

ДОДАТОК

ВИБРАНІ ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ

на XIV Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» та VII з'їзді Всеукраїнської асоціації біологів рослин (15–20 вересня 2019 р., м. Київ, Україна)

АНДРЕЄВ І.О.¹, ЩЕНКО О.О.², ВОЛКОВ Р.А.², КУНАХ В.А.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ, Україна, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

² Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, м. Чернівці, Україна, e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ 5S рРНК *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV.

Deschampsia antarctica E. Desv. (Poaceae) одна з двох автохтонних судинних рослин Антарктики. Питання про історію поширення виду в Антарктиці після останнього зледеніння залишається відкритим. Завдяки фрагментованому ареалу *D. antarctica* являє собою унікальну модель для вивчення взаємозв'язку між генетичним поліморфізмом та такими факторами, як ізоляція, міграція та адаптація до нових екологічних умов. Порівняльний аналіз послідовностей генів 5S рРНК успішно застосовують при вивченні молекулярної еволюції і таксономії покритонасінних рослин і, зокрема, злаків. Ми дослідили молекулярну організацію та поліморфізм 5S рДНК у *D. antarctica* з метою оцінки можливості використання цієї ділянки для диференціації популяцій виду.

У результаті клонування та сиквенування 5S рДНК рослин, які представляють три популяції *D. antarctica* з Прибережної Антарктики встановлено, що в геномі цього виду присутні щонайменше три структурні варіанти повторів 5S рДНК, які відрізняються чисельними замінами нуклеотидів та інсерціями/делеціями у міжгенному спейсері. Пошук гомологічних послідовностей в архіві коротких послідовностей геному *D. antarctica*, наявному в БД GenBank, показав, що індивідуальний геном виду містить варіанти рибосомних повторів усіх трьох варіантів. Найчисленнішими у сиквенованому геномі виявилися послідовності варіанту 1А. Шляхом аналізу парних прочитань знайдених гомологічних послідовностей встановлено, що тандемно організовані повторювані послідовності 5S рДНК одного класу граничать виключно з послідовностями того самого класу, хоча в парних прочитаннях можуть зустрічатися різні варіанти повторів одного класу. Це вказує на незалежну еволюцію послідовностей 5S рДНК в межах окремих хромосомних локусів.

Виявлений структурний поліморфізм 5S рДНК дозволяє запропонувати використання цієї ділянки для вивчення внутрішньовидового генетичного різноманіття *D. antarctica*.

ВОРОНОВА Н.В., ЛЕВЫКИНА С.С., МИШУК Е.А., ВЫШИДКЕВИЧ В.В.

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь,
e-mail: nvoronova@bsu.by

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ГЕНОМЫ ТЛЕЙ: ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПАТТЕРНЫ, ОСОБЕННОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Митохондриальные геномы животных довольно консервативны, что позволяет использовать их в качестве ресурса филогенетических маркеров при работе с животными самых разных таксонов. У насекомых митохондриальные геномы имеют более или менее постоянный размер, набор и порядок генов. Тем не менее, высокая консервативность митогеномов не исключает вариативности на уровне

біологічних семейств и выше, что позволяет выявлять особенности эволюции митохондриальных геномов у насекомых, и, в частности, проследить возможные связи между особенностями действующего на таксон отбора и эволюционными паттернами, реализующимися в митохондриальной ДНК.

К настоящему моменту в мире расшифрованы и опубликованы митохондриальные геномы 39 видов тлей, включая 9, расшифрованных в Беларуси. Сравнительный анализ всех опубликованных митогеномов показал, что может быть выявлен ряд полиморфизмов некодирующих областей, имеющих в митогеномах тлей таксономическую приуроченность. С другой стороны, нуклеотидные последовательности белок-кодирующих генов у тлей значительно более консервативны, чем в родственных таксонах. Данный факт не удается объяснить с точки зрения особенностей действующего на таксон отбора или активностью метаболизма, как это обычно делают при оценке скорости эволюции митохондриальной ДНК у животных.

Перестройки порядка расположения генов в мтДНК у тлей выявляются крайне редко и, преимущественно, у представителей *Aphis* L., хотя в других таксонах насекомых геномные перестройки не только выявляются, но имеют филогенетическое значение. У тлей большинство известных митохондриальных геномов имеет типичную предковую структуру, причем такие типы геномов выявляются в разных, в том числе, прогрессивных подсемействах. В митохондриальных геномах тлей могут встречаться дубликации генов тРНК, а также выявлен один случай делеции тРНК у белорусского представителя вида *Therioaphis tenera*. Типичным является наличие изоформ тРНК в митогеномах тлей, большинство из которых способно образовывать типичную структуру клеверного листа.

