

РАБОКОНЬ А.М.^{1✉}, ДЕМКОВИЧ А.Є.¹, ПІРКО Я.В.¹, АНДРЕЄВ І.О.², ПАРНІКОЗА І.Ю.², КОЗЕРЕЦЬКА І.А.³, КУНАХ В.А.², БЛЮМ Я.Б.¹

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: rabokonnastya@gmail.com

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна, 03143, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150,

³ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна, 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 60

✉ rabokonnastya@gmail.com, (050) 214-17-83

ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ β -ТУБУЛІНУ У *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E DESV. З МОРСЬКОЇ АНТАРКТИКИ

Метод фінгерпринтингу на основі молекулярних маркерів надає можливість швидкої ідентифікації видів та внутрішньовидових форм. Метод поліморфізму інтронів генів β -тубуліну (Tubulin-Based Polymorphism, TBP) знайшов своє місце в арсеналі молекулярно-генетичних маркерів як новий метод, який дозволяє проаналізувати генетичну гетерогенність у рослин. Принцип TBP-методу та його різновидів ґрунтується на тому, що послідовності екзонів генів β -тубуліну є досить консервативними у всіх еукаріотичних організмів, а інтрони, як більш варіабельні та менш консервативні ділянки цих генів, слугують джерелом генетичного поліморфізму [1, 2]. Існує декілька модифікацій TBP методу: с-TBP метод, який спирається на дослідження поліморфізму довжини П-го інтрону гена β -тубуліну [3], а також h-TBP, де аналізують поліморфізм ділянки гена, що містить перший і другий інтрони разом з екзоном [4, 5]. Ефективність застосування цих методів для дослідження генетичного поліморфізму було продемонстровано на різних видах, популяціях та генотипах/сортах низки рослин [1, 3–9].

Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* E. Desv.) є одним із двох видів судинних рослин Антарктики. Ареал виду в Антарктиці дуже протяжний у широтному напрямі та складається значною мірою з ізольованих острівних територій, які характеризуються широким спектром умов існування. Все це потенційно може спричиняти появу різноманітних екотипів виду у цьому регіоні. Нещодавно з району Аргентинських островів були описані нові хромосомні форми *D. antarctica* [10], водночас використання AFLP та хлоропластних маркерів показало низьку генетичну гетерогенність виду в

морській Антарктиці [11, 12]. Тому, безперечно, актуальним є подальше дослідження генетичних відмінностей між популяціями, що зростають у різних екологічних умовах, із використанням додаткового інструментарію з арсеналу молекулярних маркерів. У цьому дослідженні ми поставили за мету розробити власні праймери для ампліфікації другого інтрону гена β -тубуліну *D. antarctica* і за допомогою TBP-аналізу та його варіацій дослідити молекулярно-генетичні відмінності між різними популяціями цього виду в Антарктиці.

Матеріали і методи

Для порівняльного аналізу в цій роботі використали рослини *D. antarctica*, які походять із двох географічно віддалених регіонів морської Антарктики, а саме з району Аргентинських островів (о. Галіндез (узвишся Купол), о. Скуа (S22), о. Великий Ялур (Y66), мис Расмуссен (R35), о. Дарбо (DAR12)) та з о. Кінг-Джордж (Південні Шетлендські острови), (два зразки з оазису Поїнт Томас, район польської антарктичної станції «Генрик Арцтовський» та одна проба з півострова Келлера, район бразильської станції «Команданте Ферраз»). Матеріал був зібраний учасниками ІХ (2004/05), ХІ (2006/07), ХІІ (2007/08) та ХV (2010/11) Українських антарктичних експедицій та І.А. Козерецькою під час сезонної роботи на станції «Генрик Арцтовський» (2005/06). ДНК виділяли із свіжої або висушеної листкової тканини за стандартним методом [13].

Дослідження поліморфізму довжин інтронів генів β -тубуліну проводили згідно Bardini et al. [1] із використанням праймерів, послідовності яких були взяті з літературних джерел, а саме:

© РАБОКОНЬ А.М., ДЕМКОВИЧ А.Є., ПІРКО Я.В., АНДРЕЄВ І.О., ПАРНІКОЗА І.Ю., КОЗЕРЕЦЬКА І.А., КУНАХ В.А., БЛЮМ Я.Б.

