

НОВОЖИЛОВ Д. О.¹ 
ШУТЬ Т. С.¹ 
РАБОКОНЬ А. М.¹ 
БЛЮМ Р. Я.¹ 
ДЕМКОВИЧ А. Є.¹ 
ПРИВАЛІХІН С. М.¹ 
МИХАЙЛОВА Д. М.² 
ПІРКО Я. В.¹ 
БЛЮМ Я. Б.¹ 

¹ Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Байди-Вишневецького, 2а

² Київський національний університет ім. Т. Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»,
Україна, м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2

✉ novozhylov@gmail.com, yarvp1@gmail.com

ДИЗАЙН ДНК-МАРКЕРІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ ПОЛІМОРФІЗМУ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ α - ТА γ -ТУБУЛІНУ У МАКРОМІЦЕТІВ

Мета. Розробка ДНК-маркерів для визначення поліморфізму довжини інтронів (Intron Length Polymorphism – ILP) генів α - та γ -тубулінів у макроміцетів. **Методи.** Біоінформатичні підходи для пошуку локусів генів, що кодують α - та γ -тубуліни макроміцетів, аналіз екзон-інтронної структури генів, кладистичний аналіз, створення ILP-маркерів, верифікація отриманих праймерів за допомогою *in silico* полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). **Результати.** Проаналізовано екзон-інтронну структуру генів α - та γ -тубулінів макроміцетів. Створено два потенційні маркери для аналізу поліморфізму 1–3 інтронів α -тубулінів у базидіоміцетів, 2–4 інтронів α -тубулінів у аскоміцетів та шість потенційних маркерів для аналізу поліморфізму 1, 2, 3 і 5 інтронів γ -тубулінів базидіоміцетів. **Висновки.** Продемонстровано можливість створення ILP маркерів на основі послідовностей генів α - і γ -тубулінів макроміцетів, що мають високий рівень універсальності. Запропоновано ряд потенційних маркерів, що можуть бути використані у генотипуванні грибів.

Ключові слова: гриби, генотипування, екзон-інтронна структура, α -тубулін, γ -тубулін.

Макроміцети, зокрема базидієві гриби, відіграють значну роль у харчовій промисловості,

є об'єктами штучного культивування та селекції. Ефективне та надійне визначення видової приналежності таких грибів, а також ідентифікація нових цінних штамів для селекції вимагає розроблення спеціалізованих молекулярно-генетичних підходів. ДНК-баркодинг (молекулярне штрихкодування) грибів, особливо їстівних видів, набуває дедалі більшої актуальності для досліджень у сферах систематики, біотехнології та селекції. На сьогодні основним інструментом молекулярного баркодингу грибів залишаються ITS-маркери (Internal Transcribed Spacer). Використання цієї системи зумовлене наявністю універсальних праймерів та значним поліморфізмом довжини й послідовності спейсерної ДНК, розташованої між генами малої (18S) і великої (28S) субодиниць рибосомної РНК, що забезпечує високу варіабельність цих ділянок на міжвидовому і внутрішньовидовому рівнях. Однак, незважаючи на їх універсальність, ITS системи часто мають недостатню роздільну здатність для диференціації таксономічно близьких груп або комерційних штамів грибів. Це зумовлює необхідність у пошуку альтернативних маркерних систем, зокрема на основі висококонсервативних генів цитоскелету (Xu, 2016).



© 2026 Новожилов Д. О., Шуть Т. С., Рабоконт А. М., Блюм Р. Я., Демкович А. Є., Приваліхін С. М., Михайлова Д. М., Пірко Я. В., Блюм Я. Б. This work is licensed under CC BY 4.0. To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Перспективним підходом до генотипування є поліморфізм довжини інтронів генів (ILP, Intron Length Polymorphism), який поєднує використання універсальних праймерів до консервативних екзонів із високою інформативністю варіабельних інтронних ділянок. Попри активне застосування в мікології методу аналізу поліморфізму довжини інтронів β -тубуліну (TBP), роздільної здатності цієї маркерної системи часто недостатньо для точної диференціації (O'Brien et al., 2009. Park, 2012). Крім того, використання TBP-аналізу для баркодування базидіоміцетів ускладнене недостатньою універсальністю маркерів (Novozhylov et al., 2025).

