

## ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертацію ШПИЛЬЧИНА Віталія Віталійовича «Зміна експресії гена *W<sup>1</sup>* у поколіннях амфідиплоїдів *Triticinae*» на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.15 «Генетика»

Віддалена гібридизація є ефективним засобом поповнення генетичного різноманіття м'якої пшениці. Найбільш перспективне в цьому напрямку є використання найближчих родичів культурної пшениці з роду *Aegilops*. Проте проблемним питанням залишається збереження господарсько-цінних ознак культурних сортів за інтрогресії чужорідного генетичного матеріалу і, відповідно, ознаки дикорослої форми. У рослинних геномах, походження яких пов'язане з алополіплоїдизацією або з віддаленою гібридизацією, відбуваються процеси дестабілізації такого генома. На фенотиповому рівні це виявляється появою нових ознак, відсутніх у батьківських генотипів або відмічаються суттєві зміни експресії генів аж до повного їхнього мовчання.

Рецензуєма робота як раз присвячена виявленню причини перманентної зміни прояву ознаки наявності/відсутності воскової осуги у пшеничних геном-но-заміщених і геномно-доданих амфідиплоїдів та інтрогресивних ліній та гібридів, що від них походять. І з цієї точки зору робота є безумовно актуальною. Дисертантом вдало підібраний по перше вихідний матеріал, найбільш придатний для вивчення причин і механізмів «незвичайної» мінливості окремих генів. По-друге, ознака наявності/відсутності воскової осуги виявляє повну пенетрантність та добру експресивність, фенотипова оцінка рослин завжди однозначна і ніколи не викликає сумнівів. По третє, цінність роботи також полягає у комплексному застосуванні традиційного генетичного аналізу ознаки та сучасних молекулярно-генетичних методів аналізу поліморфізму ДНК.

Робота виконувалась в межах НДР кафедри біології Національного університету «Києво-Могилянська академія» за темами «Інтрогресивні процеси у геномі м'якої пшениці та їх застосування для генетичного аналізу *Triticinae*» (№ держреєстрації 0110U001273); «Формування геному поліплоїдних злаків за умов штучної інтрогресії чужинного хроматину та у природних умовах» (№ держреєстрації 0110U001272); «Підвищення екологічної пластичності м'якої пшениці через індукцію рекомбіногенезу за участю інтрогресивного хроматину» (№ держреєстрації 0112U003159).

Результати дисертаційної роботи в достатній мірі апробовані на 5 міжнародних і всеукраїнських конференціях і на 12 міжнародному симпозіумі по генетиці пшениці та опубліковані в 8 статтях, в тому числі 6 – у фахових виданнях України, серед них 2 статті оприлюднені в журналі, що реферується у базі да-



них Scopus. Зміст статей відображає основні положення дисертації і відповідає її суті.

Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, три з яких є експериментальними, висновків та списку використаних джерел. Які три розділи є експериментальними? За змістом лише розділ 3. Розділи «Матеріали та методи досліджень» і «Узагальнення отриманих результатів» важко визнати експериментальними. Разом з тим кожен з чотирьох підрозділів розділу 3 по змісту, наповненню матеріалом і завершеності думки может бути окремим експериментальним розділом. Загальний обсяг дисертації – 148 сторінок, вона містить 16 рисунків, 13 таблиць, 202 цитованих джерела, з яких 52 2009-2013 рр., а 20 - 2014-2018 років видання.

Мета роботи сформульована чітко та логічно. Відносно формулювання окремих завдань дослідження такого висновку зробити не можна. Зокрема задачі 2 та 3 за суттю є майже ідентичними, за виключенням того, що у першому випадку вивчали успадкування ознаки у контрастних інтрогресивних ліній, а другому - контрастних морфотипів амфідиплоїдів Авротика і Міюза. Дещо незрозуміло формулювання задачі 5, що передбачає за допомогою мікросателітного аналізу ..... здійснити пошук мікросателітних маркерів, зчеплених з геном інтересу. Виявити мікросателітні маркери, зчеплені з геном інтересу можливо лише за результатами співставлення результатів мікросателітного та гібридологічного аналізів. Необхідно звернути увагу на те, що жодна з задач не передбачає використання різних запасних білків для виконання досліджень. В той же час у другому розділі детально описана методика екстракції та електрофорезу гліадинів, глютенінів, альфа- і бета-амілаз, а в підрозділі 3.2 порівняння електрофоретичних спектрів деяких білків зеленої та блакитної Міюзи і зеленої та блакитної Авротіки автор використовує, як доказ для спростування припущення про гібридне походження нової градації ознаки (наявність воскової осуги).

