



НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ  
НАУК УКРАЇНИ»



## Вплив алополіплоїдизації на дивергенцію генів тубуліну у Хрестоцвітих

Звіт за 1-й рік навчання в аспірантурі



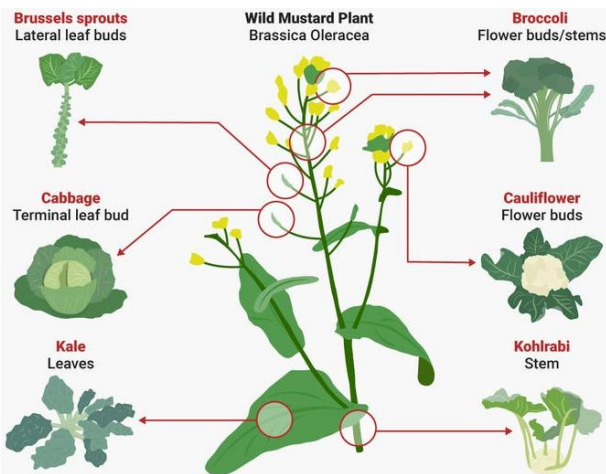
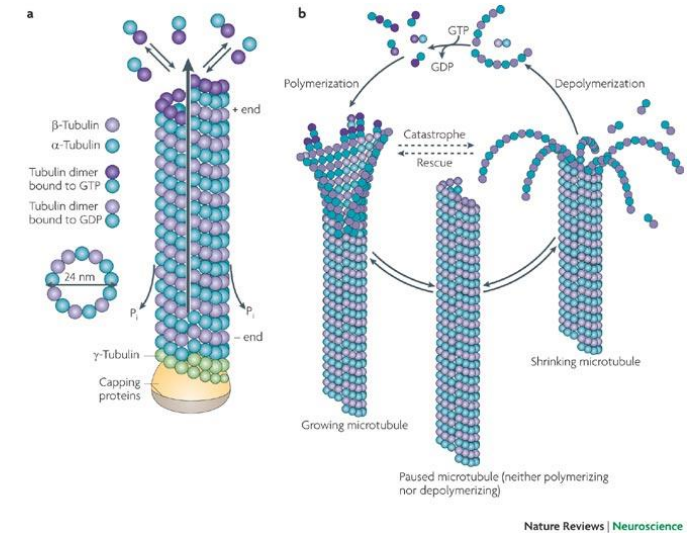
Блюм Ростислав Ярославович  
аспірант 1-го року навчання  
за спеціальністю 091 “Біологія”

Науковий керівник:  
д.б.н., доц., Пірко Ярослав Васильович

м. Київ - 2023

# Актуальність дослідження

- **Тубуліни** є основною складовою мікротрубочок та вважаються одними з найбільш консервативних білків еукаріот.
- У квіткових рослин тубуліни представлені трьома підродинами:  $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$ , з яких понад 80% становлять  $\alpha$ - та  $\beta$ -тубуліни.
- Достеменно невідомо, яку функціональну роль відіграють ті чи інші ізотипи  $\alpha$ - та  $\beta$ -тубулінів.
- У більшості досліджень не було приділено значної уваги визначенню ізотипів ідентифікованих тубулінів та їх ортологів, що унеможливує вивчення еволюційного контексту варіації генів тубулінів копійності у поліплоїдних видів.
- Родина консервативних генів тубулінів може слугувати моделлю для вивчення субфункціоналізації генів у процесі алополіплоїдизації.



- Послідовності інтронів тубулінових генів використовуються для генотипування, а сиквенси генів для реконструкції філогенії різних груп видів.
- Родина Хрестоцвітих включає ряд модельних видів (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica sp.* та ін.), є однією з найбільш досліджених, зокрема наразі є доступними близько 299 збірок геномів, включає ряд економічно важливих видів; а також родина містить значну кількість мезо- та неополіплоїдних організмів, виникли в результаті відносно нещодавніх подій поліплоїдизації, що дозволяє відслідковувати процес субфункціоналізації генів.

## Мета дослідження

Метою запропонованого дослідження є ідентифікація генів  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -тубулінів у геномах поліплоїдних видів *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. napus*, *B. carinata* та *B. juncea*, а також для *C. sativa* та диплоїдних *C. laxa*, *C. neglecta*, *C. hispida* ssp. *grandiflora* та ssp. *hispida*; та вивчення геномної організації та еволюційної історії ідентифікованих генів тубуліну.

## Об'єкт дослідження

Еволюція генів тубулінів у представників родів *Brassica* та *Camelina*

## Предмет дослідження

Ідентифікація генів  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -тубулінів у геномах *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. napus*, *B. carinata*, *B. juncea*, *C. sativa*, *C. laxa*, *C. neglecta*, *C. hispida* ssp. *grandiflora* та ssp. *hispida*, їх філогенетичне положення, синтенія для виявлення еволюції тубулінових генів у алополіплоїдних видів.



*B. oleracea*  
( $2n=18$ , CC)



*B. carinata*  
( $2n=34$ , BBCC)



*B. napus*  
( $2n=38$ , AABB)



*B. nigra*  
( $2n=16$ , BB)



*B. juncea*  
( $2n=36$ , AABB)



*C. laxa*  
( $2n=12$ , LL)



*C. neglecta*  
( $2n=12$ , N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>)



*C. sativa*  
( $2n=40$ , N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>N<sup>7</sup>N<sup>7</sup>H<sup>7</sup>H<sup>7</sup>)



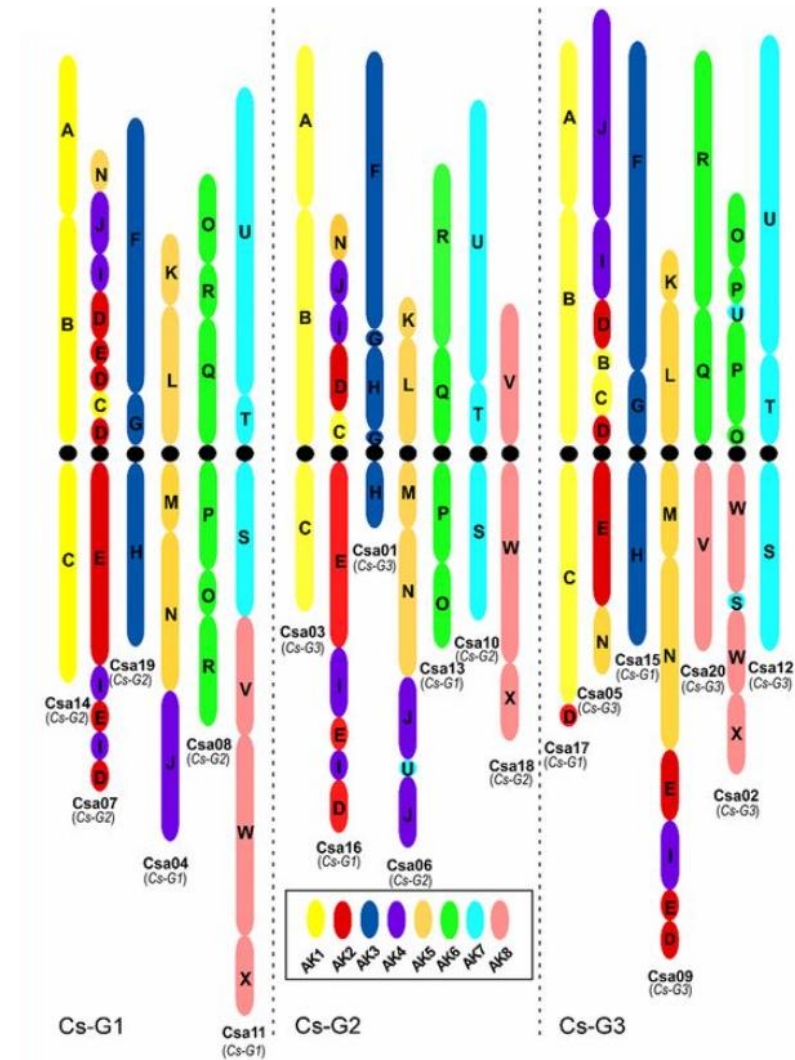
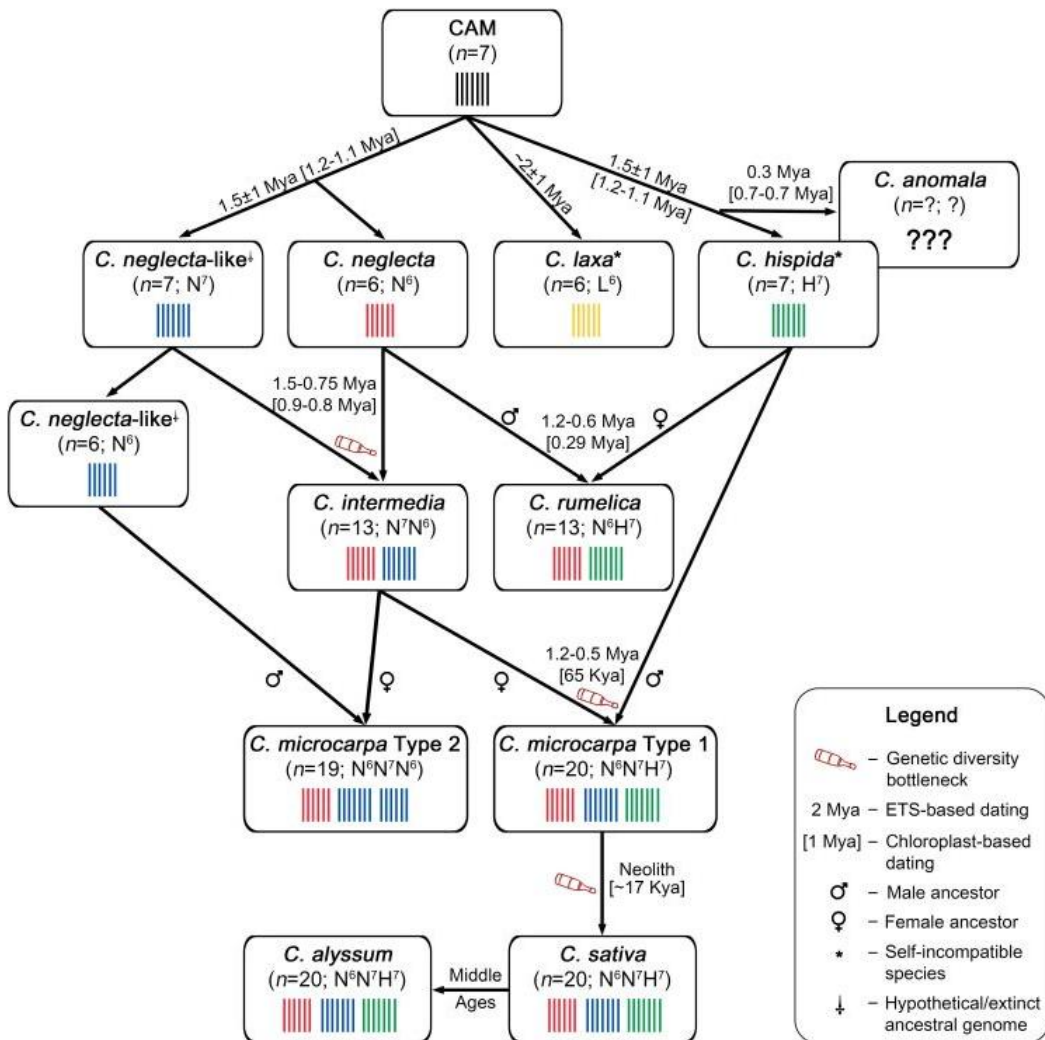
*C. hispida*  
( $2n=14$ , H<sup>7</sup>H<sup>7</sup>)