Можливим напрямом розширення можливостей генотипування є залучення інших представників родини тубулінів, а саме α - та γ -тубулінів. Філогенетичні дослідження свідчать, що еволюція α - та β -тубулінів у грибів відбувалася шляхом множинних дуплікацій і втрат, зокрема редукції паралогів $\alpha 2$ у базидіоміцетів і $\beta 2$ у більшості аскоміцетів від вихідного стану предка. Інтенсивний адаптивний позитивний відбір у генах $\alpha 1$, $\alpha 2$ та $\beta 2$, локалізований переважно у функціональних доменах, свідчить про визначальний вплив молекулярної дивергенції на функціональну спеціалізацію тубулінів (Keeling, 2003, Zhao et al., 2014). Ці дані дозволяють припустити, що використання інтронів генів α -тубулінів також є перспективними для генотипування грибів. Разом з тим, гени γ -тубулінів у геномі грибів переважно представлені лише однією ізоформою, можливість їх використання у генотипуванні та роздільна здатність такого підходу залишаються дискусійними і потребують перевірки.

Виходячи з цього, метою даної роботи є оцінка можливості використання генів α - та γ -тубулінів макроміцетів як джерела ILP-маркерів для генотипування грибів і дослідження їхнього генетичного поліморфізму.

Матеріали і методи

Створена вибірка кодуючих послідовностей генів α - і γ -тубулінів макроміцетів. Загалом 76 послідовностей α - і 34 послідовності γ -тубулінів. Проаналізована екзон-інтронна структура цих генів. Усі послідовності були отримані з бази даних NCBI GenBank (Sayers et al., 2021). Побудову дендрограм за алгоритмом Neighbor-Joining виконували у програмному пакеті MEGA 11 (Tamura et al., 2021) на основі попереднього вирівнювання послідовностей за допомогою ClustalX (Larkin et al., 2007). Дані

щодо екзон-інтронної архітектури генів α - і γ -тубулінів отримували на основі існуючих анотацій локусів у базі даних NCBI GenBank та проводили верифікацію шляхом вирівнювання послідовностей CDS на геномну ДНК за допомогою алгоритму Splign (Kapustin et al., 2008) у середовищі програмного пакету NCBI Genome Workbench (Kuznetsov and Bollin, 2021). Дизайн праймерів здійснювали за допомогою вбудованих інструментів програмного пакету AliView (Larsson, 2014). Перевірка специфічності розроблених маркерів здійснювалась шляхом *in silico* полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням програмного пакету FastPCR (Kalendar et al., 2017) та сервісу NCBI PrimerBLAST (Ye et al., 2012).

Результати та обговорення

Відомо, що у аскомікотових грибів α -тубуліни представлені переважно ізотипами $\alpha 1$ і $\alpha 2$, а базидіомікотових – $\alpha 1$ і $\alpha 3$. Цей розподіл чітко видно на дендрограмі, у якій послідовності утворюють три великі клади. У окремій кладі згрупувались $\alpha 3$ -тубліни базидіоміцетів, в іншій кладі – $\alpha 1$ -тубліни базидіоміцетів, у третій – $\alpha 1$ тубуліни аскоміцетів. Базальна клада у лівій частині дерева ймовірно репрезентує $\alpha 2$ тубуліни аскоміцетів (рис 1).

Слід зазначити, що номенклатура генів α -тубулінів, депонованих у базі даних NCBI GenBank не завжди співпадала з їх ізотипом, встановленим у результаті кладистичного аналізу. Такий розподіл також підтверджується патернами екзон-інтронної структури генів. Більшість послідовностей у кладі 1 ($\alpha 3$ -тубліни базидіоміцетів) містить від 8 до 11 інтронів, кладі 2 ($\alpha 1$ -тубліни базидіоміцетів) – від 6 до 8 інтронів, у кладі 3 ($\alpha 1$ тубуліни аскоміцетів) – від 5 до 6 інтронів.