Особенностью митохондриальных геномов тлей является наличие более или менее длинного некодирующего участка, называемого «great region», поскольку он часто содержит тандемные повторы длиной около 100–150 п.н. У *Th. tenera* этот участок имеет все признаки происхождения от вирусной ДНК, что крайне нетипично для митохондриальных геномов животных.

В целом митогеномы тлей демонстрируют ряд особенностей в сравнении с митохондриальными геномами других *Sternorrhyncha*, в первую очередь, обусловленные их чрезвычайно высокой консервативностью. Происхождение протяженных некодирующих областей в мтДНК тлей до сих пор требует изучения.

КУНАХ В.А.¹, АНДРЕЄВ І.О.¹, ПАРНІКОЗА І.Ю.^{1,2}

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ, Україна,
e-mail: kunakh@imb.org.ua

² Державна установа Національний антарктичний науковий центр, Міністерство освіти і науки України, м. Київ, Україна

ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ РОСЛИНИ-ЕКСТРЕМОФІЛА *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV В ІНСТИТУТІ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАН УКРАЇНИ

Щучник антарктичний, *Deschampsia antarctica* E. Desv. (Poaceae) – автохтонна злакова рослина Антарктики. Завдяки своїй адаптації до суворих умов зростання вона привертає увагу як перспективний об'єкт для дослідження генетичних, біохімічних, молекулярно-біологічних та фізіологічних механізмів стійкості рослин до абіотичних стресів.

Дослідження щучника антарктичного в ІМБГ НАНУ розпочали понад десять років тому у відділі генетики клітинних популяцій. Це спільні роботи, до яких залучені вітчизняні та закордонні організації, зокрема Національний антарктичний науковий центр України, Тернопільський національний педагогічний університет ім. В. Гнатюка, Університет Сілезії в Катовіце, Інститут охорони природи ПАН, Інститут молекулярної біології ім. В.А. Енгельгардта РАН, Інститут харчової біотехнології та геноміки НАНУ, Чернівецький національний університет ім. Ю. Федьковича, Київський національний університет ім. Т. Шевченка, Саратовський державний університет та ін.

Стисло направи цих досліджень наступні. *Біотехнологічний*: розроблено методику отримання асептичних рослин щучника з насіння та їх мікроклонального розмноження, яка здатна забезпечити збереження генетичних та фізіолого-біохімічних характеристик рослин за тривалого культивування *in vitro*; отримано калюсні культури та рослини-регенеранти. Створено колекцію рослин з різних регіонів Антарктики, призначену забезпечити матеріалом різнопланові експерименти. *Фізіолого-біохімічний*: розпочато дослідження стійкості рослин до абіотичних стресів і, зокрема, показано, що вони мають підвищену стійкість до йонів кадмію, УФ, тощо. Проведено біохімічний аналіз вмісту та складу фенольних сполук у тканинах рослин, розпочато дослідження біологічної активності екстрактів, зокрема антипухлинної, противірусної та адаптогенної активності. *Екологічний*: визначено екологічні характеристики популяцій виду в Антарктиці та закладено основи для його використання як індикаторного для моніторингу кліматичних змін. *Генетичний*: проведено молекулярно-цитогенетичний аналіз *D. antarctica* та семи споріднених видів, встановлено особливості їхніх каріотипів та кількість ядерної ДНК. Для *D. antarctica* знайдено нові хромосомні форми, зокрема міксоплоїди, триплоїди та рослини з В-хромосомами. Вивчено особливості ембріонального розвитку порівняно з іншими видами. Проведено аналіз генетичного поліморфізму та встановлено деякі особливості генетичної структури досліджених популяцій у регіоні. Показано, що для виду характерним є порівняно низький рівень генетичного різноманіття та значна диференціація популяцій. Методами біоінформатичного аналізу передбачено існування генів двадцяти транскрипційних факторів родини AP2/ERF, залучених до відповіді на абіотичні стреси. Три з цих генів клоновано та визначено їхню послідовність, розпочато дослідження особливостей їх експресії. Визначено особливості структурної організації генів 5S рРНК, встановлено, що вони представлені в індивідуальному геномі кількома класами повторів, які відрізняються за довжиною та послідовністю нетранскрибованого спейсера.