TBP F1: 5' - AACTGGGCBAARGGNCAУТАУАС-3' та TBP R1: 5'- ACCATRCAYTCRTCDGCRТТУТС -3' – для оцінки поліморфізму I-го інтрону за допомогою базового TBP-методу [1];
 TBP F2: 5'-GARAAYGCHGAYGARTGYATG-3' та TBP R2: 5'-CRAAVCCBACCATGAARAARTG-3' – для оцінки поліморфізму II-го інтрону за допомогою с-TBP-методу [3];
 TBP-F3: 5'-AACTGGGCBAARGGNCAУТАУАС-3' та TBP-R3: 5'-CRAAVCCBACCATGAARAARTG-3' – для оцінки поліморфізму I-го та II-го інтронів за допомогою h-TBP методу [4].

Додатково для оцінки поліморфізму одного з інтронів генів β-тубуліну використали власноруч розроблені праймери з урахуванням інформації, яка міститься у геномних базах даних. Так, на сьогодні в базі даних Gene Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) наявна інформація про послідовність кДНК β-тубуліну *D. antarctica* (HM208297), яка є неповною, оскільки має довжину 917 пар нуклеотидів (п. н.) та кодує лише 304 амінокислотних залишки, в той час як повний поліпептидний ланцюг β-тубуліну складається в середньому з 450 амінокислотних залишків.

Із метою розроблення специфічних праймерів для оцінки поліморфізму хоча б одного з

інтронів генів β-тубуліну *D. antarctica* спочатку за допомогою подвійного вирівнювання у програмі ClustalX 2.0.11 [14] визначили ділянки екзонів, до яких належить кДНК β-тубуліну *D. antarctica* (HM208297). При вирівнюванні як референсні використовували послідовності генів β-тубуліну з бази даних Phytozome v9.1 (www.phytozome.net) різних видів вищих рослин, а саме: *Arabidopsis thaliana* – tubulin beta-1 (P12411_TBB1_ARATH), *Linum usitatissimum* – Lus 100112117 та *Oryza sativa* – Os01g18050, для яких відома екзон-інтронна структура цього гена. В результаті попарного вирівнювання встановлено високий ступінь гомології двох ділянок (довжиною 240 та 677 п. н.) кДНК *D. antarctica* з фрагментами другого та третього екзонів генів β-тубуліну *A. thaliana*, *L. usitatissimum* та *O. sativa*. У подальшому було підібрано пару специфічних с-TBP праймерів для оцінки поліморфізму II-го інтрону генів β-тубуліну *D. antarctica* (Рис. 1). Підібрані послідовності були такими:
 TBPdesch F: 5'-GAGAATGCTGATGAGTGCATG-3'
 та TBPdesch R: 5'-CAAAGCCAACCATGAAGAAATG-3'.

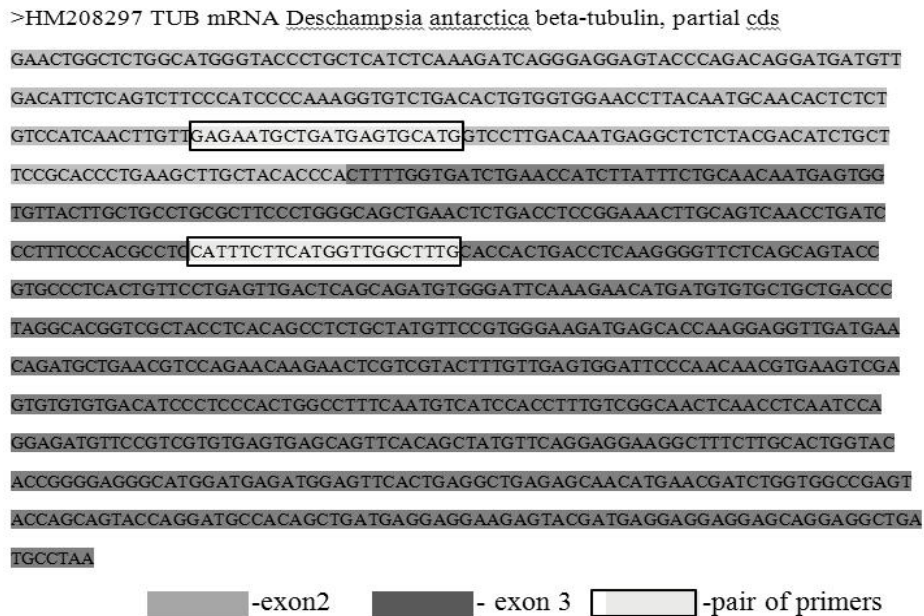


Рис. 1. Послідовність кДНК β-тубуліну *D. antarctica* (HM208297).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для всіх методів аналізу (ТВР, с-ТВР, h-ТВР) здійснювали за допомогою ампліфікатора Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 10 мкл) складалася з: десятикратного буфера для ПЛР, що містить сульфат амонію 200 мМ, 2,5 мМ $MgCl_2$, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 200 мкМ кожного дНТФ, 0,5 од. Taq полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили відповідно до такого протоколу: початкова денатурація (94°C) – 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація 94°C – 30 с, гібридизація праймерів 55°C – 40 с, елонгація 72°C – 1,5 хв), завершальна елонгація 72°C – 8 хв, 15°C – зберігання. Кожну ПЛР проводили як мінімум у дворазовій повторності з використанням негативного контролю, який не містив ДНК.