Незважаючи на відмінності в екзон-інтронній структурі, кодуючі послідовності генів α -тубулінів демонструють високий рівень консервативності, що дозволяє створювати відносно універсальні маркери для оцінки поліморфізму довжини інтронів. Зокрема, було запропоновано маркер ILP_tuba1–3, що охоплює 1–3-й інтрони майже усіх базидіоміцетів і кількох представників аскомікотових грибів. Як додатковий маркер, що може бути використаний до ширшого спектру видів грибів, включно з аскоміцетами, запропоновано більш універсальний ILP_tuba2–4 (табл. 1).

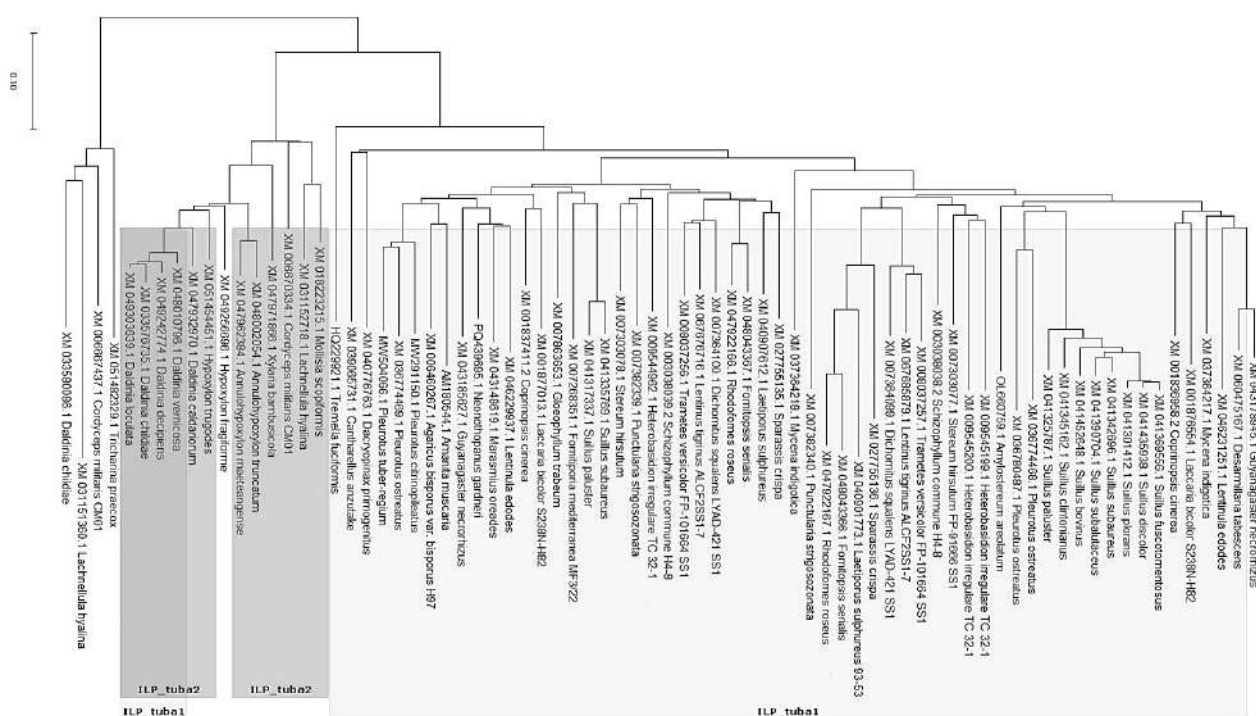


Рис 1. Дендрограма, що відображає подібність кодуючих послідовностей α -тубулінів макроміцетів. Прямокутниками позначені послідовності, для яких створювалися ILP-маркери.