Отримані результати є важливим внеском у розуміння процесів адаптації рослин до екстремальних умов довкілля.

РЕШЕТНИКОВ В.Н., СПИРИДОВИЧ Е.В.

ГНУ «Центральний ботанический сад НАН Беларуси», г. Минск, Беларусь

БИОСИНТЕЗ АЛКАЛОИДОВ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ЭВОЛЮЦИОННЫЙ ФАКТОР УРОВНЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП РАСТЕНИЙ

Среди вторичных метаболитов растений алкалоиды являются уникальными веществами ввиду сильного физиологического воздействия на животные организмы, и, в большинстве случаев, сложности состава. Характерной особенностью алкалоидов является наличие в их составе NH-группы и ароматических колец. По химической природе отличают алкалоиды с NH-группой внутри ароматических колец (так называемые истинные алкалоиды или эуалкалоиды) и с NH-группой вне этих колец (так называемые протоалкалоиды). Рассматривая систематические группы растительного царства на наличие алкалоидов, можно выделить несколько семейств цветковых растений: бобовые (*Fabiaceae*), пасленовые (*Solanaceae*), маковые (*Papaveraceae*), лютиковые (*Ranunculaceae*), маревые (*Chenopodiaceae*). Широко известными алкалоидами являются морфин, стрихнин, хинин, эфедрин, никотин, колхицин и др. Среди семейств растений алкалоиды распространены неравномерно. Наиболее широко они представлены у покрытосеменных. В водорослях, грибах, мхах, папоротниках и голосеменных растениях алкалоиды встречаются редко.

В растениях – продуцентах алкалоидов чаще всего содержится не один, а несколько алкалоидов (до 70-ти), но обычно преобладают 1–3 их вида. Общее содержание алкалоидов в растении варьирует в пределах 1–3 %.

В Центральном ботаническом саду НАН Беларуси создана коллекция лекарственных растений, в которой представлены виды растений-продуцентов алкалоидов широкого систематического плана. Детальное исследование проводилось с использованием луковичных растений, накапливающих протоалкалоиды, преимущественно бициклические колхициновые соединения.

В настоящее время не до конца выяснена роль алкалоидов для растений, однако есть основания полагать, что их биосинтез, который осуществляется из аминокислот, является следствием совокупности механизмов естественного отбора на малом генетическом уровне согласно теории Т. Добржанского, 1937, когда виды могут расщепляться под действием как внутренних генетических, так и внешних факторов (возможно, защитного характера). Одна из существующих теорий о роли алкалоидов в жизни растений сводится к их защитной функции. Не исключается также мнение, что биосинтез алкалоидов в составе вторичных метаболитов – это «тупиковая» эволюция отдельных таксонов у растительных организмов.

NATALIA BOROWSKA-ZUCHOWSKA¹, ALES KOVARIK², EWA ROBASKIEWICZ¹, ELZBIETA WOLNY¹, ALEXANDER BETEKHTIN¹, ROBERT HASTEROK¹

¹ *University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland*

² *Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic*

EXPLORING THE MECHANISMS OF NUCLEOLAR DOMINANCE – A CLOSER LOOK ON THIS ENIGMATIC PHENOMENON IN ALLOTETRAPLOID *BRACHYPODIUM HYBRIDUM*

Nucleolar dominance (ND) is a phenomenon which takes place in some hybrids and allopolyploids, and consists of selective suppression of the activity of 35S rRNA gene set inherited from one of the progenitors. Considerable attention has been paid to discover the molecular mechanisms which are responsible for a particular state of ribosomal DNA-linked chromatin. Although our understanding of the involvement of different epigenetic landmarks in ND establishment and maintenance has advanced greatly over the last decade, the mechanisms governing which parental rDNA set is chosen for inactivation still remain unclear.

Brachypodium hybridum is a natural allotetraploid (2n=30; BdBdBsBs) with putative ancestral genomes originating from two diploid species, i.e. *B. distachyon* (2n=10; BdBd) and *B. stacei* (2n=20; BsBs). In 2008, we demonstrated preferential silencing of *B. stacei*-inherited ribosomal genes in *B. hybridum*. This presentation outlines our current comparative studies on ND molecular basis in several *B. hybridum* genotypes. The distribution of 35S rDNA loci inherited from both ancestors is shown in mitotic metaphase chromosomes, prophase I meiocytes, microspores, and in different tissues of immature and imbibed embryos. Additionally, we aimed to investigate the epigenetic status of 35 rRNA gene loci in *B. hybridum*. The DNA methylation status and histone immunopatterns (e.g. H3K9me2, H4K5ac, H3K9ac, H3K4me3) of 35S rDNA loci were determined. Moreover, Southern blot hybridisation on genomic DNA of different *B. hybridum* accessions was used to determine the ancestral 35S rDNA contributions.

