

ВІДГУК

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*», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Поділ клітин та сегрегація хромосом являються фундаментальними процесами в біології, які привертають увагу вчених вже понад 100 років, проте основні механізми і регуляція цих процесів досі недостатньо вивчені. Сегрегація хромосом є одним з основних етапів у відтворенні клітин і зазвичай забезпечується з високою точністю під контролем молекулярних механізмів. Дефекти в сегрегації хромосом під час клітинного поділу порушують збалансоване успадкування генетичної інформації дочірніми клітинами, що може призводити до хромосомної нестабільності, анеуплоїдії, структурних змін хромосом.

Дослідження мінливості і стабільності геному у рослин представляє особливий інтерес як для фундаментальних, так і прикладних цілей. Наприклад, заміна мейозу мітозом може бути ключовим моментом клонального розмноження через насіння, яке має потенційне застосування в поліпшенні сільськогосподарських культур. Пригнічення гомологічної рекомбінації під час мейозу відкриває можливість до зворотної селекції, що дозволяє отримати гомозиготні лінії від гетерозиготних форм рослин. Проте на даний час немає чіткої інформації про поведінку гомологічних хромосом в процесі соматичної сегрегації, генетичні наслідки і долю клітин, що виникають в результаті цієї події. Тому постає необхідність створення адекватної модельної системи для вивчення даного явища. Важливим є пошук і створення маркерів для дискримінації гомологічних хромосом, що дало б можливість дослідити розподіл хромосом материнського та батьківського компонентів під час соматичної редукції, визначити наявність

рекомбінації між гомологічними хромосомами, а також з'ясувати внесок даного явища в процес формування анеуплоїдних клітин і оцінити можливість його використання в селекції для отримання гомозиготних батьківських ліній.

У зв'язку з цим, дисертаційна робота Зиміної О.В., присвячена створенню експериментальних моделей рослин і дослідженню процесів сегрегації і рекомбінації гомологічних хромосом в нормі та за індукції порушень під час поділу за допомогою цитогенетичних та молекулярно-генетичних маркерів. є безумовно актуальною і практично значимою. Такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал як для поглиблення наших знань про процеси сегрегації і рекомбінації гомологічних хромосом, подальшого розвитку та вдосконалення методів розмноження і селекції рослин, як одного із фундаментальних напрямів генетики, так і для розробки практичних аспектів застосування генетичних підходів для створення нових форм цінних сільськогосподарських культур.

У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу і узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який включає 209 джерел, у т.ч. англomовних 195. Робота викладена на 135 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 21 рисунком та містить 10 таблиць.

У розділі 1 «Огляд літератури» узагальнено інформацію про процес сегрегації хромосом, сучасні уявлення про його молекулярні механізми, описане явище соматичної редукції і наведені його приклади. Розглянуто методологію дослідження поведінки геномів та перебудов хромосом рослин. Наведено сучасні методичні підходи аналізу рослинних геномів, можливості маркування і ідентифікації окремих хромосом за допомогою різних типів ДНК- та білкових маркерів, FISH-аналізу. Зосереджено увагу на

використанні рослинних моделей, індукції, молекулярних механізмів та генетичних наслідків соматичної редукції, наявності генетичних детермінант, зовнішніх факторів і внутрішніх агентів, що обумовлюють виникнення атипових поділів. Висвітлено можливість реалізації концепції застосування соматичної редукції в отриманні гомозиготних ліній.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» детально описані умови проведення експериментів: рослинний матеріал; бактеріальні штами, векторні конструкції та умови *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації арабідопсису; методи аналізу експресії гетерологічних генів; схрещування трансгенних ліній та отримання гібриду; введення *Arabidopsis thaliana* в культуру *in vitro* та підбір умов для ефективної регенерації рослин; методи цитогенетичного та молекулярно-генетичного аналізу; статистичні методи обробки результатів досліджень.

У розділі 3 «Результати досліджень та їх обговорення» представлено результати власних експериментальних досліджень автора зі створення модельних систем для дослідження процесів сегрегації і рекомбінації гомологічних хромосом на рослинах *Arabidopsis thaliana* та *Secale cereale*.

У результаті проведених досліджень отримано лінії арабідопсису екотипу *Columbia*, що містять селективний ген стійкості до канаміцину (*nptII*) і репортерний ген β -глюкоронідази *gusA*, і лінії екотипу *Landsberg erecta* з гетерологічними генами стійкості до фосфінотрицину (*bar*) і репортерним геном *gfp*. Проведено перевірку стабільної експресії трансгенів у насінневих поколіннях і отриманню рослин, гомозиготні за вставками.

Автором оптимізовано склад живильного середовища для *A. thaliana*, щоб підвищити частоту калюсоутворення і регенерації рослин та апробовано дві методики культивування *in vitro* для отримання рослин-регенерантів. Показано перевагу роботи з корневими експлантами, яка була простішою і забирала менше часу.