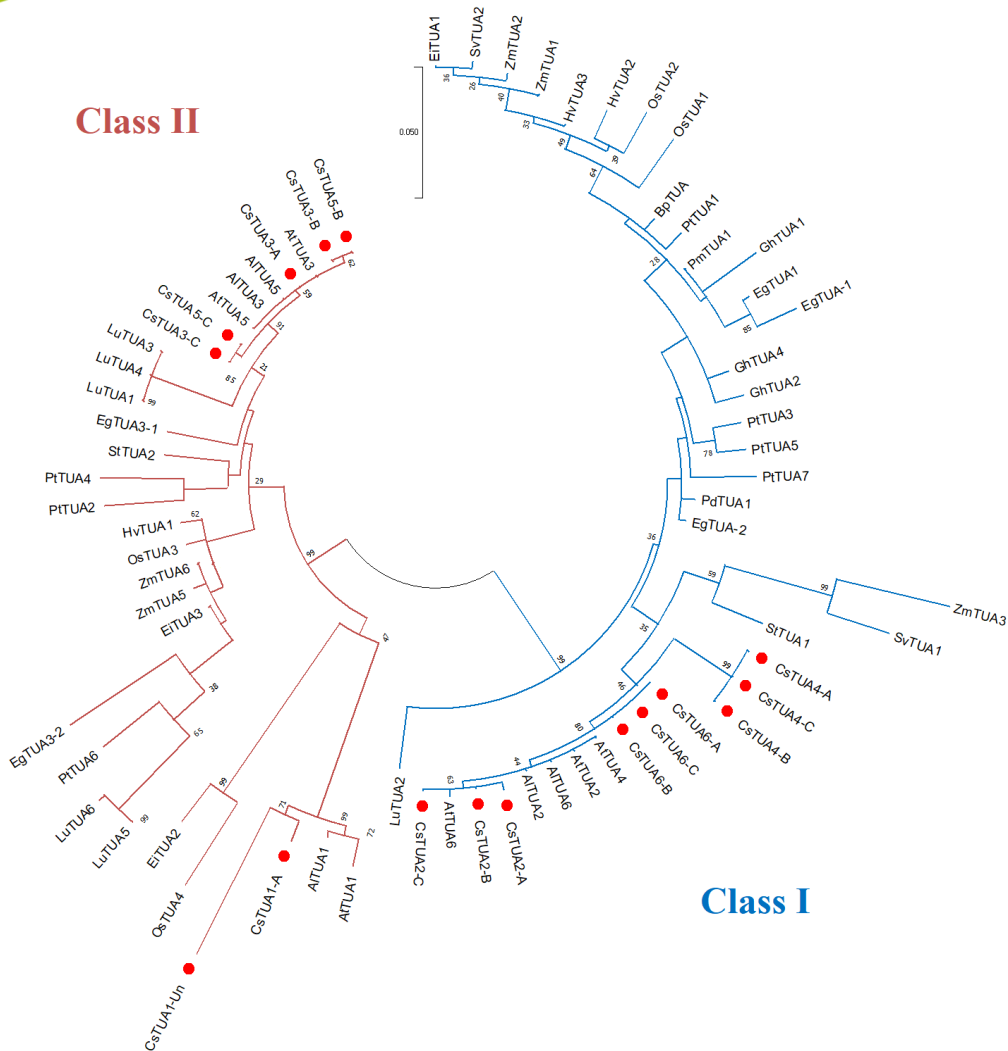
# План роботи на 1-й рік

- Ідентифікувати гени  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -тубулінів у геномах алогексаплоїдного виду *C. sativa* та його диплоїдних родичів *C. laxa*, *C. neglecta*, *C. hispida* ssp. *grandiflora* та ssp. *hispida*;
- Дослідити геномну організацію ідентифікованих генів;
- Встановити їх філогенетичне положення відносно тубулінів інших видів;
- Реконструювати локалізацію ідентифікованих генів на геномних блоках предкового каріотипу Хрестоцвітих в геномах аналізованих видів;
- Проаналізувати синтенію геномів зазначених видів та виявити тип гомологічних зв'язків ідентифікованих генів та прояснити їх еволюційну історію;

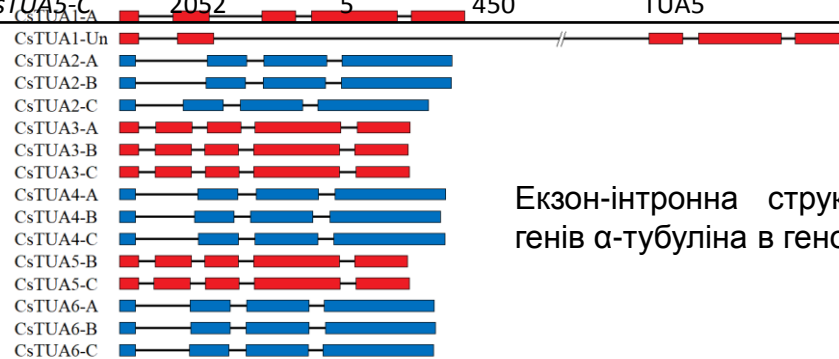
# Походження гексаплоїдного ряду видів *Camelina*



# Ідентифікація генів $\alpha$ -тубуліну



Запропонована назва гену	Довжина гену, п.н.	Екзони	Довжина білку, ак.	Ізотип <i>A. thaliana</i> / <i>A. lyrata</i>	Клас TUA	Chr, підгеном
<i>CsTUA2-A</i>	2266	4	450	TUA2/4/6	I	14, G1
<i>CsTUA2-B</i>	2266	4	450	TUA2/4/6	I	3, G2
<i>CsTUA2-C</i>	2138	4	450	TUA2/4/6	I	17, G3
<i>CsTUA4-A</i>	2219	4	451	TUA2/4/6	I	19, G1
<i>CsTUA4-B</i>	2193	4	451	TUA2/4/6	I	1, G2
<i>CsTUA4-C</i>	2246	4	451	TUA2/4/6	I	15, G3
<i>CsTUA6-A</i>	2267	4	450	TUA2/4/6	I	7, G1
<i>CsTUA6-B</i>	8668	4	450	TUA2/4/6	I	16, G2
<i>CsTUA6-C</i>	2598	4	450	TUA2/4/6	I	9, G3
<i>CsTUA1-A</i>	2319	5	450	TUA1	II	7, G1
<i>CsTUA1-Un</i>	5961	5	444	TUA1	II	Scaff00574
<i>CsTUA3-A</i>	2150	5	450	TUA3	II	8, G1
<i>CsTUA3-B</i>	2041	5	450	TUA3	II	13, G2
<i>CsTUA3-C</i>	2079	5	450	TUA3	II	20, G3
<i>CsTUA5p-A</i>	840	2	--	TUA5	II	8, G1
<i>CsTUA5-B</i>	2114	5	450	TUA5	II	13, G2
<i>CsTUA5-C</i>	2052	5	450	TUA5	II	20, G3



Екзон-інтронна структура ідентифікованих генів  $\alpha$ -тубуліна в геномі *C. sativa*.