Financial support from the National Science Centre Poland (grants no. 2012/04/A/NZ3/00572 and 2014/14/M/NZ2/00519) is acknowledged.

BURIACHENKO S.V., STEGNIY B.T.

NSC Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine,

NAAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine,

e-mail: semenb837@gmail.com

IDENTIFICATION OF GENETIC MARKERS OF THE GENETIC VARIABILITY OF AVIAN INFLUENZA A SUBTYPES H1N1 AND H7N9. DETERMINATION OF PRIMERS FOR THE DIAGNOSTIC METHOD (RFLP METHOD)

HA, NA, and NP genes are potential candidates as markers of genetic variability in avian influenza virus in birds, animals, and humans. The purpose of this study was to extract the potential of the HA, NA, and NP genes as markers of the polymorphism of avian influenza A viruses in domestic animals and humans with respect to the subtype H7N9 birds. The study used the MEGA6 and VectorNTI-11 Smith-Waterman

algorithm nucleotide sequences of the hemagglutinin (HA), neurominidase (NA) and nucleoprotein (NP) genes taken from the virus database. A common region at the 3'-end of the segments was used to select the reverse primer sequences for amplifying the HA-NA and NP genes. To select direct primers, multiple alignment of all the HA, NA, and NP gene sequences deposited in the ISD database (www.flu.lanl.gov) was performed. Then consensus sequences were formed for the HA and NA-ta NP genes; found common conservative areas (motifs) and selected sequences of direct primers for the first and second stages of amplification in compliance with the general principles, the choice of primers. The following algorithm was used to select oligonucleotide markers capable of specifically detecting a specific subtype of AIV: all HA, NA and NP sequences in the database were divided into groups according to certain variants of hemagglutinin (H1 and H7), neuraminidase (N1 and N9) and nucleoprotein (NP). The resulting groups were divided into subgroups according to the origin of the virus (isolated from humans, birds, etc.). For each of the 40 resulting, subgroups formed a consensus sequence. Then, the most conservative motifs within, limited by the primers of the second amplification stage, of the genomic segment, were determined. When it was not possible to identify a rather conservative motive, within the subgroup phylogenetic analysis of the sequences was performed with its division into smaller subgroups. Then formed a consensus sequence and conducted a search for conservative areas. A total of 3500 sequences of hemagglutinin, neuraminidase, and AIV nucleoprotein segments were analyzed. Variable structural regions of the nucleotide sequences of genes were determined. In all genes, single nucleotide substitutions are acquired, and the most polymorphic loci are located at the 3' and 5' ends of the sequences. The number of oligonucleotides selected to determine a specific variant of HA, NA and NP depended on the number of identified conservative regions in the amplified region and on the degree of variability within the region. Based on the analysis, primers were selected (2 for each gene of two subtypes) for an isothermal loop amplification reaction of viral genes, a set was constructed consisting of 6 discriminating oligonucleotides for specific analysis of AIV subtypes. The results of the analysis showed that the identification of RNA mutations and the most variable gene loci can be used for the genotyping of influenza A viruses.

LUSINSKA J.¹, MAJKA J.^{1†}, BETEKHTIN A.¹, LOPEZ-ALVAREZ D.², SUSEK K.^{1††}, WOLNY E.¹, HASTEROK R.¹

¹ *University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland,
e-mail: robert.hasterok@us.edu.pl*

² *National University of Columbia, Palmira, Colombia*

[†] *Present address: Department of Environmental Stress Biology, Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland*

^{††} *Present address: Department of Genomics, Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland*