Для вивчення соматичної сегрегації хромосом та визначення розподілу кожної хромосоми батьківського і материнського компонентів гібриду *A. thaliana* між дочірніми клітинами дисертантом були підібрали SSLP-маркери таким чином, щоб вони розташовувалися на кожному плечі кожної хромосоми *Arabidopsis thaliana*. В результаті проведених експериментів з підбору умов ПЛР було встановлено, що двостадійна ПЛР з використанням двох температур гібридизації праймерів в кожному циклі, 45° С і 60° С, дозволяє ефективно ампліфікувати всі цільові фрагменти одночасно. Розроблені мультиплексні реакції для семи маркерів. Результати роботи дали можливість прискорити та здешевити проведення масового генотипування рослин *A. thaliana* екотипів *Columbia* і *L. erecta*.

Вивчено вплив пара-фтор-фенілаланіну (ПФФА) на утворення калюсу в культурі клітин *A. thaliana*, а також на регенераційну здатність калюсу в присутності різних концентрацій ПФФА. Для подальших дослідів була вибрана концентрація 18 мг/л, оскільки за такої концентрації дія ПФФА на поділ клітин була достатньо помітною, проте не відбувалося повного пригнічення росту калюсу і регенерації рослин.

Проведена гібридизація створених трансгенних ліній. Отримане гібридне насіння *A. thaliana* використовували для культивування клітин *in vitro* і отримання рослин-регенерантів на середовищі з ПФФА. Було отримано 20 регенерантів на середовищі з ПФФА та 20 - на контрольному середовищі, які в подальшому аналізували за допомогою SSLP маркерів. У трьох гібридних рослин, отриманих на середовищі з ПФФА, SSLP-аналіз по шести локусах з 12-ти показав ознаки, характерні тільки для материнської або тільки для батьківської ліній.

Цитологічний аналіз клітин *A. thaliana*, культивованих на середовищі без ПФФА, виявив 1,9 % клітин та 2% на середовищі з ПФФА, які можна віднести до явища соматичної редукції. Виявлено бівалент-подібні структури, число яких дорівнювало п'яти, що відповідає числу бівалентів в

мейозі у *A. thaliana* ($n = 5$), а також анафазні клітини з групами, в яких можна припустити розходження хромосом по 5, а не по 10, як має бути в мітозі у *A. thaliana* ($2n = 10$). На думку автора, наявність у регенерантів такого розподілу ознак, отриманих від гомозиготних батьківських ліній, може пояснюватися рекомбінацією між двома гомологічними хромосомами.

На хромосомах жита (*Secale cereale*) встановлена хромосомна локалізація повторюваних послідовностей pSc119, pSc200 та pSc250 та отримані сильні гібридизаційні сигнали у місці розташування субтеломер, які відповідають позитивній флуоресценції гетерохроматину C-бендів при забарвленні DAPI. Гібридизація *in situ* двох негомологічних високоповторюваних послідовностей ДНК, pSc200 та pSc250, показала хромосомоспецифічну локалізацію цих повторів, що дало можливість ідентифікувати більшість плечей хромосом жита у 3 різних сортів. Із використанням у якості зондів мікросателітної послідовності і фрагменту гена 5S рРНК, було ідентифіковано хромосоми сорту Selgo та Життедаїне. Показано, що три хромосоми, а саме 1R, 3R та 5R мають чіткий сигнал рибосомної 5S рДНК на короткому плечі, а гібридизація разом із мікросателітним повтором та одним із субтеломерних зондів дає можливість виділити всі сім пар хромосом жита. Виявлений поліморфізм при розподілі повторів GAA на довгому плечі хромосоми 5 між сортами Selgo та Життедаїне дозволяє відрізнити гомологічні хромосоми даних сортів.

Аналіз методом проточної цитометрії метафазних хромосом, виділених з клітин рослин жита сорту Життедаїне, вперше дозволило визначити другий сорт, хромосоми якого можуть бути відсортовані і дозволяють дискримінацію хромосоми 1 в каріотипі жита. Розроблена процедура сортування великої кількості інтактних індивідуальних хромосом 1R жита дозволяє послідовне фізичне картування цієї хромосоми.

У розділі «Узагальнення» стисло і чітко узагальнені результати досліджень, які підтверджують обґрунтованість робочої гіпотези автора.

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 ізагізону та їх похідних на резистентність організму” (№ держреєстрації 0106U005433, 2007-2011), “Розробити комплексні препарати на основі ізагізону 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).

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором 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 широкий аналіз поведінки геномів і гомологічних хромосом в культурі *in vitro* та *in vivo* під час поділу клітин та візуалізувати процеси сегрегації і рекомбінації хромосом. Вперше отримано рослини-регенеранти *A. thaliana* зі втратою гетерозиготності при культивуванні *in vitro* модельного гібриду на середовищі з ПФФА, що свідчить про індукцію мітотичної рекомбінації гомологічних хромосом за допомогою ПФФА. Вперше вдалося відсортувати хромосому 1R за допомогою проточної цитометрії у сорту “Життєдайне” *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.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що розроблена модельна система на основі гібридів *A. thaliana* може бути використана для вивчення поведінки і успадкування окремих хромосом материнського і батьківського компонентів із використанням хромосом-специфічних ПЛР-маркерів в дослідженнях механізмів та шляхів регуляції процесів сегрегації та рекомбінації хромосом. Розробка системи FISH-маркерів індивідуальних хромосом для ряду сортів *S. cereale* створює підґрунтя для використання цих сортів в дослідженнях процесів сегрегації та рекомбінації гомологічних хромосом на моделі жита посівного. 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.