Щодо об'єкту та предмету дослідження. Об'єкт дослідження це явище або процес, а ні вихідний матеріал, що використовується в роботі. Таким процесом є молекулярно-генетичні процеси, що відбуваються при стабілізації новостворених геномів гібридного походження. Тобто те що відзначено у дисертанта як предмет дослідження. Сам по собі предмет є часткою об'єкту дослідження. Ним може бути формулювання на кшталт «Зміна експресії гена *Iw2* воскової осуги у поколіннях амфідиплоїдів, гібридах та інтрогресивних лініях *Triticinae*»

Дисертантом вперше доведено факт перманентної та односпрямованої зміни прояву ознаки наявності/відсутності воскової осуги на рослинах пшениці одержаних як від самозапилення штучних амфідиплоїдів пшениці та інтрогре-



сивних ліній, що від них походять, так і рослин гібридного походження від схрещування контрастних генотипів. Вперше показано, що можливим молекулярним механізмом мутування домінантних алелів генів-інгібіторів воскової осуги до рецесивних, є рух ретротранспозонів; зокрема, такий рух зареєстрований у хромосомній ділянці, розташованій поряд з геном *Iw2(T)* геному Авротики. Вперше ідентифіковано гени інгібітори – члени ортологічних серій пшеницевих на хромосомах 2Т *Ae. mutica* та 2М *Ae. comosa* (серія *Iw2*) та 1Т (серія *Iw3*) *Ae. mutica*.

Практичне значення одержаних результатів полягає перш за все у створенні моделі для молекулярно-генетичного дослідження, спрямованого на пошук зв'язку між зміною фенотипового виразу ознаки, що постійно відбувається у гомогенних популяціях штучних амфідиплоїдів пшениці та сегрегаційних популяціях їхніх гібридів, та генетичними змінами, які відбуваються у геномах, що мають гібридне походження. Значної ваги набуває і запропонована модифікація методу REMAP, в якій замість другого праймера використовується хромосомно-специфічна фланкуюча послідовність SSR-локусу, чим забезпечується хромосомна специфічність наявному поліморфізму. Запропонована модифікація перетворює поліморфні спектри на локус-специфічні, що обумовлює хорошу роздільну здатність методу при аналізі спектрів ампліфікації.

У першому розділі «Біосинтез компонентів та генетична регуляція воскової осуги у рослин» автором розглянуті загальна характеристика компонентів, що утворюють воскову осугу, ефекти наявності/відсутності воскової осуги щодо низки фізіологічних, морфологічних і господарсько цінних ознак, біосинтез компонентів і генетичний контроль біосинтезу поверхневих восків у різних культур: *Arabidopsis thaliana*, кукурудзи, рису тощо, а також регуляція біосинтезу та транспорту компонентів, посттранскрипційна та посттрансляційна регуляція біосинтезу поверхневих восків. Викладена модель генетичного контролю ознаки "воскова осуга", відмічена роль алополіплоїдизації у формуванні та стабілізації геномів та структурні і функціональні перетворення геному внаслідок цього процесу. Відмічено вплив епігенетичних змін, ядерцевого домінування, геномного імпринтингу, парамутацій та транспозонів на успадкування та прояв ознак. Обговорюються можливі причини як гетерозисний ефекту, так і факту низької життєздатності гібридів. Ґрунтовний аналіз літературних джерел послужив підґрунтям для визначення напрямку власних досліджень дисертанта.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» детально охарактеризовано рослинний матеріал, наведено реактиви, розчини, обладнання, характеристики праймерів, але не всіх, до мікросателітних повторів (SSR), що було використані при проведенні досліджень. Зокрема не наведені у таблиці 2.1 послідовності праймерів до локусу *Xgwm702*, який є самим результативним, маючи на увазі



подальше викладення матеріалу роботи дисертантом. Автором описано методики виділення геномної ДНК з зелених листків та колеоптилі, проведення полімеразної ланцюгової реакції, електрофоретичного розділення продуктів ПЛР в агарозному та акриламідному гелі, електрофоретичне розділення та візуалізація продуктів ПЛР в системі ALFexpress II., екстракція та електрофоретичне розділення гліадинів, глютенінів, бета- і альфа-амілази, фенотипової оцінки рослинного матеріалу і гібридизації пшениці та статистичної обробки результатів з використанням методу  $\chi^2$  Пірсона, та точного критерію Фішера при порівнянні розподілів, що включали до себе дуже малі ( $< 5$ ) обсяги класів.

Серед методів роботи наведених у розділі 2, як і вище у вступі не відмічений метод генетичного або гібридологічного аналізу. Фенотипна оцінка рослинного матеріалу (підрозділ 2.3) та методика гібридизації пшениці (підрозділ 2.4) є важливими складовими гібридологічного аналізу, але не замінюють його. Використання методу гібридологічного аналізу підтверджено всім подальшим викладанням матеріалу та знаходить своє відображення у назві підрозділів 3.1.1. та 3.3.1.

На старинці 69 у розділі 2.5.3. відмічається, що проводили ампліфікацію ДНК пшеничних рослин, що досліджувалися, з праймерами, розробленими до мікросателітних локусів на 1В, 2В та 2D хромосомах. А у роботі розглядаються тільки такі до мікросателітних локусів на 2В та 2D хромосомах.

