

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію **Зіміної Ольги Володимирівни** “Створення модельних систем для дослідження процесів сегрегації і рекомбінації гомологічних хромосом на рослинах *Arabidopsis thaliana* та *Secale cereale*”, поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Ділення клітин та розподіл генетичного матеріалу між дочірніми клітинами лежить в основі існування всіх живих організмів. У еукаріотів існують спеціальні механізми рівномірного розподілу хромосом – мітоз і мейоз. Це строго запрограмовані процеси, порушення яких в більшості випадків призводить до небажаних наслідків. Аномалії у сегрегації хромосом можуть призводити до хромосомної нестабільності, в результаті чого виникають клітини зі зміненим набором хромосом і клітини з втратою гетерозиготності. На відміну від тварин у рослин геном пластичний – клітини зі зміненим числом хромосом та іншими аномаліями у геномі мають право на існування, існують, розмножуються і навіть утворюють повноцінні організми не тільки в умовах *in vitro*, але й у природі. Тому дослідження мінливості і нестабільності геному у рослин представляє особливий інтерес як для фундаментальних, так і прикладних цілей.

Атипові поділи соматичних клітин такі, як соматична редукція або соматичний мейоз привертають особливу увагу і характеризуються розходженням гомологічних хромосом (а не хроматид) або поділом їх на дві гаплоїдні групи, наслідком чого може стати мозаїчність. На сьогодні інформація щодо поведінки гомологічних хромосом в процесі соматичної сегрегації обмежена; не вивчені генетичні наслідки і доля клітин, що виникають в результаті цієї події. Постає необхідність створення зручної модельної системи для вивчення даного явища. Основа такої модельної системи - це маркери для розпізнавання гомологічних хромосом, які дадуть можливість дослідити розподіл хромосом під час мітозу та мейозу, визначити наявність рекомбінації між ними, вивчити явище соматичної редукції, а також з'ясувати внесок даного явища в процес формування анеуплоїдних клітин і оцінити можливість його використання для зворотної селекції.

У зв'язку з цим, актуальність дисертаційної роботи Зіміної О.В., присвяченої створенню модельних систем рослин, які мають молекулярно-генетичні, цитогенетичні та фенотипові маркерні ознаки для ідентифікації хромосом, що дозволяє вивчати їх сегрегацію та рекомбінацію під час мітоза, не викликає сумніву.

У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, мета та логіка постановки експериментів. Дисертаційна робота Зіміної О.В. складається із вступу, трьох розділів, узагальнення, висновків та списку використаних джерел (209); містить 10 таблиць та 21 рисунок.

Розділ «Огляд літератури» складається з двох підрозділів, перший з яких містить загальні відомості про процес та механізм сегрегації хромосом; явище соматичної редукції (наведені його приклади); дослідження механізмів сегрегації хромосом у різних об'єктів. Нажаль, сучасні уявлення про механізм сегрегації хромосом і його контроль викладені недостатньо повно.

Другий підрозділ присвячений характеристиці методичних підходів, які застосовують для досліджень перебудов геному і хромосом у рослин. Описано різні типи ДНК- та білкових маркерів, зокрема міні- мікро- та сателітні маркери, селективні та репортерні гени. Важливу частину складає опис FISH-аналізу хромосом, який є потужним методом вивчення геномів еукаріот. Приділено увагу селекції трансгенних рослин в культурі *in vitro*. У підрозділі 1.1.2. «Флуоресцентна гібридизація *in situ*» майже немає посилань на літературні джерела.

Розділ «Матеріали та методи досліджень» дисертантка розбила на три частини, виходячи з того, що для двох використаних в роботі об'єктів були застосовані різні методи досліджень і це має полегшити пошук необхідної інформації. Перший підрозділ містить інформацію про рослинний матеріал *A. thaliana*, використаний для створення модельної системи дослідження процесів сегрегації та рекомбінації хромосом. В цьому підрозділі описано процес генетичної трансформації *in planta* *A. thaliana* (причому жодного разу термін «генетична трансформація *in planta*» не використано), бактеріальні штами і вектори, використані для отримання трансгенних рослин двох екотипів арабідопсису, а також методи селекції трансформованих рослин та аналізу експресії трансгенів. Описано процедуру отримання гібридів на основі створених трансгенних рослин, введення *A. thaliana* в культуру *in vitro*, умови регенерації рослин та визначення оптимальної концентрації пара-фтор-L-фенілаланіну, необхідної для індукції соматичної редукції та гомозиготизації. Наведено методики приготування давлених препаратів хромосом, виділення ДНК та проведення ПЛР, а також описано процедуру добору хромосом-специфічних ПЛР-маркерів.