Таблиця 1. Потенційні ILP-маркери та можливі продукти ампліфікації для генів α -тубулінів макроміцетів

Маркер	ILP_tuba1-3 F: CARATHGGNAAYGCNTGYTG R: TCYTTNCCVAYNGTRTARTG	
Вид: амплікон (п. о.)	<i>Stereum hirsutum</i> : 546, 526, <i>Coprinopsis cinerea</i> : 453, 547 <i>Pleurotus ostreatus</i> : 452, 558, 453 <i>Cantharellus anzutake</i> : 622 <i>Laccaria bicolor</i> : 521, 458 <i>Gloeophyllum trabeum</i> : 531 <i>Punctularia strigosozonata</i> : 457, 536 <i>Desarmillaria tabescens</i> : 473 <i>Fomitopsis serialis</i> : 520, 469 <i>Rhodofomes roseus</i> : 520, 474 <i>Lentinula edodes</i> : 531 <i>Guyanagaster necrorrhizus</i> : 532 <i>Suillus clintonianus</i> : 450 <i>Suillus discolor</i> : 449 <i>Suillus bovinus</i> : 447 <i>Suillus subaureus</i> : 446, 537 <i>Suillus subalutaceus</i> : 446 <i>Suillus fuscotomentosus</i> : 447 <i>Suillus plorans</i> : 446	<i>Suillus paluster</i> : 546, 445 <i>Dacryopinax primogenitus</i> : 402 <i>Laetiporus sulphureus</i> : 543, 449 <i>Dichomitus squalens</i> : 541, 472 <i>Fomitiporia mediterranea</i> : 536 <i>Agaricus bisporus</i> : 545 <i>Heterobasidion irregulare</i> : 502, 524, 485 <i>Mycena indigotica</i> : 455, 390, 390 <i>Trametes versicolor</i> : 456, 540 <i>Sparassis crispa</i> (Wulfen) Fr.: 434, 517 <i>Lentinus tigrinus</i> : 541, 466 <i>Schizophyllum commune</i> : 534, 462 <i>Daldinia loculata</i> : 526 <i>Daldinia decipiens</i> : 527 <i>Daldinia vernicosa</i> : 526 <i>Marasmius oreades</i> : 541 <i>Daldinia childiae</i> : 528 <i>Fibroporia radiculosa</i> : 459

Маркер	ILP_tuba2-4 F: GGYCARGCNGGTTGCCARAT R: TCYTTNCCVAYNGTRTARTG	
Вид: амплікон (п. о.)	<i>Cordyceps militaris</i> : 558 <i>Mollisia scopiformis</i> : 541 <i>Hypoxylon trugodes</i> : 539 <i>Daldinia loculata</i> : 541 <i>Daldinia decipiens</i> : 542 <i>Annulohypoxylon truncatum</i> : 558	<i>Xylaria bambusicola</i> : 543 <i>Daldinia vernicosa</i> : 541 <i>Annulohypoxylon maeteangense</i> : 559 <i>Daldinia caldarium</i> : 539 <i>Daldinia childiae</i> : 543

Створена вибірка кодуючих послідовностей генів γ -тубулінів макроміцетів, побудована дендрограма, що відображає ступінь подібності проаналізованих послідовностей (рис. 2) і встановлена екзон-інтронна структура генів. Загалом для базидіомікотових макроміцетів характерна наявність одного гена γ -тубуліну, що має характерну екзон-інтронну структуру (7–10 інтронів). Єдиним винятком є «грибна капуста» *Sparassis crispa* (Wulfen) Fr., яка має додаткову копію γ -тубуліну, що має 5 інтронів.