У розділі 3 автор розглядає питання успадковування ознаки наявності/відсутності воскової осуги з використанням мікросателітних маркерів та гібридологічного аналізу інтрогресивних ліній м'якої пшениці, геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротика та геномно-доданих амфідиплоїдів Міоза та МІТ і п'яти різних зразків геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротика: Авротика 1 (зелена), Авротика 1 (зелено-блакитна), Авротика 2 (зелена), Авротика 2 (зелено-блакитна) та Авротика 2 (блакитна), а також виявлені асоціації між SSR-локусами та генами інтересу і досліджений поліморфізм ДНК контрастних морфотипів методами IRAP та REMAP, в тому числі ампліконів, отриманих з використанням одного з праймерів SSR-локусів, локалізованих поряд з генами *lw2*. При ознайомленні з результатами даного розділу виникло ряд запитань.

1. У полі було посіяно від 100 до 200 насінин гібридних рослин F2 кожної популяції, а оцінено на стадії колосіння за наявністю воскової осуги значно менше рослин. Незрозуміло чому всі рослини F2 не були оцінені і навіть та незначна кількість рослин, що проаналізована за фенотипом, не була повністю використана для ДНК аналізу. Наприклад, у табл. 3.6. у комбінації Авротика 1(зел-блак) x Авротика 1(зел) посіяно 160 насінин восени, оцінено на стадії колосіння 70 рослин, зібрано матеріал з 49 рослин, а на ДНК аналіз відібрано тільки 27.



Для пошуку маркерів і визначенні зчеплення логічно та правильно було використовувати всі рослини популяції.

2. На рис. 3.10 дисертації (рис. 5 автореферату) зразок №11 має блакитний колір та не має продукту ампліфікації розміром 2000 п.н. з комбінацією праймерів *Xgwm702F/REMAPCAn*, що за ствердженням автора пов'язаний з мутацією домінантного гена *Iw2 (T)*. Автор не звертає уваги на цей зразок, який не узгоджується з його припущенням щодо мутації гена.

3. Автор роботи для виявлення зчеплення використовував мікросателітний локус *Xgwm702*, відстань якого від гену інтересу складає 37,7 сМ. У статтях, що вийшли з друку у 2013-2014 рр. є інформація щодо тісного зчеплення з геном *Iw2* на відстані 0,2 сМ SNP маркера S51038 та на 0,9 сМ - мікросателітного локусу WE6. Відомо було автору роботи об наведених маркерах і якщо так, то використовував або ні він їх у своїх дослідженнях.

4. У дисертації на рисунках зі спектрами продуктів ампліфікації ДНК не має маркерів молекулярної маси.

Логічним завершенням дисертаційної роботи є розділ 4, в якому автор проводить упорядкування даних попередніх розділів та узагальнення результатів одержаних другими авторами і власних експериментальних досліджень.

Сформульовані висновки є логічним витоком наукових досліджень дисертації, які, без сумніву, будуть корисними для подальших генетичних досліджень щодо вивчення нестабільності геномів гібридного походження. Разом з тим висновок 4 потребує уточнення, оскільки домінантний алель другого епістатичного інгібітора серії *Iw3* має не вид *Ae. mutica*, а зразок даного виду, що був використаний при створенні амфідиплоїда Авротика. Висновок 9 викликає деякі сумніви. Доказом руху ретротранспозонів є виявлення наявності зчеплення між хромосомною ділянкою, де розташований SSR-локус *Xgwm702* у геномі Авротика з локусом *Iw2(T)*. Відстань між геном *Iw2 (T)* та локусом *Xgwm702* (рис. 3.8) становить 37,7 сМ, тобто зазначений локус знаходиться на значній відстані від гену. На якій підставі автор стверджує, що комбінація праймера *Xgwm702* з праймером до ретротранспозону *REMAPCAn*, є доказом мутації гену *Iw2 (T)* що викликана рухом ретротранспозонів. Відомо, що для того щоб порушити експресію гена ретротранспозон повинен або вбудуватись в екзон (в такому випадку ген буде позбавлений можливості кодувати білок) або вбудуватися в район промоторів і/чи підсилювачів, чим порушить регуляторну область гена.

Наданий автореферат в цілому майже повністю відображає зміст дисертаційної роботи. Разом з тим результати розщеплення у табл. 4 автореферату не відповідають результатам розщеплення у табл. 3.6 та 3.7 дисертації. Зазначаються різні співвідношення для тих самих популяцій.

Наведені зауваження не впливають істотно на загальний позитивний висновок про представлену роботу. Вважаю, що дисертація на «Зміна експресії гена  $W^d$  у поколіннях амфідиплоїдів *Triticinae*» відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» (постанова №567 Кабінету Міністрів України від 24.07.2013), а її автор Шпильчин В. В. заслуговує присудження наукового ступеня ступеню кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.15 «Генетика»

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення, Одеса, Овідіопольська дорога, 3, 65036

23 червня 2018 року.

Заступник директора з наукової роботи,  
завідувач відділу загальної та молекулярної  
генетики, доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник,  
член-кореспондент НААН



 В. І. Файт