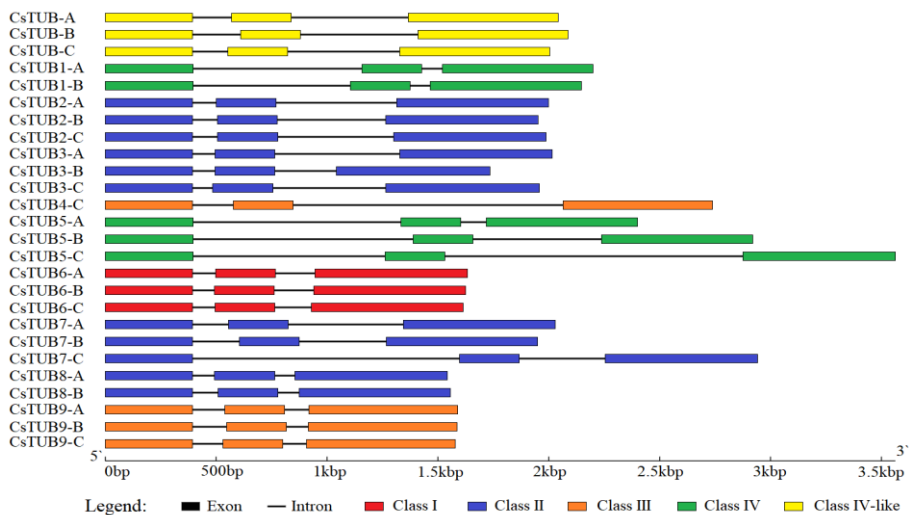
Філогенетичне дерево (ML) 70 послідовностей білків  $\alpha$ -тубуліну 16 видів, включаючи 16 трансльованих пептидів генів *C. sativa*.

Legend: Exon Intron Class I Class II

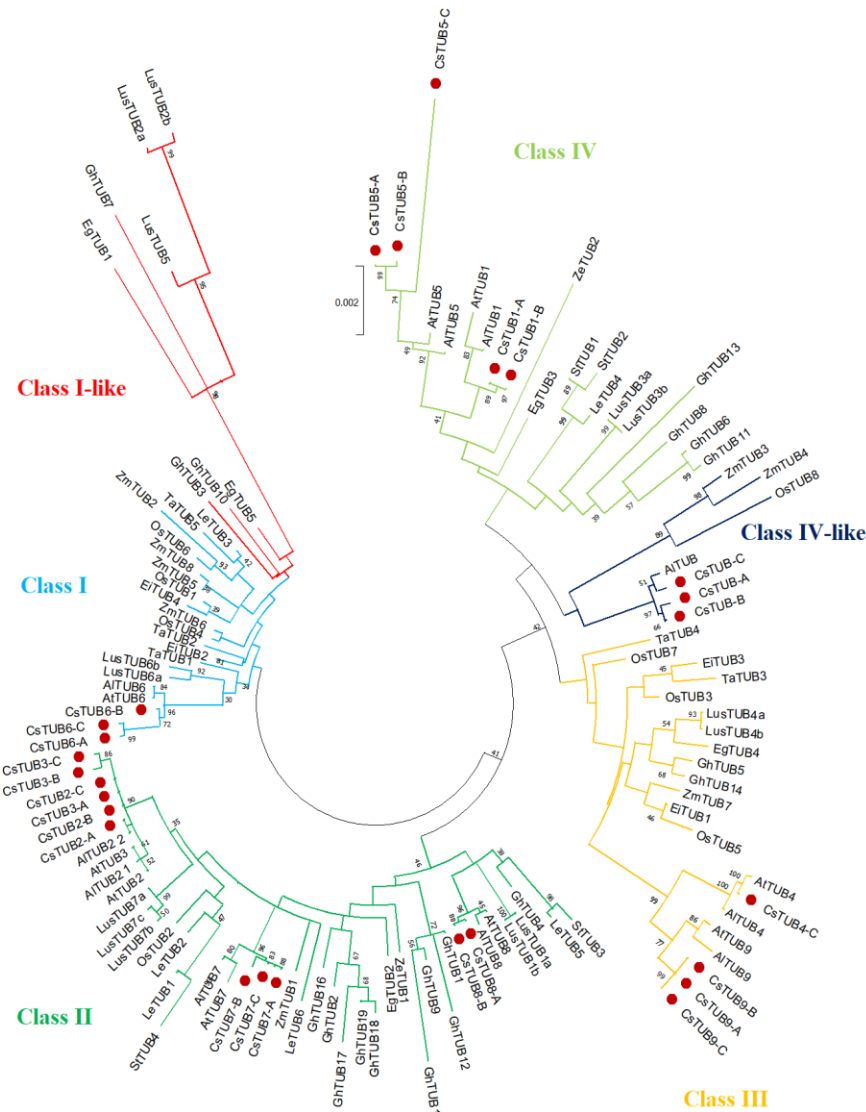
# Ідентифікація генів β-тубуліну

Ідентифіковані псевдогени β-тубуліну

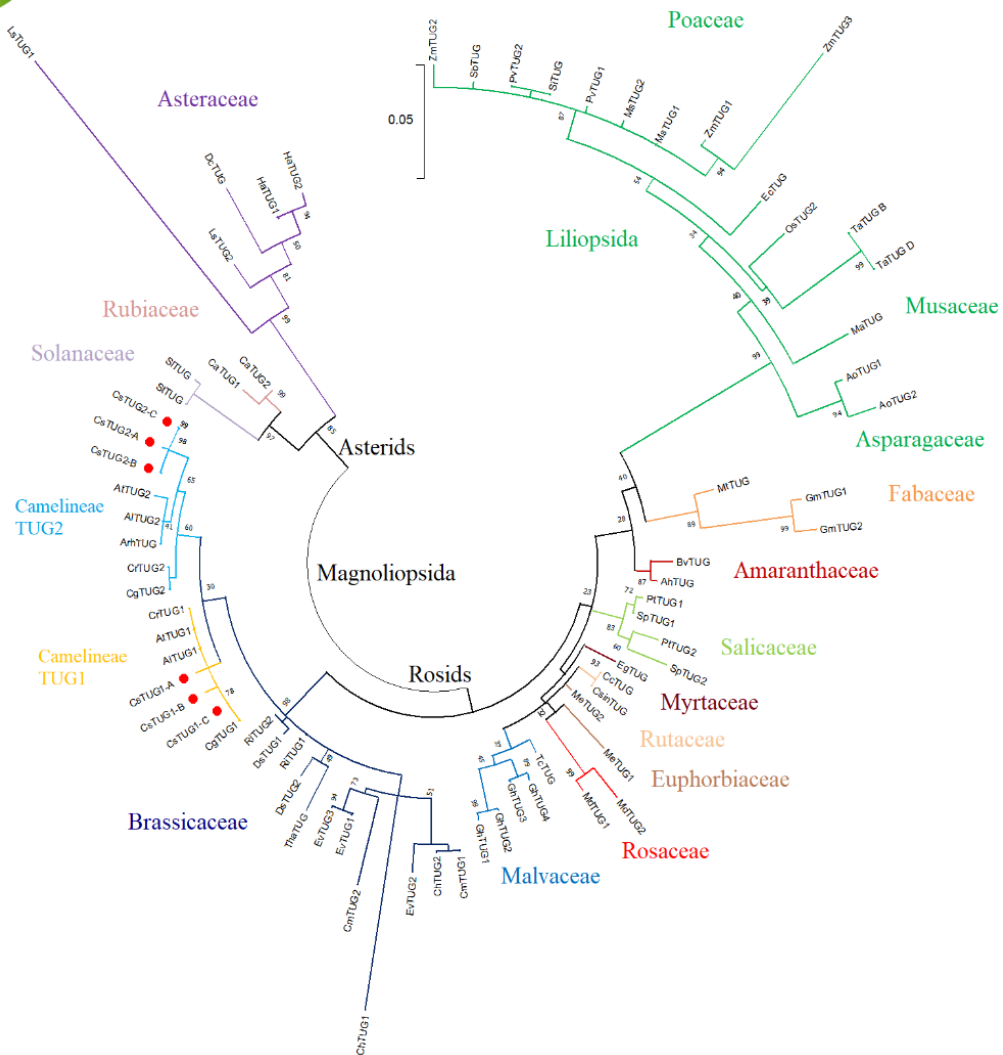
Запропонована назва гену	Довжина гену, п.н..	Екзони	Довжина булку, ак.	Chr та підгеном
<i>CsTUB3p-C</i>	1759	4	308	2, G3
<i>CsTUB8p-C</i>	1444	3	353	20, G3
<i>CsTUB4p-A</i>	1929	(3)	-	11, G1
<i>CsTUB4p-B</i>	1645	3	379	18, G2
<i>CsTUB4p-C</i>	1777-1817	3-4	144	12, G3
<i>CsTUB9p-A</i>	852	4	213	11, G1
<i>CsTUB9p-B</i>	544	1	132	10, G2
<i>CsTUB1p-C</i>	3364	4	407	17, G3



Екзон-інтронна структура ідентифікованих генів β-тубуліну в геномі *C. sativa*.