COMPARATIVELY BARCODED CHROMOSOMES OF *BRACHYPODIUM TELL* THE STORY OF THEIR KARYOTYPE STRUCTURE AND EVOLUTION

Recent synteny-based paleogenomic analyses have identified polyploidisation and dysploidy as the prime mechanisms that are responsible for the diversity in plant karyotypes and indicated that nested chromosome fusions (NCF) are crucial for shaping the chromosome structure in grasses. Although it provided insight into the putative numbers of protochromosomes in the monocot progenitors and permitted the karyotypes of some present-day grasses, including *B. distachyon*, to be connected with their hypothetical ancestral karyotypes, these studies did not involve other *Brachypodium* representatives. We present comparative characteristics of various *Brachypodium* karyotypes using multicolour FISH with chromosome-specific probes. In order to gain the detailed insight into the structure and evolution of individual chromosomes at the cytomolecular level, we conducted cross-species FISH mapping with series of BAC clones that were derived from chromosomes Bd1-Bd5 of *B. distachyon* and ordered on its physical map. Using this approach, we demonstrated the presence of NCFs and other chromosome rearrangements, such as Robertsonian rearrangements, translocations and inversions that are responsible for diverse karyotypes structure across the

genus; some of them were strictly genome-specific. This provides new data regarding karyotype evolution in several *Brachypodium* species that have various basic chromosome numbers and different ploidy levels. Good examples are prolonged genome stasis found in *B. hybridum* after the formation of this annual allotetraploid and chromosome dysploidy with diverse genome organisation observed in some perennials, for example *B. pinnatum*, *B. phoenicoides* and *B. mexicanum*. Such cytomolecular studies, in particular when combined with the findings of the ongoing whole genome sequencing projects and further molecular phylogenetic analyses, should contribute to resolving the still enigmatic phylogenetic relations within the *Brachypodium* genus.

Financial support from the National Science Centre Poland (grants no. 2012/04/A/NZ3/00572, 2014/14/M/NZ2/00519 and 2015/18/M/NZ2/00394) is acknowledged.

SKALSKA A.¹, SUSEK K.², TUNA M.³, SAVAŞ TUNA G.⁴, STRITT C.⁵, WYLER M.⁵, ROULIN A.⁵, MUR L.A.J.⁶, HASTEROK R.¹

¹ *University of Silesia in Katowice, Katowice, Poland,*

e-mail: askalska@us.edu.pl

² *Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland*

³ *Namık Kemal University, Tekirdağ, Turkey*

⁴ *Tekirdağ Anatolian High School, Tekirdağ, Turkey*

⁵ *University of Zürich, Switzerland*

⁶ *Institute of Biological, Environmental and Rural Science (IBERS), Aberystwyth University, UK*

GENETIC, EPIGENETIC AND METABOLOMIC DIFFERENTIATION OF TURKISH *BRACHYPODIUM DISTACHYON* ACCESSIONS INTO TWO GEOGRAPHICALLY DISTINCT POPULATIONS

As an annual species, growing on broken ground *Brachypodium distachyon* (Brachypodium), represents an ideal model with which to suggest the molecular drivers of environmental adaptation. We have initiated a project where we are assessing the relative contribution of genomic, epigenetic, transcriptional and metabolomic variation to environmental adaptation. Turkey represents one site of Brachypodium diversification and can be broadly sub-divided into five distinctive climato-environmental regions; representing different rainfalls, temperature ranges, altitudes, and soil types. A new collection of Brachypodium accessions was established by sampling at 12 sites within each of the regions. Seed (T₀) was taken from each accession and grown under uniform controlled environmental conditions at Aberystwyth University. Thus, any variation reflected innate differences arising from environmental adaptation. At six weeks following germination, T₀ leaves were sampled and assessed for genomic (WGS), epigenetic (BS-Seq), transcriptional (RNA-seq) and metabolite (by high resolution Flow-Infusion Electrospray - Mass Spectroscopy; FIE-MS) variation. Phenotypic analyses indicated that the T₀ population could be broadly differentiated into two subpopulation based on seed dimensions, plant height, period of vernalisation, flowering time and drought tolerance. Genome sequencing (10 fold coverage) also indicated that variation in single nucleotide polymorphisms was linked to a north and southern Turkish population; broadly delineated by the Anatolian plateau. Further assessment indicated that epigenetic, transcriptional and metabolomic analyses also aligned with the Northern-Southern split in Brachypodium populations. Examination of the molecular drivers for this split are indicating that; for example, epigenetic-regulatory genes, drought-linked transcriptional regulators, TCA (tricarboxylic acid) and glyoxylate cycles were differentially active in the two populations. We suggest that our data indicated that natural selection through both genetic and epigenetic variation to drive adaptive changes in the transcriptome and metabolome.

Financial support from the National Science Centre Poland (grant no. 2015/18/M/NZ2/00394) is acknowledged.