Продукти ампліфікації (зразок об'ємом 0,5 мкл) розділяли за допомогою електрофорезу в 6 %-ому неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1 x TBE-буфері [15] при 360 В протягом 4 год з подальшим фарбуванням нітратом срібла [16]. Цифрові зображення гелів аналізували з використанням програми GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Розмір фрагментів (смуг) визначали за допомогою ДНК-маркера (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Результати та обговорення

За результатами застосування кожного із методів оцінки поліморфізму інтронів генів β -тубуліну отримано певну кількість фрагментів та різні діапазони варіювання їх довжини. Для ТВР-методу – це 12 чітких та відтворюваних фрагментів у діапазоні від 370 до 1300 п. н.; для h-ТВР – 6 фрагментів довжиною від 1100 до 1700 п. н.; для с-ТВР з використанням вироджених праймерів – 17 фрагментів від 320 до 1750 п. н.; для с-ТВР із специфічними праймерами – 8 фрагментів довжиною 345–1180 п. н. Слід зазначити, що під час аналізу методом с-ТВР як з виродженими, так і з специфічними праймерами, ампліфікується майже однаковий спектр фрагментів (виняток – фрагменти довжиною 700 та 750 п. н., які візуалізуються за умов проведення с-ТВР-аналізу із специфічними праймерами та 4 фрагменти з довжинами 705, 715, 760 та 780 п. н., що проявляються за умов використання вироджених праймерів). Також в обох випадках спостерігаються один чи два чітких

фрагменту, які мають довжину понад 3000 п. н., але нами вони не враховувалися. Цікаво, що кількість отриманих фрагментів при порівнянні результатів, отриманих у ході використання двох варіантів с-ТВР-аналізу (із специфічними та виродженими праймерами), дещо відрізняється. Загалом під час проведення с-ТВР-аналізу із виродженими праймерами утворюється більша кількість фрагментів. Це можна пояснити тим, що специфічність вироджених праймерів менша, отже, і ампліконів може утворюватися більше. В цілому отримані електрофореграми свідчать, що всі застосовані методи аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну (ТВР, с-ТВР, h-ТВР) виявилися не здатними диференціювати жодну з досліджуваних рослин (рис. 2).

Варто зазначити, що висока ефективність та диференційовальні властивості ТВР-методу були продемонстровані низкою досліджень із залученням широкого спектра як різних рослинних видів, так і окремих популяцій і генотипів одного виду [3–9]. Зокрема, цей метод був успішно використаний для генетичної диференціації двох альпійських екотипів щучника дернистого (*D. cespitosa* (L.) P. Beauv.), які суттєво відрізнялися за умовами зростання і мали різні ТВР-профілі [3]. Таким чином, все це дозволяє стверджувати, що ТВР-метод та його модифікації можуть бути ефективно застосовані як ДНК-маркерна система для диференціації різних екотипів щучника. Водночас відсутність поліморфізму інтронів генів β -тубуліну в проаналізованих вибірках *D. antarctica* з двох віддалених майже на 450 км районів морської Антарктики може свідчити про низький рівень генетичного поліморфізму цього виду в дослідженому регіоні. Подібні дані, що вказують на низьке генетичне різноманіття антарктичних популяцій виду, були отримані раніше за допомогою інших типів ПЛР-маркерів [11, 12]. Така ситуація, імовірно, зумовлена історичними особливостями формування антарктичних популяцій *D. antarctica*, які, згідно, з однією з гіпотез, що пояснюють поширення виду в Антарктичному регіоні, зазнали суттєвого скорочення чисельності під час останнього зледеніння або ж зникли зовсім і заселилися повторно, згідно з іншою, а потім, за умови формування сприятливих умов, швидко розповсюдилися усіма придатними для заселення територіями за допомогою птахів, сформувавши популяції, що характеризуються низьким рівнем генетичного різноманіття [17].