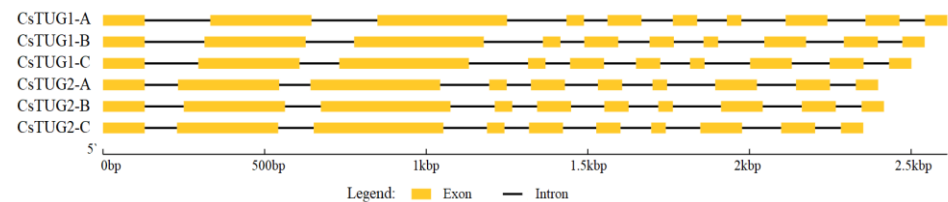


Філогенетичне дерево (ML) 122 послідовностей білків β-тубуліну 13 видів, включаючи 26 трансльованих пептидів генів *C. sativa*.

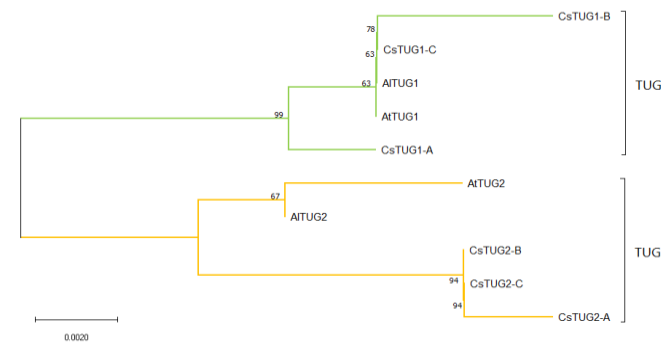


Філогенетичне дерево (ML) 73 послідовностей білка γ-тубуліну з 41 виду, включаючи 6 трансльованих пептидів генів *C. sativa*. Дерево було побудовано за допомогою бутстреп-підтримки в 1000 повторів.

Запропонован а назва гену	Довжин а гену, п.н.	Екзон и	Передбачув ана довжина білку, а.к.	<i>A. thaliana</i> / <i>A. lyrata</i> ізотип	Chr, підгеном
<i>CsTUG1-A</i>	3344	10	474	TUG1	7, G1
<i>CsTUG1-B</i>	3194	10	474	TUG1	16, G2
<i>CsTUG1-C</i>	3135	10	474	TUG1	5, G3
<i>CsTUG2-A</i>	2813	10	474	TUG2	8, G1
<i>CsTUG2-B</i>	2835	10	474	TUG2	13, G2
<i>CsTUG2-C</i>	2737	10	474	TUG2	20, G3



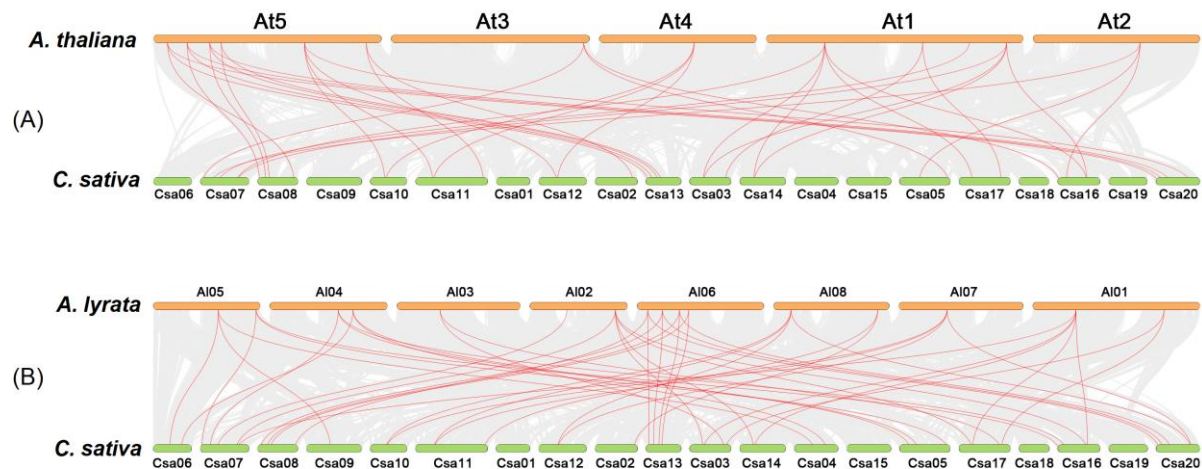
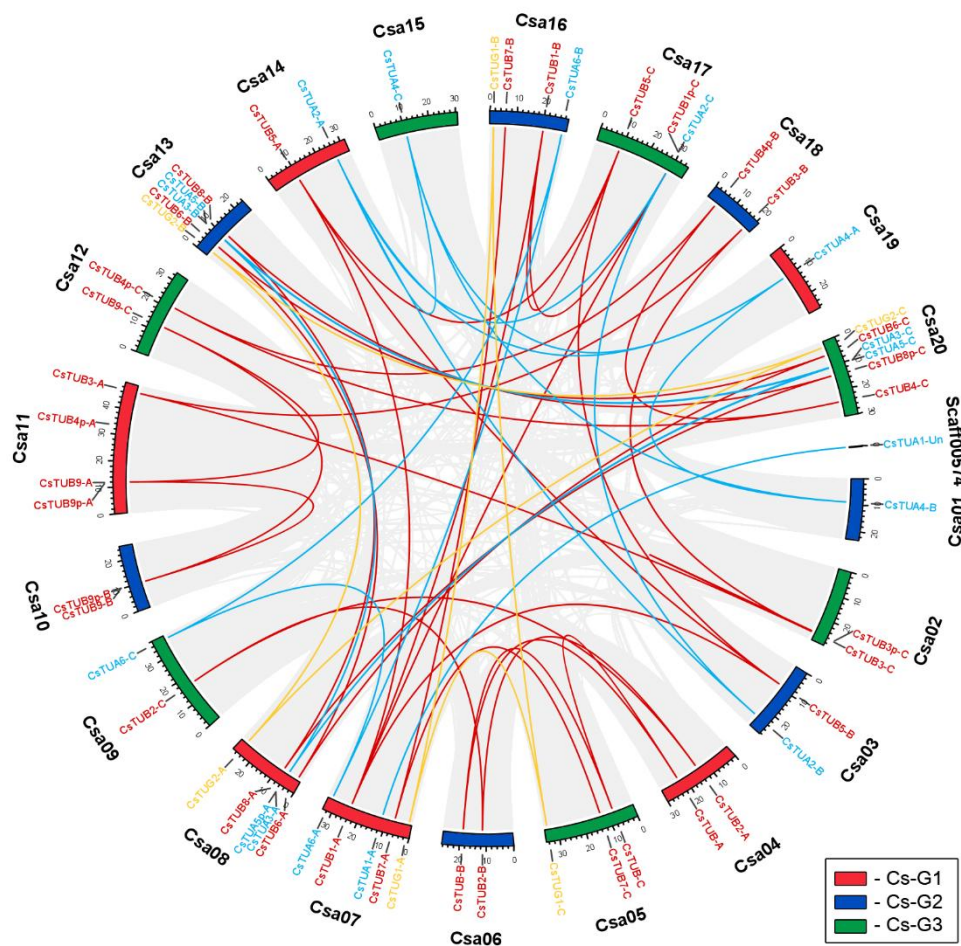
Екзон-інтронна структура генів γ-тубуліну в геномі *C. sativa*.



Філогенетичне дерево (NJ) білкових послідовностей TUG *A. thaliana*, *A. lyrata* та *C. sativa* з бутстреп-підтримкою в 1000 повторів.



