J., Hall L.M. Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current uses and future applications // Austral. J. Basic Appl. Sci. – 2010. – 4 (9). – P. 4304–4312.
2. Kvavadze E., Bar-Yosef O., Belfer-Cohen A., Boaretto E., Jakeli N., Matskevich Z., Meshveliani T. 30,000-Year-old wild flax fibers // Science. – 2009. – 325 (5946). – 1359 p.
3. Pali V., Kumar S.V., Suchita X., Ravi R.S., Mehta N., Balkrishna S.V. Identification of microsatellite markers for fingerprinting popular Indian flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars and their utilization in seed genetic purity assessments // Austral. J. Crop Sci. – 2014. – 8 (1). – P. 119–126.
4. Allaby R.G., Peterson G.W., Merriwether D.A., Fu Y.B. Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum* L.) from genetic diversity of the sad2 locus // Theor. Appl. Genet. – 2005. – 112 (1). – P. 58–65.
5. Лемеш В.А. Молекулярные маркеры в изучении генетических ресурсов // Мол. и прикл. генетика: Сб. науч. тр. – 2008. – 8. – С. 94–104.
6. Schulman A. H. Molecular markers to assess genetic diversity // Euphytica. – 2007. – 158. – P. 313–321.
7. Рабокoнь А.Н., Пирко Я.В., Демкович А.Е., Блюм Я.Б. Полиморфизм длины интронов генов бета-тубулина как эффективный инструмент генотипирования растений // Мол. и прикл. генетика: сб. науч. тр. – 2015. – 19. – С. 35–44.
8. Bardini M., Lee D., Donini P., Mariani A., Giani S., Toschi M., Lowe C., Breviario D. Tubulin-based polymorphism (TBP): a new tool, based on functionally relevant sequences, to assess genetic diversity in plant species // Genome. – 2004. – 47. – P. 281–291.
9. Nick P. Signaling to the microtubular cytoskeleton in plants // Int. Rev. Cytol. – 1998. – 184. – P. 33–80.
10. Breviario D., Giani S., Ponzoni T., Mastromauro F., Morell L. Plant tubulin intronics // Cell Biol. Int. – 2008. – 32. – P. 571–573.
11. Braglia L., Manca A., Mastromauro F., Breviario D. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs // Diversity. – 2010. – 2. – P. 572–585.
12. McKean P.G., Vaughan S., Gull K. The extended tubulin superfamily // J. Cell Sci. – 2001. – 114. – P. 2723–2733.
13. Пирко Я.В. Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β-тубуліну // Промышленная ботаника. – 2011. – № 11. – С. 152–156.
14. Sambrook J., David W. R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / Cold Spring Harbor. – 2001. – 2. – 763 p.
15. Benbouza H., Jean-Marie J., Jean-Pierre B. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silverstaining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. – 2006. – 10 (2). – P. 77–81.
16. Rahman M.H., Jaquish B., Khasa P.D. Optimization of PCR protocol in microsatellite analysis with silver and SYBR stains // Plant Mol. Biol. Rep. – 2000. – 18. – P. 339–348.
17. Istvan Lazar GelAnalyzer.com [homepage on the Internet]. – 2010. – Режим доступа: <http://www.gelanalyzer.com/>
18. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl. Acad. Sci. – USA, 1979. – 76. – P. 5269–5273.
19. Pavlicek A., Hrdá S., Flegr J. FreeTree Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia* // Folia Biol. (Praha). – 1999. – 45. – P. 97–99.
20. Rambaut A. Tree Figure Drawing Tool Version 1.4.0. // UK: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. – 2012. – Режим доступа: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
21. Hongtrakul V., Huestis G.M., Knapp S.J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines // Theor. Appl. Genet. – 1997. – 95. – P. 400–407.
22. Breviario D., Baird W.V., Sangoi S., Hilu K., Blumetti P., Giani S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined b-tubulin introns // Mol. Breed. – 2007. – 20. – P. 249–259.

RABOKON A.N., DEMKOVYCH A.YE., PIRKO YA.V., BLUME YA.B.

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: nastya-rabokon@rambler.ru

STUDYING OF INTRON LENGTH POLYMORPHISM OF B-TUBULIN GENES IN PLANTS OF GENUS *LINUM* L.

Aim. Fingerprinting with molecular markers allows to carry out precise and rapid species identification. Tubulin-Based-Polymorphism (TBP) was originally introduced as a novel method for assaying genetic diversity in plants. In this connection, testing of this method in genetic research of plants of the genus *Linum* L. is very promising. **Methods.** The CTAB-method for the isolation of DNA, PCR amplification with specific primers, electrophoretic analysis under non-denaturing polyacrylamide gel and staining by silver nitrate method were used. **Results.** Genetic polymorphism of flax species was described on the basis of TBP. It was found that the number of the amplicons that correspond the introns of β-tubulin genes can be varied from 400 bp to 1900 bp. The mean PIC value was about 0.3. **Conclusions.** Obtained data show that the intron length polymorphism method has a good ability to differentiate all studied species of flax. This information may be useful for the further genetic analysis of *Linum* L.

Keywords: molecular markers, β-tubulin, *Linum* L., TBP (tubulin base polymorphism).