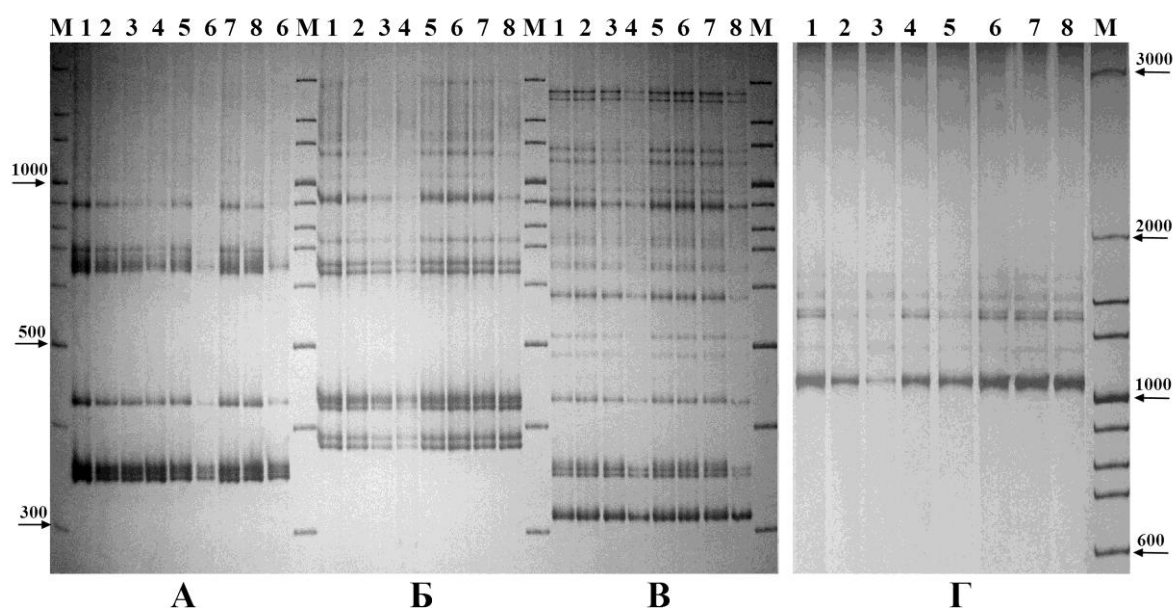


Рис. 2. Електрофоретичні спектри ампліфікованих фрагментів, які містять інтрони генів β -тубуліну рослин *D. antarctica* з острівних популяцій. А – с-ТВР зі специфічними праймерами; Б – ТВР з виродженими праймерами; В – с-ТВР з виродженими праймерами; Г – h-ТВР. Місця збору рослин: 1 – о. Галіндез; 2 – о. Скуа; 3 – о. Ялур; 4 – о. Расмуссен; 5 – о. Дарбо; 6–7 – о. Кінг-Джордж (окол. ст. Арцтовський), 8 – о. Кінг-Джордж, півострів Келлера (околиці ст. Ферраз), М – ДНК-маркер.

Висновки

Наразі не вдалося виявити будь-яких відмінностей між вивченими острівними популяціями *D. antarctica* за довжиною ПЛР-продуктів. Жоден із застосованих варіантів методу аналізу поліморфізму генів тубулінів (ТВР, h-ТВР,

с-ТВР та с-ТВР із специфічними праймерами) не виявив поліморфізму в дослідженій вибірці рослин. Отже, отримані дані свідчать про низький рівень генетичного різноманіття *D. antarctica* з досліджених популяцій двох віддалених регіонів морської Антарктики.