Аскомікотові макроміцети представлені лише двома відносно поліморфними послідовностями, що не дозволяє наразі робити узагаль-

нення про їх екзон-інтронну структуру. Загалом, кількість депонованих у базі даних послідовностей γ -тубулінів менша, ніж α - і β -тубулінів, проте доволі високий рівень подібності послідовностей базидіомікотових грибів дозволяє запропонувати ряд потенційних ILP маркерів. ILP_tubg1a, ILP_tubg1b – охоплюють перший, ILP_tubg1/2a, ILP_tubg1/2b – охоплюють перший і другий, ILP_tubg3 – третій і ILP_tubg5 – п'ятий інтрони (табл. 2). Для запропонованих маркерів характерна відносно висока універсальність, вони охоплюють майже всі види вибірки.

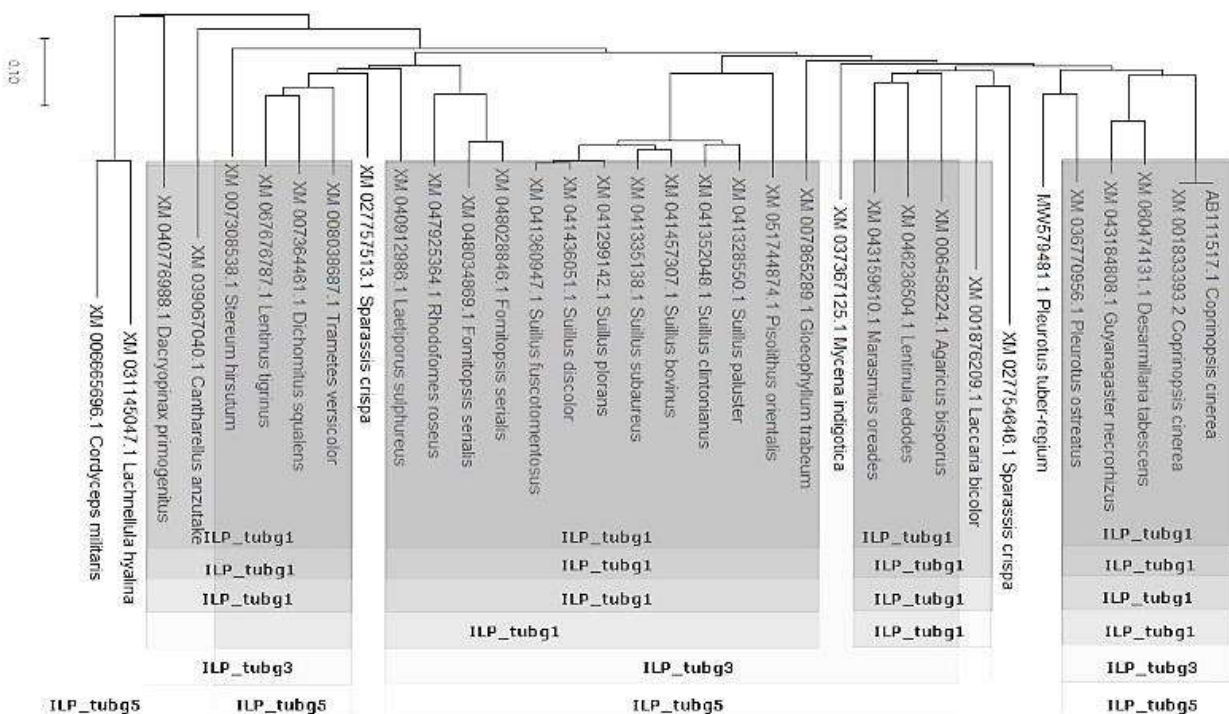


Рис. 2. Дендрограма, що відображає подібність послідовностей вибірки γ -тубулінів макроміцетів. Прямокутниками позначені послідовності, для яких створені ILP-маркери.

