

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Шпильчина Віталія Віталійовича «ЗМІНА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА W¹ У
ПОКОЛІННЯХ АМФІДИПЛОЇДІВ TRITICINAE», подану до захисту на
здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми дисертаційної роботи. Морфологічні ознаки були першою маркерною системою у вивченні генетики пшениці і залишаються важливим предметом дослідження для розуміння молекулярних механізмів функціонування генів, їх взаємодії, регуляції та їх фенотипного прояву. Однією з таких морфологічних ознак у пшениці є наявність воскової осуги. Хоча генетичний контроль цієї ознаки вважається достатньо вивченим (включає гени-промотори та гени-інгібітори воскової осуги, відсутність воскової осуги є домінантною ознакою), існують факти, які не описуються запропонованою схемою генетичного контролю. Так, у поколіннях низки геномно-заміщених та геномно-доданих амфідиплоїдів без воскової осуги спостерігається незворотна поява форм з восковою осугою. Актуальним питанням є дослідження закономірностей такої мінливості на молекулярно-генетичному рівні. Таке дослідження нового явища становить інтерес у зв'язку з проблемою геномного стресу при утворенні амфідиплоїдів, яка зараз активно вивчається у світі. Основою роботи є унікальний генетичний матеріал.

У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робочі гіпотези та логіка дослідів. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, що налічує 202 найменування, викладена на 148 сторінках тексту, включає 13 таблиць, 16 рисунків.

У Вступі обґрунтовано актуальність теми і наведено загальну характеристику роботи.

У розділі 1 «Огляд літератури» автор на основі аналізу літературних джерел узагальнює інформацію про біосинтез компонентів та генетичну регуляцію воскової осуги у рослин, структурні та функціональні зміни в гібридному геномі при алополіплоїдизації, роль транспозонів у таких змінах.

У розділі 2. «Матеріали та методи досліджень» наведено характеристику рослинного матеріалу (штучні геномно-заміщені та геномно-додані амфідиплоїди, інтрогресивні лінії, похідні від геномно-заміщених амфідиплоїдів, гібридний матеріал від схрещень між лініями або амфідиплоїдами з контрастним фенотипом), методи польового дослідження рослинного матеріалу - фенотипної оцінки за ознакою «воскова осуга», методику гібридизації пшениці. Надано докладний опис методик виділення ДНК, проведення полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), електрофорезу ДНК у агарозному і поліакриламідному гелі, виділення та електрофорезу гліадинів, високомолекулярних субодиниць глютенінів, альфа- і бета-амілаз, вказано використані методи статистичного аналізу. У розділі наведено послідовності всіх використаних праймерів для ПЛР.

У розділі 3 «Результати експериментальних досліджень» представлено результати власних експериментальних досліджень автора з вивчення особливостей успадкування ознаки «воскова осуга» на різноманітному генетичному матеріалі та з використанням різних молекулярно-генетичних маркерів.

При дослідженні великої кількості гібридів F_1 і F_2 від схрещування інтрогресивних ліній з контрастним проявом ознаки воскова осуга та з сортом Аврора одержано результати, які не узгоджуються з описаною в літературі схемою контролю ознаки (де відсутність осуги, що контролюється генами-інгібіторами – домінантна ознака): майже всі гібриди мали воскову осугу. Автором зроблено припущення про зміну експресії гена-інгібітора воскової осуги при формуванні гамет у рослин із зеленим фенотипом. Використання у схрещеннях значної кількості ліній, що є похідними різних амфідиплоїдів – Авролати (AABBUU), Аврозису ($AABBS^{sh}S^{sh}$), Авродесу

(AABBSS) та аналіз різних гібридів свідчить про те, що виявлено нову закономірність, яка потребує подальшого дослідження на молекулярно-генетичному рівні. Вивчення ліній-похідних амфідиплоїдів за мікросателітними локусами хромосоми 2D дозволило говорити про те, що за фенотипну мінливість за восковою осугою, яка спостерігається, відповідає ген, розташований на хромосомах 2-ої гомеологічної групи, інгібітор воскової осуги *lw2*, принаймні у ліній-похідних Авролати.

Проведено дослідження форм, що відрізняються за восковою осугою геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка (AABVTT) та геномно-доданої форми Міоза (AABVMM) (вихідні амфідиплоїди – зелені, без воскової осуги, через певну кількість генерацій з'явилися форми з восковою осугою, блакитні (в обох амфідиплоїдів), та форма з колосом без воскової осуги та листям з осугою – зелено-блакитна (у Авротіки)). Подібну зміну прояву ознаки воскова осуга спостерігали також для геномно-доданих амфідиплоїдів MIT^D (AABVDD). Використання біохімічних маркерів дозволило виявити лише хромосомні перебудови у зразків Авротіки (судячи зі спектрів гліадинів). Аналіз мікросателітних локусів хромосоми 2D Міози зеленої і блакитної дав змогу припустити, що він спричинюється якоюсь зміною у хромосомі 2M, яка зачіпає ген ортологічної серії *lw2*.