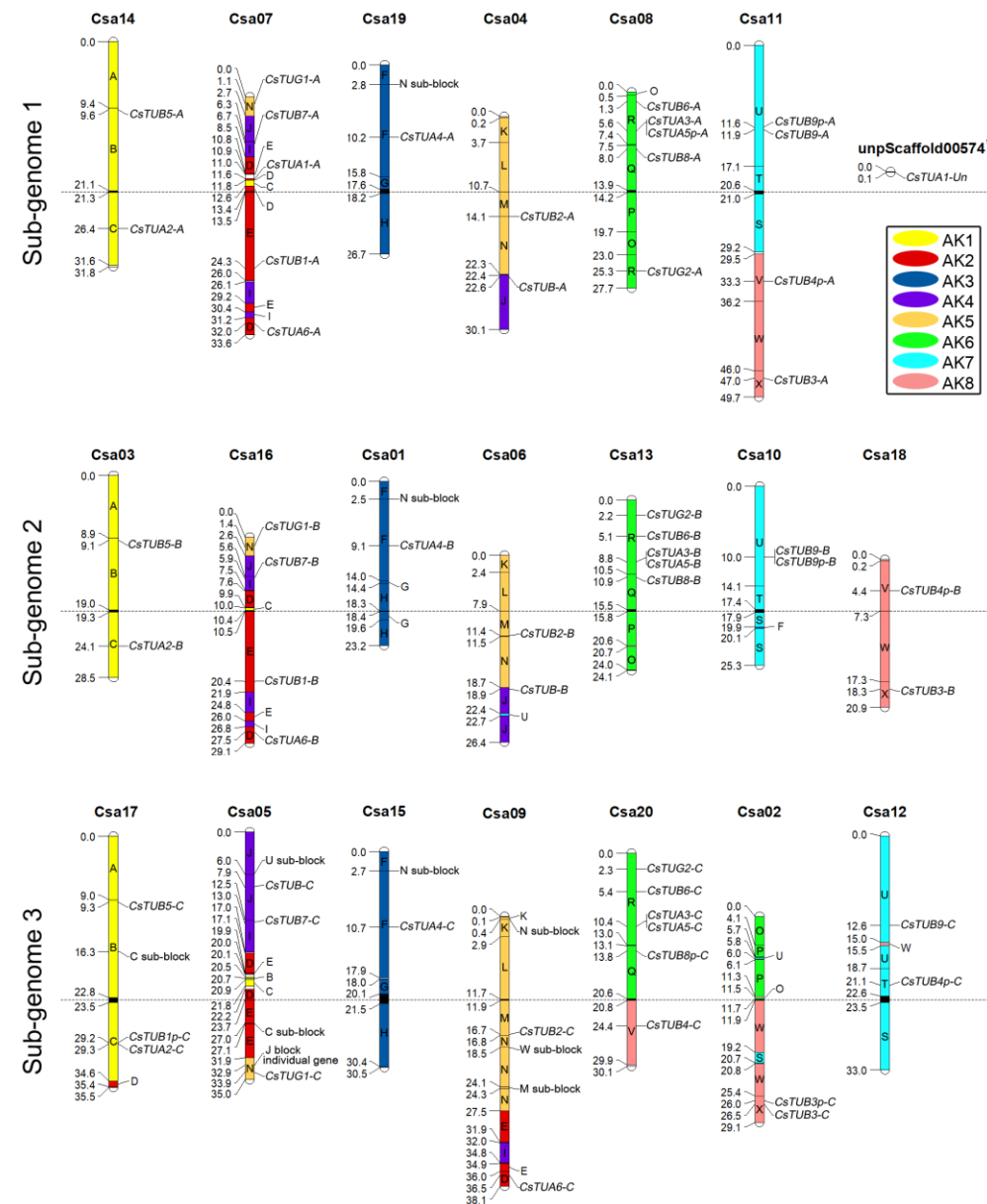
# Аналіз синтенії генів тубуліну



Синтенія генів тубуліну між геномами:  
 (A) *A. thaliana* та *C. sativa* та  
 (B) *A. lyrata* та *C. sativa*

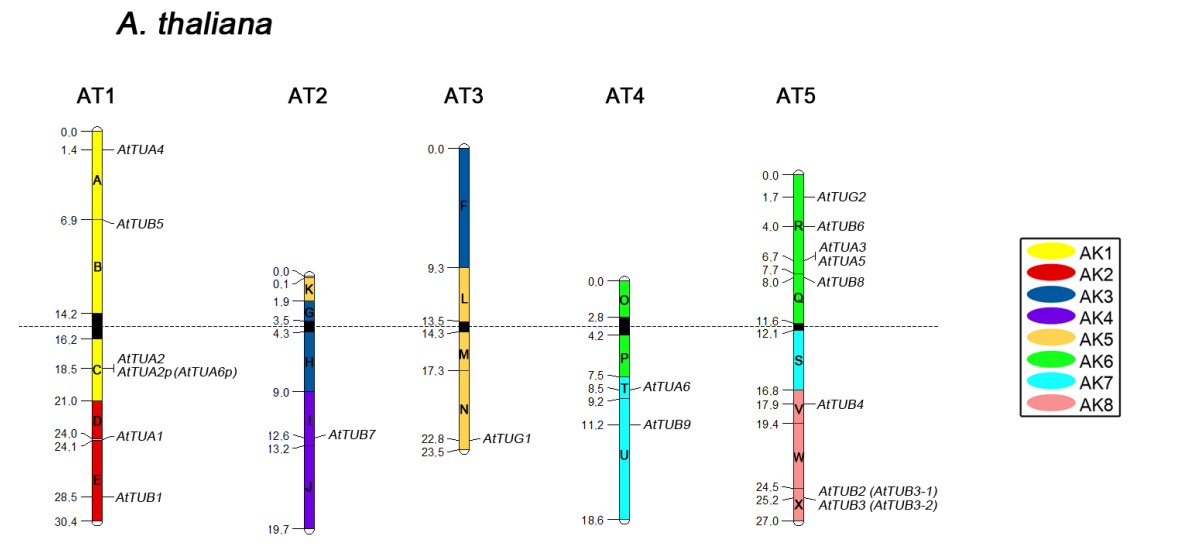
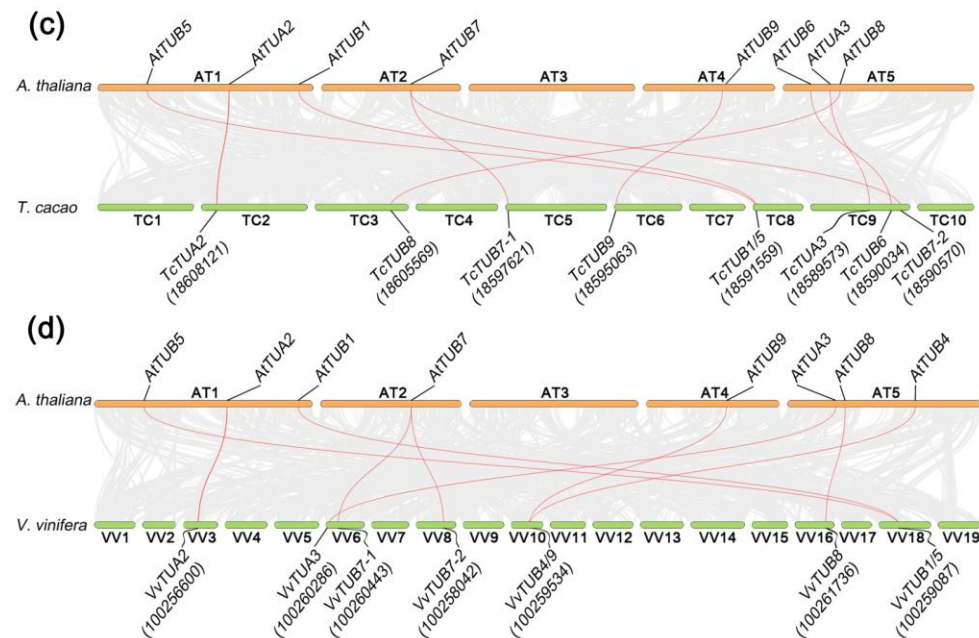
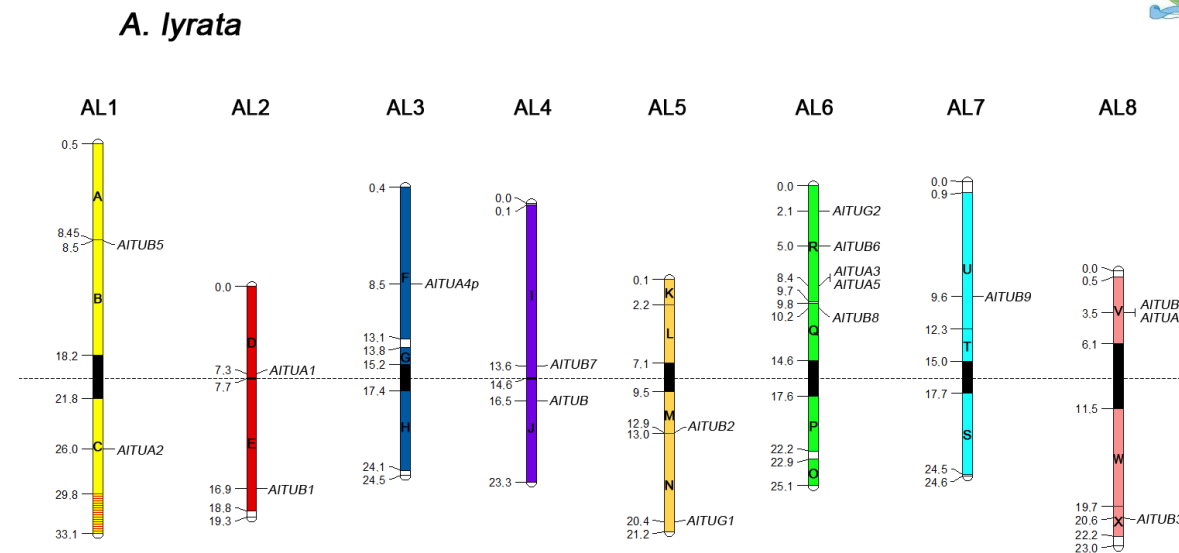
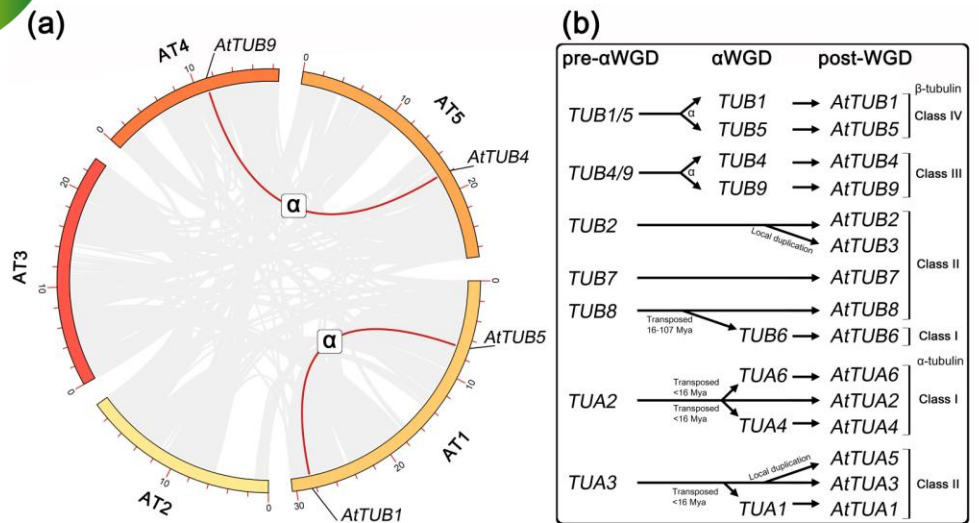
Діаграма Circos, що представляє колінеарність генів тубуліну в аллогексаплоїдному геномі *C. sativa*