Таблиця 2. Потенційні ILP-маркери та можливі продукти ампліфікації для генів γ -тубулінів макроміцетів

Маркер	ILP_tubg1a F: GTNCARCTNGGNCAATGYGG R: GYTGCCARWANACVGMNCCC						ILP_tubg1/2b F: GTNCARCTNGGNCAATGYGG R: GMRTRBCCNTGNGCCCARTT
	ILP_tubg1b F: GTNCARCTNGGNCAATGYGG R: SSYTCNGTNGCCCAHTCYTC						ILP_tubg3 F: AAYAAYTGGGCNCANGGVYA R: TTRTANGGYTGNACNACDAC
	ILP_tubg1/2a F: GTNCARCTNGGNCAATGYGG R: TRBCCNTGNGCCCARTTRTT						ILP_tubg5 F: ATGACNTCNTAYACNCCNTT R: ACNTCNCCYTGDATDATRTT

Вид: амплікони (п. о.)		tubg1a	tubg1b	tubg1/2a	tubg1/2b	tubg3	tubg5
	<i>Agaricus bisporus</i>	102	163	405	408	354	233
	<i>Cantharellus anzutake</i>	103	164	413	416	307	—
	<i>Coprinopsis cinerea</i>	110	171	414	417	307	231
	<i>Cordyceps militaris</i>	—	—	—	—	—	176
	<i>Dacryopinax primogenitus</i>	104	165	407	410	320	—
	<i>Desarmillaria tabescens</i>	99	160	403	406	312	228
	<i>Dichomitus squalens</i>	99	160	411	414	309	229
	<i>Fomitopsis serialis</i>	107	168	418	421	303	226
	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	110	171	420	423	306	228
	<i>Guyanagaster necrorhizus</i>	97	158	399	402	314	226
	<i>Laccaria bicolor</i>	—	163	408	411	309	—
	<i>Laetiporus sulphureus</i>	106	167	423	426	303	234
	<i>Lentinula edodes</i>	97	158	401	404	301	228
	<i>Lentinus tigrinus</i>	102	163	417	420	309	231
	<i>Marasmius oreades</i>	101	162	354	357	310	239
	<i>Mycena indigotica</i>	—	—	—	—	303	219
	<i>Pisolithus orientalis</i>	104	165	421	424	317	234
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	101	162	354	357	303	227
	<i>Rhodofomes roseus</i>	107	168	419	422	307	228
	<i>Sparassis crispa</i>	—	—	—	413	—	—
	<i>Stereum hirsutum</i>	108	169	451	454	795	244
	<i>Suillus bovinus</i>	106	167	412	415	313	232
	<i>Suillus clintonianus</i>	106	167	415	418	313	232
	<i>Suillus discolor</i>	106	167	412	415	313	232
	<i>Suillus fuscotomentosus</i>	105	166	411	414	313	232
	<i>Suillus paluster</i>	105	166	414	417	306	233
	<i>Suillus plorans</i>	105	166	411	414	313	232
	<i>Suillus subaureus</i>	107	168	416	419	313	229
	<i>Trametes versicolor</i>	103	164	415	418	306	225

Висновки

Проведений аналіз послідовностей та екзон-інтронної структури генів α - і γ -тубулінів макроміцетів свідчить про перспективність використання генів α - і γ -тубулінів як можливого джерела ILP-маркерів. Запропоновано маркерні системи для аналізу поліморфізму 1–3 інтронів генів α -тубулінів у базидіоміцетів, 2–4 інтронів генів α -тубулінів у аскоміцетів та ряд потенційних ILP-маркерів для аналізу поліморфізму 1, 2,

3 і 5 інтронів генів γ -тубулінів базидіоміцетів. Розроблені маркери можуть бути використані у комбінації з раніше представленими ILP-маркерами, розробленими на основі послідовностей генів β -тубуліну базидієвих грибів.

Інформація про фінансову підтримку, подяки: відсутня.