При аналізі гібридів F₁ і F₂ від схрещування контрастних морфотипів у Авротіки та Міози в деяких випадках також отримано результати, які не описуються існуючою схемою генетичного контролю воскової осуги: в деяких комбінаціях рослини F₁ були блакитними, крім того у F₂ спостерігався надлишок рецесивних фенотипів.

На основі інформації про походження амфідиплоїду Авротіка було запропоновано гаплотипи для форм Авротіки з різним проявом воскової осуги за генами промоторами та інгібіторами воскової осуги. Для перевірки було проведено гібридологічний аналіз з участю спеціально відібраних генотипів без воскової осуги, у потомстві яких не спостерігалось розщеплення за даною ознакою. Гібридологічний аналіз підтвердив

правильність припущення, що вихідна зелена форма Авротіки має два домінантні алелі генів-інгібіторів, зелено-блакитна форма – один ген, *Iw3(T)*, блакитна – лише рецесивні алелі генів-інгібітори. Зроблено висновок про появу зелено-блакитних та блакитних форм серед вихідних зелених рослин через одну та дві мутації, відповідно.

Результати аналізу рослин F_2 від схрещення блакитної і зеленої форм Авротіки за мікросателітними локусами хромосом 2B і 2D показали, що ген *Iw2(T)* та локус *Xgwm702*, специфічний для 2D, можуть бути зчепленими у хромосомі 2T *Ae. mutica*.

На основі результатів дослідження автором зроблено висновок, що чинником перманентної зміни генотипного прояву ознаки наявності/відсутності воскової осуги на рослинах геномно-заміщених форм Авротіки є мутація домінантного гена ортологічної серії *Iw2* до рецесивного алеля, причому частота мутування є набагато вищою, ніж загальноприйнята оцінка для частоти спонтанного мутагенезу.

Як можливу причину такого явища було вказано «геномний стрес», одним з проявів якого є активність мобільних генетичних елементів. Тому автором проведено дослідження з використанням праймерів до ретротранспозонів у маркерних системах IRAP і REMAP. Окремо слід відзначити розробку автором оригінальної маркерної системи з використанням праймера до ретротранспозона та специфічного праймера до унікальної послідовності (в даному випадку прямий праймер до мікросателіта), яку можна назвати «заякореним REMAP». Однак ця система може бути універсальною: можна використовувати і інші види праймерів, головне в цьому – запропонована автором ідея – один праймер фіксований – специфічний, інший – часто зустрічається і забезпечує поліморфізм маркерної системи.

З використанням пари праймерів, підібраної за вищезазначеним принципом, *Xgwm702F/REMAPCAn*, виявлено відмінності в продуктах ампліфікації ДНК (поява додаткового компоненту спектру) для ліній F_4 з

восковою осугою у порівнянні зі спектром ДНК з рослин, позбавлених воскового шару. Наявність у складі системи модифікованого REMAP лівого праймера до мікросателітного локусу *Xgwm702F* дало можливість автору припустити, що генетичні перебудови відбулися саме поблизу гена *Iw2(T)*, у результаті чого в послідовних генераціях спостерігалась зміна його експресії, що виявляється як втрата інгібуючої функції гена та поява рослин, поверхня листків і колосу яких вкрита восковою осугою.

У розділі 4 «Узагальнення результатів дослідження» логічно і чітко викладено основні результати досліджень, зроблено відповідні припущення та висновки.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Роботу виконано у рамках наукових проектів кафедри біології НаУКМА «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.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше доведено факт перманентної та односпрямованої зміни прояву ознаки наявність/відсутність воскової осуги на рослинах пшениці, яка відбувається у всіх популяціях, генераційних та сегрегаційних, штучних амфідиплоїдів пшениці та інтрогресивних лініях, що від них походять. Вперше встановлено, що зміна рослиною пшениці фенотипу «зелений» на фенотип «зелено-блакитний» є наслідком мутації *Iw2*→*iw2*, а фенотипу «зелено-блакитний» на «блакитний» – наслідком мутації *Iw3*→*iw3* за умов гомозиготного стану за рецесивним алелем попереднього гена. Вперше показано, що молекулярним механізмом, який призводить до мутування домінантних алелів генів-інгібіторів воскової осуги до рецесивних, з великою ймовірністю, 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. Створено модель для молекулярно-генетичного дослідження, спрямованого на пошук зв'язку між зміною фенотипного виразу ознаки, що постійно відбувається у гомогенних (за походженням) популяціях штучних амфідиплоїдів пшениці та сегрегаційних популяціях їхніх гібридів, та генетичними змінами, які відбуваються у геномах, що мають гібридне походження. Розроблено оригінальну маркерну систему з використанням праймера до ретротранспозона та специфічного праймера до унікальної послідовності (у даному випадку праймер до мікросателіта), яку автором названо модифікована методика REMAP.