Теоретичне значення результатів досліджень полягає перш за все в тому, що вони не лише демонструють поведінку батьківських геномів і гомологічних хромосом під час поділу клітин в культурі *in vivo* та *in vitro* у модельній експериментальній системі, але й проливають світло на можливі молекулярні механізми цих процесів. Дослідження генетичних наслідків соматичної редукції, зовнішніх факторів і внутрішніх агентів, що обумовлюють виникнення атипових поділів наближають нас до розуміння механізмів, які впливають на генетичну нестабільність клітин.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант опрацював значний масив даних літератури в галузі генетичних процесів сегрегації і рекомбінації гомологічних хромосом та сучасних уявлень про їх

молекулярні механізми. Проаналізовано сучасні методичні підходи аналізу рослинних геномів, можливості маркування і ідентифікації окремих хромосом за допомогою різних типів ДНК- та білкових маркерів, FISH-аналізу.

Понад 80 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати великий обсяг експериментального матеріалу, який чітко та послідовно викладений в розділах власних досліджень та аналізу результатів. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: методи культури тканин і клітин рослин *in vitro*, генетичної трансформації рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*, молекулярно-біологічні методи, біохімічний тест визначення активності глюкоронідази, цитогенетичного аналізу, флуоресцентної гібридизація *in situ* на метафазних хромосомах, метод проточної цитометрії, методи біологічної статистики.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу великого фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням 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 робіт, 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. Автореферат адекватно відображує зміст дисертації.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.

Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Проте слід зазначити деякі слабкі місця представленої роботи:

1. У дисертації чомусь відсутня анотація роботи англійською мовою.
2. Текст дисертації містить певну кількість орфографічних та стилістичних помилок, зокрема «секвенування», замість сиквенування (с.17,35); «аберантне число хромосом» (с.19) замість анеуплоїдне; «ділянки геномів містять генетичні локуси» (с.36) замість хромосоми містять локуси; розділової (с.40) замість роздільної; «розчині білизни» (с.47) замість «розчині препарату «Білизна»; до **повного** росту в зрілі рослини (с.49); кореневі **експланти** 12-денних рослин розрізали на частини (с.49), хоча експлантом частина тканин стає лише після висаджування на живильне середовище; метафазних пластинок, отриманих з **зернин** генотипу (с.55); «акумулювання метафаз в кінчиках корінців» (с.57); «роздільна здатність проточного каріотипу» (с.58); «наслідування» (с.66) замість успадкування; «регенеративна» (с.79) замість регенераційна; «бридінгові програми» (с.112) замість селекційні програми.
3. Слід зауважити, що стійкість до канаміцину - це домінантна ознака, і в T_3 не можна виключати наявність гетерозиготних рослин із зеленим забарвленням.
4. Мітотичний індекс прийнято визначати не у відсотках, а у промілях.
5. Назви бінарних векторів (с.47) дані чомусь під порядковими номерами, а не повністю - pCAMBIA 2301 і pICH5290
6. У таблицях 2.1 та 2.2. «склад середовищ» не наведено кількість агару і води, оскільки це тверді середовища.

7. Автор пише: «вирізали апікальні меристеми пагонів (близько 1 см в довжину)», хоча розмір апексів практично у всіх вищих рослин не перевищує 1-2 мм.
8. Підпис до рис. 3.8 не зовсім коректний, оскільки ПЛР - це метод аналізу, а на рисунку представлено електрофореграму продуктів ампліфікації ДНК арабідоспису з праймерами до послідовностей маркерних локусів.
9. Підпис до рис. 3.19 також не зовсім коректний, оскільки на рисунку. відсутня і вісь Y- число випадків, і вісь X-відносна флуоресценція. Все таки краще писати не проточний каріотип, а гістограма відносної інтенсивності флуоресценції, оскільки каріотип передбачає представлення всіх хромосом, а на рисунку хромосоми 2R-7R не розділені.

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

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів генетики. Результати роботи Зіміної О.В. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках інститутів, що займаються генетикою рослин, проблемами збереження та відтворення генофонду цінних сільськогосподарських культур, а також в курсах лекцій з загальної та молекулярної генетики рослин Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

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, яка виконана на сучасному науково-методичному рівні та цілком відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», 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,
проф наук. сп. відділу генетичного
поліпшення рослин Інституту фізіології
рослин і генетики НАН України,
доктор біол. наук

С.Г.Д.

О.В.Дубровна



О.В.Дубровна
Маму
січня 2018 р.