Конфлікт інтересів: автор Блюм Я. Б. є членом редакційної колегії збірника наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів». Інші автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Список використаних джерел

1. Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y., Samuilova O., Ivanov K. I. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*. 2017. Vol. 109, No 3–4. P. 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.05.005>.
2. Kapustin Y., Souvorov A., Tatusova T., Lipman D. Splign: algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. *Biology Direct*. 2008. Vol. 3. P. 20. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-20>.
3. Keeling P. J. Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genetics and Biology*. 2003. Vol. 38, No 3. P. 298–309. [https://doi.org/10.1016/s1087-1845\(02\)00537-6](https://doi.org/10.1016/s1087-1845(02)00537-6).
4. Kuznetsov A., Bollin C. J. NCBI Genome Workbench: Desktop Software for Comparative Genomics, Visualization, and GenBank Data Submission. *Methods in Molecular Biology*. 2021. Vol. 2231. P. 261–295. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_16.
5. 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. Vol. 23. P. 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
6. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, No 22. P. 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.
7. Novozhylov D. O., Rabokon A. M., Blume R. Y., Demkovych A. Y., Pryvalikhin S. M., Mykhailova D. M., Pirko Ya. V., Blume Ya. B. Design of ILP markers for β -tubulin genes analysis in basidiomycete fungi. *Factors in experimental evolution of organisms*. 2025. Vol. 36. P. 75–81. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v36.1716>.
8. O'Brien H. E., Miadlikowska J., Lutzoni F. Assessing reproductive isolation in highly diverse communities of the lichen-forming fungal genus *Peltigera*. *Evolution*. 2009. Vol. 63, No 8. P. 2076–2086. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00685.x>.
9. Park Y.-J. Genetic diversity analysis of *Ganoderma* species and development of a specific marker for identification of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *African Journal of Microbiology Research*. 2012. Vol. 6, No 25. P. 5417–5425. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.846>.
10. Sayers E. W., Cavanaugh M., Clark K., Pruitt K. D., Schoch C. L., Sherry S. T., Karsch-Mizrachi I. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2021. Vol. 49 (D1). P. D92–D96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1023>.
11. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021. Vol. 38, No 7. P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
12. Xu J. Fungal DNA barcoding. *Genome*. 2016. Vol. 59, No 11. P. 913–932. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0046>.
13. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012. Vol. 13. P. 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
14. Zhao Z., Liu H., Luo Y., Guan G., He S., Ji J. Molecular evolution and functional divergence of tubulin superfamily in the fungal tree of life. *Scientific Reports*. 2014. Vol. 4. P. 6746. <https://doi.org/10.1038/srep06746>.

NOVOZHYLOV D. O.¹, SHUT T. S.¹, RABOKON A. M.¹, BLUME R. Y.¹, DEMKOVYCH A. Y.¹, PRYVALIKHIN S. M.¹, MYKHAILOVA D. M.², PIRKO Ya. V.¹, BLUME Ya. B.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics, the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Baidy-Vyshnevevetskoho str., 2a

² Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine", Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv, Akademika Hlushkova ave., 2

DESIGN OF DNA MARKERS FOR INTRON LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS OF α - AND γ -TUBULIN GENES IN MACROMYCETES

Aim. Development of markers for determining Intron Length Polymorphism (ILP) of α - and γ -tubulin genes of macromycetes. **Methods.** Use of bioinformatic methods for search of gene loci encoding α - and γ -tubulins in macromycetes, analysis of exon-intron structure of genes, cladistic analysis, design of ILP markers, and verification of the designed primers using *in silico* PCR. **Results.** The exon-intron structure of α - and γ -tubulin genes in macromycetes was analyzed. Potential markers were designed to analyze the polymorphism of introns 1–3 of α -tubulins in Basidiomycetes, introns 2–4 of α -tubulins in Ascomycetes, and a set of six of potential markers for analyzing the polymorphism of introns 1, 2, 3, and 5 of γ -tubulins in Basidiomycetes. **Conclusions.** The feasibility of creating highly universal ILP markers based on α - and γ -tubulin gene sequences in macromycetes has been demonstrated. A series of potential ILP markers suitable for fungal genotyping has been proposed.

Keywords: genotyping, fungi, exon-intron structure, α -tubulin, γ -tubulin.

Надходження статті: 11 квітня 2026 р.

Прийняття до друку після рецензування: 20 травня 2026 р.

Публікація: 30 червня 2026 р.