Теоретичне значення результатів досліджень. Результати дисертації поглиблюють уявлення про «геномний стрес» при утворенні алополіплоїдів, генетичний контроль морфологічних ознак, частоту спонтанного мутагенезу.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант опрацював значний обсяг літератури, що дозволило обґрунтувати вибір підходів до дослідження за темою роботи, формувати робочі гіпотези. Робота має чітку структуру, частини дослідження є логічно пов'язаними. Для виконання роботи використано широкий спектр методів – польові (виращування матеріалу і аналіз прояву ознаки на рослинах, проведення схрещень, гібридологічний аналіз), ПЛР аналіз, електрофоретичний аналіз білків. Слід відзначити значний об'єм дослідженого матеріалу, велику кількість проаналізованих гібридних комбінацій, що дозволяє говорити про виявлення закономірності прояву явища зміни експресії гена воскової осуги. Достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. Висновки відображають суть роботи та відповідають меті та

завданням роботи. Зміст автореферату відповідає змісту дисертаційної роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. За темою дисертації опубліковано 14 наукових робіт: 8 статей у наукових журналах, в тому числі 6 – у фахових виданнях, серед них 2 статті оприлюднені в журналі, що реферується у базі Scopus, тези 6 доповідей у збірниках матеріалів міжнародних і всеукраїнських конференцій.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення. Матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Проте є деякі зауваження до представленої роботи:

- В назві та в тексті дисертації і автореферату назву *Triticinae* чомусь не написано курсивом, це стосується також деяких інших латинських назв, у тому числі і у списку літератури (наприклад, посилання 1); замість транспозона *Viju* має бути *Veju*; є деякі помилкові написання слів.

- Розділ 2.5.2. називається «Розробка олігонуклеотидних послідовностей до мікросателітних повторів», проте там нічого не сказано про розробку, а лише наведено характеристику використаних праймерів, посилання на джерела.

- У розділі 2.5.3. вказано що «Методом полімеразної ланцюгової реакції проводили ампліфікацію ДНК пшеничних рослин, що досліджувалися, з праймерами, розробленими до мікросателітних локусів на 1B, 2B та 2D хромосомах...», проте ніде більше в дисертації про використання праймерів до мікросателітних локусів на хромосомі 1B не згадано.

- в авторефераті, на відміну від дисертації, не наведено визначення, що таке «зелено-блакитна» рослина, це, для зручності, можна було б зробити в описі рослинного матеріалу.

- На рис. 3.10. «Поліморфні спектри продуктів ампліфікації з REMAP праймером Xgwm702F/REMAPCAn», на жаль, не видно чи батьківська блакитна форма також має додатковий компонент, оскільки

інтенсивність спектрів продуктів ампліфікації ДНК батьківських форм набагато слабша, ніж у спектрів ліній F₄. Про це також не написано в тексті.

- Невдалим є опис в тексті спектрів гліадинів на Рис. 3.2. З рисунка можна зробити припущення, що як блок успадковуються компоненти 3+5+ 6 і можливо 21; 8+16, а компонент 9 незалежно від цих блоків; у Авротіки немає синтезу секалінів (компонентів 10-15), контрольованих локусом *Sec-1* на 1BL.1RS транслокації, на відміну від Аврори, у Авротіки спостерігаються відмінності від Аврори також за гліадинами, контрольованими *Gli-A1*. Однак, можна цілком погодитись з висновком автора, що відмінності в спектрах свідчать про перебудови в геномі Авротіки, які зачіпають також хромосому 1В

- на ст. 125 дисертації і в авторефераті на ст.13 вказано гаплотип «Авротіка 2 (зелена) - iw3(1B) W1(2B) iw1(2B) iw2(2T) iw3(1T)», який, однак, має тільки рецесивні алелі генів-інгібіторів. Крім того форма «Авротіка 2 зелена» не була задіяна в гібридологічному аналізі (Табл.3.3, 3.5).

Відмічені недоліки не впливають негативно на зміст дисертації, не принижують її актуальності, наукової новизни і практичного значення роботи.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів генетики рослин, зокрема алополіплоїдів. Виявлено нову закономірність, яка має бути предметом наступних поглиблених досліджень. Запропонована оригінальна маркерна система може мати універсальне значення для дослідження геномів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Шпильчина В.В. «Зміна експресії гена *W^d* у поколіннях амфідиплоїдів *Triticinae*» є закінченою науковою працею. Наведена в ній інформація щодо зміни експресії гена воскової осуги та дослідження молекулярних механізмів цього явища є науково обґрунтованою, поглиблює знання про геномний стрес, генетичний контроль морфологічних ознак, а

розроблена автором оригінальна маркерна система має універсальне значення. Виявлена в даній роботі закономірність зміни експресії гена має бути предметом подальших наукових досліджень.

Вважаю, що дисертаційна робота за назвою, науковою і практичною цінністю відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Шпильчин Віталій Віталійович, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент
завідувач лабораторії екологічної
генетики рослин і біотехнології
Інституту захисту рослин НААН
кандидат біологічних наук

Н.О. Козуб

Підпис

старший інспектор по ка