Другий підрозділ «Матеріалів і методів» містить відомості про використані в роботі сорти *S. cereale*, підготовку препаратів хромосом, процедуру флуоресцентної гібридизації *in situ* разом із використаними клонами повторюваних послідовностей в якості зондів та проточної цитометрії і сортигону хромосом.

В третьому підрозділі наведено методи статистичної обробки результатів.

Розділ «Результати досліджень та обговорення» викладено також у трьох підрозділах, в яких розглянуто питання, присвячені двом модельним об'єктам – арабідопсису та жити.

В першому підрозділі, “Модельні системи для дослідження механізмів сегрегації хромосом”, переважно наведено аргументи на користь створених та використаних в роботі модельних систем. Показано переваги кожного з об'єктів та їх недоліки, а також взаємодоповнення двох систем у різних

експериментах з дослідження сегрегації хромосом.

В другому підрозділі, присвяченому модельному об'єкту *A. thaliana*, Зіміна О.В. наводить дані про створення трансгенних ліній арабідопсису екотипів *Columbia* і *Landsberg erecta* з репортерними генами *gusA* і *gfp* і селективними генами *nptII* і *bar*, відповідно. В результаті самозапилення трансгенних ліній було відібрано 6 гомозиготних ліній екотипу *Colambia* з високим рівнем експресії гена *gusA* та 1 лінію екотипу *Landsberg erecta* з високим рівнем експресії гену *gfp*. Ці лінії примусово схрещували з метою отримання «модельних» гібридів. Але автор не вказує скільки всього трансгенних ліній було отримано. Також не зрозуміло, яким чином наявність *gusA*, *gfp*, *nptII* і *bar* дозволяє розрізняти батьківські геноми на цитологічному рівні? Виникає питання: скільки ліній *Colambia* було залучено у схрещування і скільки гібридів (не насінин) було отримано?

Селекцію гібридів проводили в умовах *in vitro*, відповідно, дисертанткою проведено оптимізацію умов культивування клітин і експлантів арабідопсису *in vitro* для отримання регенерантів, які мали гібридне походження. Далі автор визначив максимальну концентрацію парафтор-L-фенілаланіну (ПФФА) - 18 мг/л, за якої ще відбувається калусоутворення та регенерація рослин *A. thaliana*, а також може відбуватися індукція соматичної редукції та гомозиготизації. Загалом було відібрано по 20 регенерантів на середовищі з ПФФА та без нього, аналіз яких за допомогою системи SSLP-маркерів виявив втрату гетерозиготності в шести локусах у трьох рослин. Зіміною О.В. проведено цитогенетичний аналіз, за даними якого в оброблених ПФФА калусних клітинах виявлено біваленти і хромосомні угруповання.

Дисертанткою підібрано систему молекулярних маркерів для ідентифікації хромосом кожного з екотипів *Columbia* і *Landsberg erecta*. Зіміна О.В. підбрала хромосом-специфічні ПЛР-маркери (12 SSLP маркерів) для ідентифікації екотипів *A. thaliana*, їх гібридів та відбору гібридів-регенерантів. Для ідентифікації екотипів і гібридів в якості ДНК-маркерів використовували послідовності SSLP, які у *A. thaliana* є високополіморфними, мають кодомінантний тип успадкування і прості в застосуванні.