Підродина	Геномний блок АСК	A (N <sup>6</sup> ) субгеном	B (N <sup>7</sup> ) субгеном	C (N <sup>7</sup> ) підгеном
<b>α-тубуліни</b>	D	<i>CsTUA1-A</i>	— *	— *
	C	<i>CsTUA2-A</i>	<i>CsTUA2-B</i>	<i>CsTUA2-C</i>
	R	<i>CsTUA3-A</i>	<i>CsTUA3-B</i>	<i>CsTUA3-C</i>
	F	<i>CsTUA4-A</i>	<i>CsTUA4-B</i>	<i>CsTUA4-C</i>
	R	<i>CsTUA5p-A</i>	<i>CsTUA5-B</i>	<i>CsTUA5-C</i>
<b>β-тубуліни</b>	D	<i>CsTUA6-A</i>	<i>CsTUA6-B</i>	<i>CsTUA6-C</i>
	E	<i>CsTUB1-A</i>	<i>CsTUB1-B</i>	— **
	C	—	—	<i>CsTUB1p-C</i> **
	M	<i>CsTUB2-A</i>	<i>CsTUB2-B</i>	<i>CsTUB2-C</i>
	X	<i>CsTUB3-A</i>	<i>CsTUB3-B</i>	<i>CsTUB3-C</i>
	X			<i>CsTUB3p-C</i> ***
	V	<i>CsTUB4p-A</i>	<i>CsTUB4p-B</i>	<i>CsTUB4-C</i>
	T	—	—	<i>CsTUB4p-C</i>
	B	<i>CsTUB5-A</i>	<i>CsTUB5-B</i>	<i>CsTUB5-C</i>
	R	<i>CsTUB6-A</i>	<i>CsTUB6-B</i>	<i>CsTUB6-C</i>
<b>γ-тубуліни</b>	I	<i>CsTUB7-A</i>	<i>CsTUB7-B</i>	<i>CsTUB7-C</i>
	Q	<i>CsTUB8-A</i>	<i>CsTUB8-B</i>	<i>CsTUB8p-C</i>
	U	<i>CsTUB9-A</i>	<i>CsTUB9-B</i>	<i>CsTUB9-C</i>
	U	<i>CsTUB9p-A</i> ****	<i>CsTUB9p-B</i> ****	—
	J	<i>CsTUB-A</i>	<i>CsTUB-B</i>	<i>CsTUB-C</i>
	N	<i>CsTUG1-A</i>	<i>CsTUG1-B</i>	<i>CsTUG1-C</i>
	R	<i>CsTUG2-A</i>	<i>CsTUG2-B</i>	<i>CsTUG2-C</i>

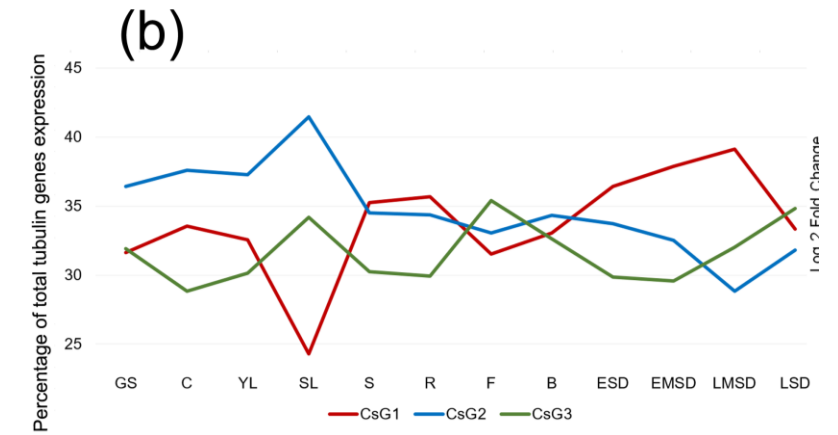
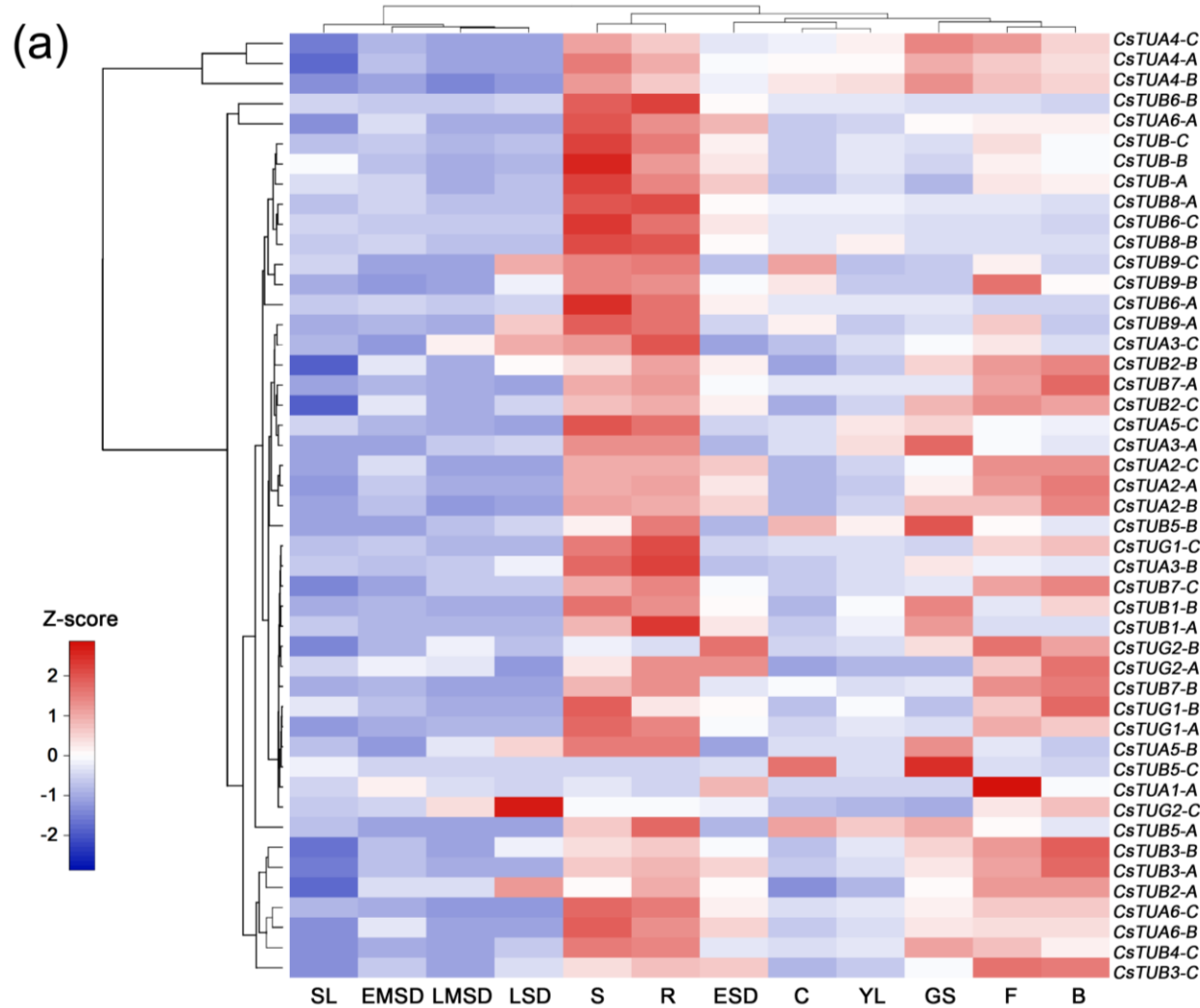


\* - можливо, це міг бути *CsTUA1-Un* або інший третій гомеолог, якщо такий існує;  
 \*\* - вихідний ген, швидше за все, транслокувався (при руйнуванні блоків АСК1 та АСК2), що супроводжувалося псевдогенізацією та виникненням *CsTUB1p-C*;  
 \*\*\* - віддалений паралог *CsTUB3-C*, можливо, тандемний дублікат;  
 \*\*\*\* - кожен із цих генів є давнім паралогом *CsTUB9-A* або *CsTUB9-B*, між собою зазначені гени гомеологічні.