Література

- 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. – V. 47. – P. 281–291.
- Breviario D., Giani S., Ponzoni T., Mastromauro F., Morell L. Plant tubulin intronics // *Cell Biol. Int.* – 2008. – V. 32. – p. 571–573.
- 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. – V. 2. – P. 572–585.
- Breviario D., Baird W.V., Sangoi S., Hilu K., Blumetti P., Giani S. High polymorphism and resolution in targeted fingerprinting with combined β -tubulin introns // *Mol. Breed.* – 2007. – V. 20. – P. 249–259.
- Galasso I., Manca A., Braglia L., Martinelli T., Morello L., Breviario D. h-TBP: an approach based on intron-length polymorphism for the rapid isolation and characterization of the multiple members of the β -tubulin gene family in *Camelina sativa* (L.) Crantz // *Mol. Breeding*. – 2010. – V. 28. – P. 635–645.
- Рабокoнь А.Н., Пірко Я.В., Демкович А.Є., Блюм Я.Б. Поліморфізм довжини інтронів генів бета-тубуліна як ефективний інструмент генотипування рослин // *Мол. и прикл. генетика: Сб. науч. тр. (Минск)*. – 2015. – Т. 19. – С. 35–44.
- Пірко Я.В. Дослідження генетичної мінливості різних видів рослин за допомогою аналізу поліморфізму інтронів генів β -тубуліну // *Промышленная ботаника*. – 2011. – № 11. – С. 152–156.
- Рабокoнь А.М., Демкович А.Є., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Дослідження поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну у сортів *Triticum aestivum* L. та *Hordeum vulgare* L. // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – К.: Логос, 2015. – Т. 17. – С. 82–86.
- Рабокoнь А.М., Демкович А.Є., Пірко Я.В., Блюм Я.Б. Исследование полиморфизма длины интронов генов β -тубулина у растений рода *Linum* L. // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – К.: Логос, 2016. – Т. 19. – С. 43–46.
- Твардовська М.О., Андреев І.О., Амосова А.В., Спіридонова К.В., Навроцька Д.О., Саматадзе Т.Е., Зошук С.А., Муравенко О.В., Кунах В.А. Вивчення геномів рослин *Deschampsia antarctica* E Desv. з різних локалітетів прибережної Ан-

- тарктики за допомогою хромосомних та молекулярних маркерів // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2014. – Т. 14. – С. 133–137.
11. Chwedorzewska K.J., Giełwanowska I., Szczuka E., Bochenek A. High anatomical and low genetic diversity in *Deschampsia antarctica* E Desv. from King George Island, the Antarctic // Pol. Polar Res. – 2008. – V. 29, N 4. – p. 377–386.
 12. van de Wouw M.J., Van Dijk P.J., Huiskes A.H.L. Regional genetic diversity patterns in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.) // Journal of Biogeography. – 2008. – V. 35 (2). – P. 365–376. doi: 10.1111/j.1365-2699.2007.01784.x.
 13. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – V. 19. – P. 11–15.
 14. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics. – 2007. – V. 23. – P. 2947–2948.
 15. Sambrook J., David W.R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual // Cold Spring Harbor. – 2001. – V. 2. – 763 p.
 16. Benbouza H., Jean-Marie J., Jean-Pierre B. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. – 2006. – V. 10, N 2. – P. 77–81.
 17. Parnikoza I., Kozeretska I., Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation // Am. J. Plant Sci. – 2011. – V. 2, N 3. – p. 381–395.

RABOKON A.M.¹, DEMKOVYCH A.Ye.¹, PIRKO Ya.V.¹, ANDREEV I.O.², PARNIKOZA I.Yu.², KOZERETSKA I.A.³, KUNAKH V.A.², BLUME Ya.B.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: nastya-rabokon@rambler.ru

² Institute of Molecular Biology and Genetics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo str., 150

³ National Taras Shevchenko University of Kyiv, Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64

β -TUBULIN GENES-INTRONE LENGTH POLYMORPHISM IN *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E DESV. FROM MARITIME ANTARCTIC

Aim. The use of molecular markers for DNA-Fingerprinting provides an efficient way 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. Antarctic hair grass (*Deschampsia antarctica* E Desv.) is the only representative of the grass family (Poaceae) distributed in Antarctic. Antarctic species range is extended in the longitudinal direction and includes a number of islands with different areas. The aim of this study was to develop primers for amplification of the second intron of *D. antarctica* β -tubulin genes and to investigate molecular genetic differentiation *D. antarctica* populations from two distant regions of maritime Antarctic using TBP-analysis and its variations. **Methods.** *D. antarctica* plants from the Argentine islands and King George Island (South Shetland Islands) were studied. To analyze genetic variation, different methods of tubulin polymorphism analysis were used, such as TBP, c-TBP, and h-TBP. Amplified fragments were fractionated by electrophoresis on non-denaturing polyacrylamide gel and DNA bands were detected using silver staining. **Results.** The size of amplified fragments of β -tubulin genes were ranged from 370 bp to 1300 bp for TBP method, from 1100 bp to 1700 bp for h-TBP, from 320 bp to 1750 bp for c-TBP with degenerate primers, and from 345 bp to 1180 bp for c-TBP with specific primers. No variation was detected in profiles of PCR-products generated with different primers. **Conclusions.** *D. antarctica* from two distant regions of maritime Antarctic demonstrate genetic homogeneity by β -tubulin genes intron length.

Keywords: *Deschampsia antarctica* E Desv., molecular markers, β -tubulin, tubulin based polymorphism.