Дисертанткою підібрано та оптимізовано умови ПЛР-реакцій для 12 SSLP маркерів, розроблені мультиплексні реакції для ідентифікації 7 маркерних локусів. В результаті проведених експериментів з оптимізації умов ПЛР Зіміною О.В. було встановлено, що двустадійна ПЛР з використанням двох температур відпалу праймерів в кожному циклі дозволяє ефективно ампліфікувати всі розглянуті в роботі фрагменти. Також нею визначено умови для проведення двох ПЛР-мультиплексів, кожен з яких дозволяє ампліфікувати по два фрагмента, і одного ПЛР-мультиплексу - для ампліфікації трьох маркерів. Розроблена Зіміною О.В. система ДНК-маркерів може бути використана для вивчення поведінки і успадкування кожної хромосоми материнського і батьківського геномів гібридів *A. thaliana*, а також дає можливість швидко і ефективно проводити генетичний аналіз.

В третьому підрозділі, присвяченому модельному об'єкту *Secale cereale* наведено інформацію про аналіз хромосомної локалізації повторюваних послідовностей pSc119, pSc200 та pSc250 у кількох сортів жита, аналіз міжсортного поліморфізму хромосом жита, використання додаткових FISH-маркерів для ідентифікації всіх хромосом жита, та результати проточного флуориметричного сортиру хромосом двох сортів жита.

При аналізі хромосомної локалізації повторюваної послідовності pSc119 Зіміною О.В. проведено гібридизацію з цим повтором і виявлено велику кількість сайтів в інтеркалярному гетерохроматині і численні сайти біля кінців всіх коротких і багатьох довгих плечей хромосом.

При аналізі хромосомної локалізації повторюваних послідовностей pSc200 та pSc250 дисертантом було встановлено, що послідовності, гомологічні pSc200 та pSc250 (на відміну від pSc119), були локалізовані головним чином як поодинокі значні за розміром бенди близько до кінця відповідних плечей хромосом і майже не гібридизувалися в інтеркалярному положенні. При порівнянні трьох сортів жита Petkus, Imperial та Онохойская шляхом гібридизації *in situ* за допомогою двох негомологічних високоповторюваних послідовностей ДНК, pSc200 та pSc250, автором показано хромосомоспецифічну локалізацію цих повторів, що дало можливість ідентифікувати більшість плечей хромосом жита.

За використання у якості зондів мікросателітної послідовності GAA і проби pTA794 (фрагмента гена 5S рРНК) зіміною О.В. було ідентифіковано хромосоми жита *S. cereale* сортів Selgo і Життедаїне та показано, що три хромосоми, а саме 1R, 3R та 5R, мають чіткий сигнал рибосомної 5S рДНК на короткому плечі. Дисертантом також встановлено, що додаткова гібридизація разом із мікросателітним повтором та одним із субтеломерних зондів (pSc200 та pSc250) дає можливість виділити всі сім пар хромосом жита *S. cereale*.

В розділі «Узагальнення» ґрунтовно і чітко узагальнені результати досліджень, які підтверджують доцільність використання запропонованих систем для дослідження процесів сегрегації та рекомбінації. Стисло викладено отримані автором результати, проведено обговорення їх значення та можливостей практичного застосування. Результати дослідження показали, що одночасне чи послідовне використання декількох молекулярно-цитогенетичних маркерів дозволяє успішно ідентифікувати хромосоми та більш точно локалізувати різні ДНК-зонди, а також одержати додаткову інформацію про структурну організацію мітотичних хромосом рослин, зокрема сорту жита Життедаїне.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у відділах регуляторних механізмів клітини і молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАНУ “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій” “Молекулярна організація та еволюція

субтеломерного гетерохроматину жита *Secale cereale* L.: стратегія використання окремих хромосом” (2010-2011), міжнародної рамкової програми FP7-212019 TriticaceaeGenome from the European Union Commission (2011-2013); а також в рамках державних бюджетних тем “Вплив амітозину і ізатізону та їх похідних на резистентність організму” (№ держреєстрації 0106U005433, 2007-2011), “Розробити комплексні препарати на основі ізатізону і вивчити молекулярно-клітинні основи їх дії” (№ держреєстрації 011U007699, 2012-2016), і частково в рамках теми “Вивчення молекулярно-генетичних змін при мієлопроліферативних захворюваннях і їх використання у клітинній діагностиці” (№ держреєстрації 0110U006129, 2010-2014).