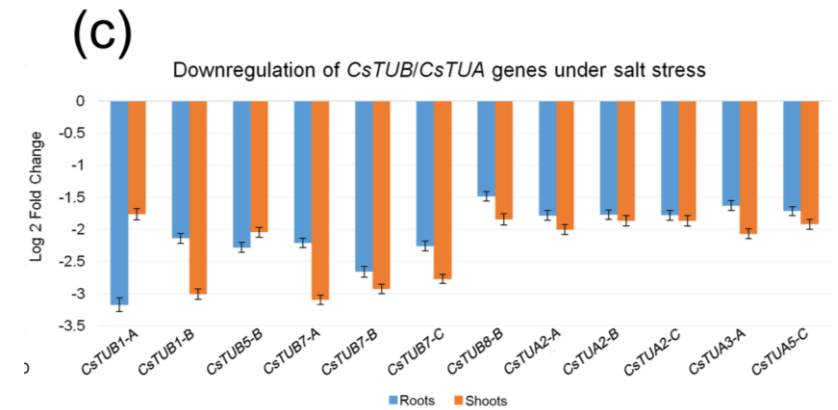
# Реконструкція еволюції тубулінів у *A. thaliana*



# Експресія генів тубуліну у *C. sativa*



Вклад підгеномів *C. sativa* у сумарну експресію тубулінів



## Ідентифіковані гени β-тубуліну у геномі *C. laxa*

## Ідентифіковані гени γ-тубуліну у геномах диких видів *Camelina*

Назва гена	ID хромосоми	Геномні координати	Довжина	Розмір	Ізотип
			гена (п.н.)	пептиду (а.з.)	
<i>CnTUG1</i>	CM043456.1	1,073,671..1,076,257	2587	474	TUG1
<i>CnTUG2</i>	CM043460.1	1,998,555..2,000,961	2407	474	TUG2
<i>CITUG1</i>	CM043883.1	30,400,860..30,403,422	2563	474	TUG1
<i>CITUG2</i>	CM043881.1	1,971,649..1,973,993	2345	474	TUG2
<i>ChvgTUG1-1</i>	CM043450.1	42,322,655..42,325,059	2405	474	TUG1
<i>ChvgTUG1-2</i>	CM043450.2	42,473,649..42,476,115	2467	474	TUG1
<i>ChvgTUG2</i>	CM043453.1	2,256,433..2,258,756	2324	474	TUG2
<i>ChvhTUG1-1</i>	CP094634.1	42,322,655..42,325,059	2443	474	TUG1
<i>ChvhTUG1-2</i>	CP094634.1	42,473,649..42,476,115	2505	474	TUG1
<i>ChvhTUG2</i>	CP094637.1	2,256,433..2,258,756	2343	474	TUG2

## Ідентифіковані гени α-тубуліну у геномах *C. neglecta* та *C. laxa*

Назва гена	ID хромосоми	Геномні координати	Довжина	Клас
			гена (п.н.)	
<i>CnTUA1</i>	CM043456.1	12,766,171..12,768,216	2045	II
<i>CnTUA3</i>	CM043460.1	8,661,640..8,663,146	1506	II
<i>CnTUA5</i>	CM043460.1	8,666,835..8,668,552	1717	II
<i>CnTUA2</i>	CM043455.1	25,646,663..25,648,636	1973	I
<i>CnTUA4</i>	CM043457.1	9,301,264..9,303,203	1939	I
<i>CnTUA6</i>	CM043456.1	31,367,289..31,369,129	1840	I
<i>CITUA3</i>	CM043881.1	8,105,807..8,107,530	1723	II
<i>CITUA5</i>	CM043881.1	8,110,875..8,112,589	1714	II
<i>CITUA2/4/6-1</i>	CM043883.1	1,421,015..1,422,827	1812	I
<i>CITUA4</i>	CM043884.1	4,743,129..4,745,086	1957	I
<i>CITUA6/4/2-2</i>	CM043885.1	4,637,940..4,639,853	1913	I

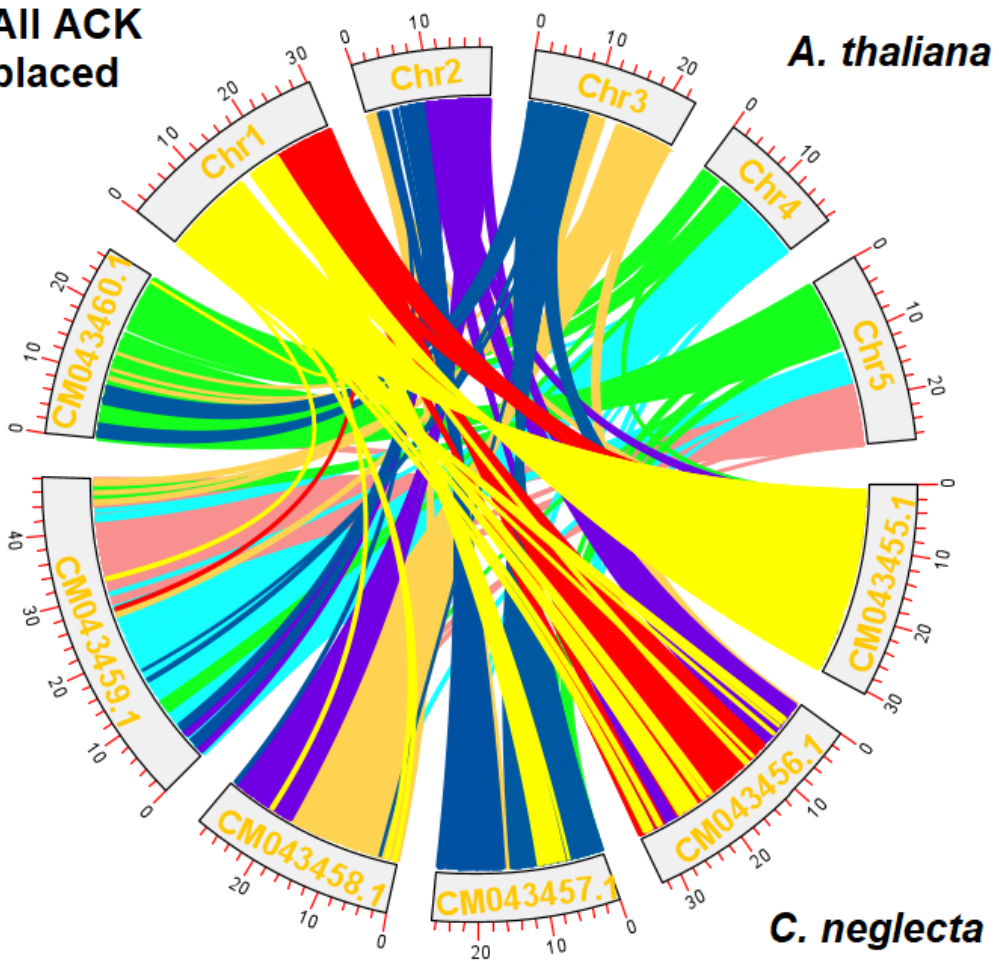
Назва гена	ID хромосоми	Геномні координати	Довжи	Клас
			на гена (п.н.)	
<i>CITUB5</i>	CM043884.1	23,051,194..23,053,622	2429	IV
<i>CITUB1</i>	CM043883.1	3,799,963..3,802,120	2158	IV
<i>CITUB7</i>	CM043883.1	26,296,966..26,298,786	1821	II
<i>CITUB8</i>	CM043881.1	10,245,936..10,247,467	1532	II
<i>CITUB6</i>	CM043881.1	4,606,900..4,608,526	1627	I
<i>CITUBX</i>	CM043882.1	5,933,487..5,935,547	2061	IV-like
<i>CITUB4</i>	CM043881.1	32,297,304..32,298,905	1602	III
<i>CITUB9</i>	CM043880.1	14,670,222..14,671,788	1567	III
<i>CITUB2</i>	CM043882.1	14,551,795..14,553,758	1964	II
<i>CITUB3</i>	CM043885.1	26,967,372..26,969,068	1697	II