Новизна дослідження та одержаних результатів. Вперше запропоновано і створено рослинні модельні системи на основі *A. thaliana* та *S. cereale*, що мають систему молекулярно-генетичних і цитогенетичних маркерів, за допомогою яких можливо проводити аналіз поведінки геномів і гомологічних хромосом в культурі *in vitro* та *in vivo* під час поділу та візуалізувати процеси сегрегації і рекомбінації хромосом.

Вперше отримано рослини-регенеранти *A. thaliana*, які втратили гетерозиготність при культивуванні *in vitro* гетерозиготних модельних гібридів на середовищі з ПФФА, що може свідчити про індукцію мітотичної рекомбінації гомологічних хромосом за допомогою ПФФА.

Вперше вдалося відсортувати хромосому 1R за допомогою проточної цитометрії у сорту Життедайне *S. cereale*, що створює передумови для пошуку нових житоспецифічних та хромосом-специфічних маркерів.

Визначено сорти *S. cereale*, в яких FISH аналіз із використанням жито-специфічних тандемних повторів (pSc200, pSc250, pSc119.2), послідовностей рибосомної та мікросателітної ДНК дозволяє розрізнити індивідуальні хромосоми та їхні плечі.

Теоретичне значення результатів досліджень. Дослідження, проведені Зіміною О.В., поглиблюють та розширюють уявлення про генетичні та молекулярно-біологічні процеси, які відбуваються в культурі клітин під впливом стресових факторів. Результати, наведені у дисертації, надають нові перспективи для вирішення фундаментальних питань біотехнології та генетики рослинних клітин, культивованих *in vitro*.

Практичне значення результатів досліджень. Розроблена модельна система на основі гібридів *A. thaliana* може бути використана для вивчення поведінки і успадкування окремих хромосом материнського і батьківського геномів за використання хромосом-специфічних ПЛР-маркерів в експериментальних дослідженнях механізмів та шляхів регуляції процесів сегрегації та рекомбінації хромосом. Розробка системи FISH-маркерів індивідуальних хромосом для ряду сортів *S. cereale* створює певне підґрунтя для використання цих сортів в дослідженнях процесів сегрегації та рекомбінації гомологічних хромосом. Виділення індивідуальних хромосом жита методом флуоресцентного сортигу відкриває можливості для створення геномних бібліотек окремих хромосом, які в подальшому можуть

бути використані для геномного аналізу та вирішення практичних завдань селекції.

Матеріали дисертації можуть представляти інтерес для наукових закладів генетико-селекційного напрямку та бути використані при викладанні генетики і біотехнології рослин у вищих учбових закладах.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант проаналізував значний масив даних літератури про процес та механізм сегрегації хромосом, явище соматичної редукції та методичні підходи, які застосовують для досліджень перебудов геному і хромосом у рослин.

Цитовані в дисертації літературні джерела дали змогу обґрунтувати основні положення наукової роботи та методичні підходи для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати великий обсяг експериментального матеріалу. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: культивування рослинних клітин і тканин *in vitro*; цитогенетичний аналіз калюсів та рослин-регенерантів; флуоресцентну гібридизацію *in situ* (FISH); проточну цитометрію і сортиг хромосом; молекулярно-генетичний аналіз (полімеразна ланцюгова реакція, SSLP-аналіз поліморфізму ділянок ДНК); гістохімічний (тест на GUS-активність); статистичний аналіз.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу великого об'єму фактичного матеріалу, з використанням сучасних методів досліджень. Достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. Тому, вважаю, що наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на міжнародних наукових форумах. Зокрема, за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових праць, що включають 7 статей (з яких 5 у фахових виданнях, що входять до переліку ДАК/ МОН України, 3 включені до міжнародних наукометричних баз даних) та 11 тез доповідей у збірниках матеріалів конференцій.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення. Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено досить чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками, друкарських помилок майже немає. Проте слід зазначити деякі слабкі місця представленої роботи:

1. Текст дисертації містить певну кількість пунктуаційних, орфографічних та стилістичних помилок.

Наприклад, «в культурі *in vivo* та *in vitro*» (с. 2, 14), замість «в культурі *in vitro* та *in vivo*»; «гормональні середовища» (с.48) – замість середовища доповнені фітогормонами; «Результати ампліфікації і поділу фрагментів в

гелі наведено на рис. 3.8.» (с. 76) – замість **розділення** фрагментів; «**гомозиготація**» (с. 31, с. 78, с. 86) – замість «гомозиготизація»; «Індукція **конституціональних** змін генома в культурі *in vitro*» (с. 91) – замість **конституційних**.

Іноді зустрічаються не зовсім зрозумілі вирази: «кінетохор безпосередньо змінює динаміку мікротрубочок» (с. 21); «наявність напруженості використовується як зчитування точності» **чого?** (с.24), «розвиток системи виробництва гаплоїдів» (с.31); «традиційні альтернативи на основі фенотипу» (с. 35), «Дуже часто гібридизацію *in situ* використовують в селекції рослин в **різних аспектах**» (с.39); «цитологічний аналіз клітин *A. thaliana*, культивованих на середовищі С-1 без ПФФА, виявив 1,9 % **клітин** та 2% на середовищі з ПФФА, які можна **віднести до соматичної редукції хромосом** (табл. 3.5)» (с. 87).

2. Не завжди твердження дисертанта вірні: «Коли всі кінетохори правильно прикріплені до мікротрубочок, створюється сигнал, націлений на руйнування зчеплення між **хромосомами** за допомогою спеціального ферменту сепарази і який сприяє сегрегації хромосом» (с.24), не хромосом, а **хроматид**. «**Унікальні послідовності** відповідають структурним і регуляторним генам» (с. 36) – **не завжди**. Крім мітозу і мейозу існує **пряме** ділення клітин у бактерій (с.14).

3. «Перелік умовних скорочень» неповний. Відсутня розшифровка «RFLP-маркери» (с. 39), C-banding/FISH (с.55).

4. У розділі «Матеріали і методи досліджень» не охарактеризовано сорти жита, використані у дослідженнях (с. 54).

5. З тексту дисертації не зрозуміло, звідки взяли **M13** праймери «Полімеразна ланцюгова реакція з використанням M13 праймерів (с. 55)».

Також не зрозуміло, до якого середовища додавали ІМК - «Середовище для вкорінення з додаванням 1мг/л ІМК» (с.52).

6. Рисунки не завжди коректно оформлені:

На рис. 2.1 немає назв конструкцій (с. 46).

На рис. 3.19 не позначені вісі X та Y.

7. Є ряд запитань до автора:

- Чому у 5-ї хромосоми *A. thaliana* 4 маркера, а у 1-ї (яка за довжиною така ж, як 5-та) тільки 2? (с. 53).

- Чому суспензію, отриману згідно методики на с. 58, вважають **суспензією хромосом**?

8. Висновок №2 сформульовано некоректно: «Перевірено дві методики культивування *in vitro* *A. thaliana* для отримання регенерантів визначено оптимальні умови ефективної індукції калусоутворення і регенерації рослин.»

Проте, вказані зауваження не носять принципового характеру і не знижують наукової і практичної цінності дисертації.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів генетики, біотехнології,

селекції. Результати роботи Зіміної О.В. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках інститутів та селекційних закладів, які займаються питаннями генетики та селекції рослин, а також курсах лекцій з генетики рослин, цитогенетики та біотехнології Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Національного технічного університету України “Київського політехнічного інституту імені Ігоря Сікорського” (КПІ), Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред’являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, рецензована дисертаційна робота “Створення модельних систем для дослідження процесів сегрегації і рекомбінації гомологічних хромосом на рослинах *Arabidopsis thaliana* та *Secale cereale*” є завершеною науковою роботою, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Зіміна Ольга Володимирівна, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент,
старший науковий співробітник
відділу молекулярної генетики
Інституту клітинної біології та
генетичної інженерії НАН України,
кандидат біологічних наук

М.О. Банникова