## Ідентифіковані гени β-тубуліну у геномі *C. hispida* var. *grandiflora*

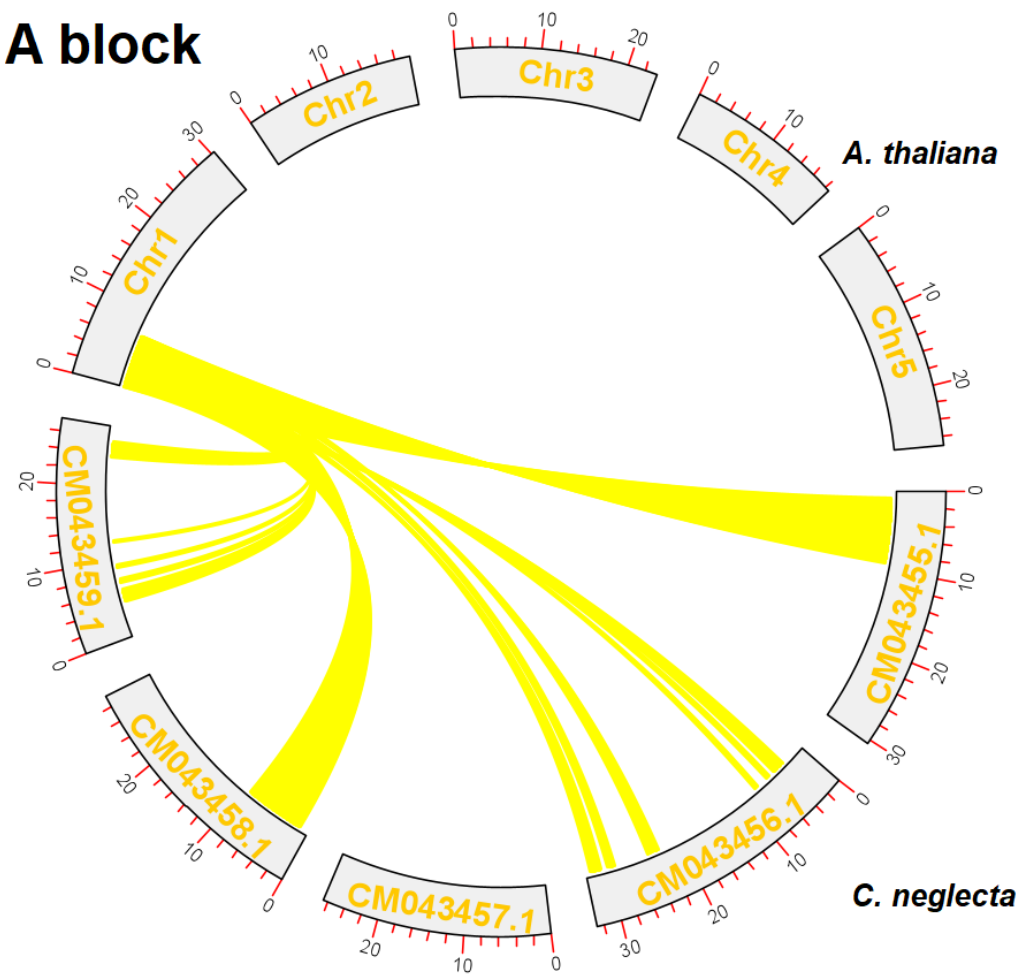
Назва гена	ID хромосоми	Геномні координати	Довжи	Клас
			на гена (п.н.)	
<i>ChvgTUB5-1</i>	CM043447.1	9,938,008..9,940,256	2248	IV
<i>ChvgTUB5-2</i>	CM043447.1	9,941,587..9,943,997	2410	IV
<i>ChvgTUB1</i>	CM043448.1	38,003,405..38,005,530	2125	IV
<i>ChvgTUB7</i>	CM043450.1	16,735,114..16,737,075	1961	II
<i>ChvgTUB8</i>	CM043453.1	17,070,739..17,072,282	1543	II
<i>ChvgTUB6</i>	CM043453.1	5,712,831..5,714,449	1618	I
<i>ChvgTUBX</i>	CM043450.1	9,174,266..9,176,243	1977	IV-like
<i>ChvgTUB4</i>	CM043453.1	31,079,413..31,081,020	1607	III
<i>ChvgTUB9</i>	CM043451.1	15,624,579..15,626,144	1565	III
<i>ChvgTUB2p-1</i>	CM043448.1	19,854,845..19,856,861	2016	II
<i>ChvgTUB2p-2</i>	CM043448.1	20,101,855..20,107,966	6111	II
<i>ChvgTUB3</i>	CM043452.1	31,840,640..31,842,552	1912	II

# Реконструкція геномних блоків АСК у *Samelina* sp.

All ACK placed



A block





## Результати другого року навчання

- Ідентифіковано гени  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -тубулінів у геномі алогексаплоїдного виду *C. sativa*
- Ідентифіковано гени  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -тубулінів у геномах диплоїдних *C. laxa*, *C. neglecta*, *C. hispida* ssp. *grandiflora* та ssp. *hispida*;
- Досліджено екзон-інтронну структуру ідентифікованих генів;
- Реконструйовано філогенію різних типів тубуліну та філогенетичне положення ідентифікованих генів;
- Реконструйовано локалізацію ідентифікованих генів на геномних блоках предкового каріотипу Хрестоцвітих в геномах аналізованих видів;
- Проаналізовано синтенію геномів зазначених видів та виявлено тип гомологічних зв'язків ідентифікованих генів та прояснити їх еволюційну історію;
  
- Протягом навчального року було опрацьовано фахові літературні джерела за темою дисертаційної роботи.
- Були виконані вимоги освітньої складової, зокрема успішно складено заліки з дисциплін, передбачених освітньою програмою для 1-го року навчання.

# Публікації за темою дисертації

## Статті:

1. **Blume R.Y.**, Kalendar R.N., Guo L., Cahoon E.B., Blume Y.B. Overcoming genetic paucity of *Camelina sativa*: possibilities for interspecific hybridization conditioned by the genus evolution pathway. *Front. Plant Sci.*, 2023, 14: 1259431. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1259431>. **(Q1)**
2. Rabokon A.M., **Blume R.Y.**, Sakharova V.G., Chopei M.I., Afanasieva K.S., Yemets A.I., Rakhmetov D.B., Pirko Y.V., Blume Y.B. Genotyping of interspecific *Brassica rapa* hybrids implying  $\beta$ -tubulin gene intron length polymorphism (TBP/cTBP) assessment. *Cytol. Genet.*, 2023, 57(6): 538-549. <https://doi.org/10.3103/S0095452723060075>. **(Q4)**
3. **Blume R.Y.**, Rabokon A.N., Pydiura N.O., Yemets A.I., Pirko Y.V., Blume Y.B. Genome-wide identification and characterization of the tubulin genes family in *Camelina sativa* (подано до друку)

## Тези:

1. Rabokon A.M., **Blume R.Y.**, Sakharova V.H., Afanasieva K.S., Pirko Ya.V., Blume Ya.B. Application of  $\gamma$ -tubulin intron length polymorphism for DNA-barcoding of *Brassica rapa* subspecies. International scientific internet conference «Modern problems of genetics, biotechnology and biochemistry of agricultural plants», Odessa, Ukraine, October 19<sup>th</sup>, 2023, pp. XX-XX.
2. **Blume R.Y.**, Rabokon A.M., Sakharova V.H., Pirko Ya.V., Blume Ya.B. Expression of tubulin genes of false flax (*Camelina sativa*) under salt and cold stress conditions. Second International conference 'Plant Stress and Adaptation', Kharkiv, Ukraine, 7-8 June 2023 (online event), pp. 14-15.
3. **Blume R.Y.**, Rabokon A.M., Sakharova V.H., Svyrydova K.O., Chopei M.I., Afanasieva K.S., Pirko Ya.V. Identification of tubulin genes in *Brassica rapa* for efficient genotyping based on their non-coding sequences length polymorphism. XX International conference for students and young scientists 'Shevchenkivska vesna: Advancements in Life Sciences', Kyiv, Ukraine, 27-28 April, 27-28, pp. 9-13.



## Інші публікації

### Статті:

1. **Blume R.Y.**, Rakhmetov D.B., Rakhmetova S.O., Hotsuliak V.Y., Yemets A.I., Blume Y.B. Introduction and performance of emerging biofuel crop *Brassica carinata* in Ukraine. European Biomass Conference and Exhibition Proceedings (Eds. de Bari I., Scarlat N., Grassi A.), ETA-Florence Renewable Energies, 2023, pp. 104-106. <https://doi.org/10.5071/31stEUBCE2023-1AV.4.4>.
2. Mosyakin S.L., **Blume R.Y.** On the taxonomic identity of *Camelina armeniaca* (*Brassicaceae*), a forgotten early name in *Camelina*. *Botanica*, 2022, 28(2): 81-90. <https://doi.org/10.35513/Botlit.2022.2.1>.
3. Sakharova V.H., **Blume R.Ya.**, Rabokon A.N., Pirko Ya.V., Blume Ya.B. Efficiency of genetic diversity assessment of little-pod false flax (*Camelina microcarpa* Andr. ex DC.) in Ukraine using SSR- and TBP-marker systems. *Rep. Natl. Acad. Sci. Ukraine*, 2023, 4: 85-94. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2023.04.093>. (in Ukr.)
4. Hotsuliak V.Y., **Blume R.Y.**, Blume Y.B. Comparative analysis of *Camelina sativa* and fungal industrial lipases used for biodiesel production. *Factors Exp. Evol. Organisms*, 2023, 32: 23-30.
5. Melnyk O.G., **Blume R.Ya.**, Karpov P.A. Differences in amino acid composition of carrot  $\alpha$ -tubulin potentially confer the resistance to dinitroaniline herbicides. *Factors Exp. Evol. Organisms*, 2023, 32: 47-52.



## План роботи на 2-й рік

- Ідентифікувати гени  $\alpha$ -,  $\beta$ - та  $\gamma$ -тубулінів у геномах *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. napus*, *B. carinata*, *B. juncea*;
- Визначити екзон-інтронну структуру ідентифікованих генів, та підтвердити наявність консервативних доменів послідовностей тубуліну у очікуваних первинних пептидів, що кодуються даними генами;
- Встановити приналежність ідентифікованих генів до класів та ізотипів даних білків, уточнивши їх філогенетичне положення відносно тубулінів інших видів;
- Реконструювати положення ідентифікованих генів на геномних блоках предкового каріотипу Хрестоцвітих для кожного з геномів аналізованих видів;
- Проаналізувати синтенію геномів зазначених видів та виявити тип гомологічних зв'язків ідентифікованих генів та прояснити їх еволюційну історію;

**Дякую за увагу!**