ВІДГУК

на дисертаційну роботу ПОСТОВОЙТОВОЇ Анастасії Сергіївни «Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний інструмент внутрішньо- та міжвидової диференціації рослин», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22-молекулярна генетика

У різних напрямах сучасної генетики рослин, тварин, людини, мікроорганізмів, а також у селекції широко застосовуються молекулярні маркери, або ДНК-маркери. Останнім часом розроблено низку нових молекулярних маркерів. Цікавим тут є використання поліморфізму довжини інтронів різних генів (Intron Length Polymorphism, ILP). Це зумовлено тим, що більшість мутацій, зокрема транзицій, трансверсій, ампліфікацій, редукцій невеликих послідовностей чи окремих основ відбувається саме в інтронах. За рахунок цього інтрони, як гіперваріабельні ділянки генів, потенційно можуть бути маркерами генетичного поліморфізму, який можливо оцінити шляхом підбору відповідних праймерів до консервативних ділянок екзонів. Наразі однією з успішних ILP-маркерних систем є оцінка поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну, так званий метод TBP (Tubulin Based Polymorphism). TBP-маркери є універсальною системою, яка дозволяє провести генотипування та генетичну диференціацію різних видів, сортів та генотипів рослин, базуючись на знанні екзон-інтронної структури генів β-тубуліну. Проте ці маркери мають і недоліки, зокрема не завжди достатню чутливість, а також певні труднощі щодо інтерпретації отриманих результатів. Окрім β-тубуліну, для створення ДНК-маркерних систем можуть використовуватися гени й інших цитоскелетних білків. Наприклад, гени актину, які є генами із екзон-інтронною структурою. Поліморфізм довжини інтронів генів актину може бути використаним для генотипування та диференціювання різних генотипів рослин. Проте такі дослідження ще не проводили. Саме тому роботу А.С. Постовойтової «Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний інструмент внутрішньо- та міжвидової диференціації рослин», метою якої було обґрунтувати розробку методу

оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для подальшого його використання у генетичній диференціації та генотипуванні рослин, слід визнати важливою та актуальною як з практичного боку, так і для подальшої розробки фундаментальних основ сучасної молекулярної генетики рослин.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із анотації українською та англійською мовами, списку опублікованих праць за темою дисертації, списку умовних скорочень, вступу, чотирьох розділів, узагальнення, висновків, списку використаних джерел та додатку, в якому наведено список публікацій здобувача. Текст зі списком використаної літератури (245 джерел), ілюстраціями (26 рисунків, 13 таблиць) викладено на 185 сторінках машинопису.

У вступі коротко обґрунтовується актуальність теми дослідження; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами; наведено мету і завдання дослідження; коротко перераховані методи дослідження; викладено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації та публікації, а також дані про структуру і об'єм дисертації. Наприкінці вступу висловлено подяки науковому керівникові, колегам, рідним та близьким дисертанта.

Розділ 1 «Огляд літератури» складається з двох коротких підрозділів, в яких проаналізовано результати досліджень інших авторів та наявні у літературі відомості про типи ДНК-маркерів та про ДНК-маркери як предмет біологічних досліджень; в загальних рисах охарактеризовано роль молекулярних маркерів у генетичних дослідженнях рослин; проаналізовано організацію генів актину та їхніх інтронів у рослин. У цілому огляд літератури є аналітичним, містить науково обґрунтовані узагальнення. У ньому достатньо висвітлено останні експериментальні дані з питань, що мають відношення до теми дисертації. Огляд свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в даній галузі досліджень, уміння чітко викласти стан та перспективи досліджень, а також коротко і зрозуміло обґрунтувати

актуальність, роль та значення власного дослідження у контексті накопичених світовою наукою знань та сучасних викликів.

Розділ 2 "Матеріали і методи досліджень" складається з семи коротких підрозділів. У першому описано особливості проведення автором біоінформатичного пошуку та аналізу структури генів актину в геномах п'яти досліджених видів рослин. У другому з них коротко, чітко та ясно охарактеризовано використаний в експериментальній роботі рослинний матеріал - представників однодольних та дводольних рослин з родин *Poaceae, Linaceae, Solanaceae* та *Brassicaceae.* Серед них були егілопс двохдюймовий, сорти рису посівного, пшениці м'якої та ячменю, різні види льону – льон вузьколистий (*Linum angustifolium* Huds.), льон дворічний (*L. bienne* Mill.), різні сорти льону-довгунця, сорти томатів та картоплі, міжвидові гібриди ріпаку олійного з низкою дикорослих видів родини *Brassicaceae*, а також їхні батьківські форми. Далі описано застосовані методи виділення рослинної ДНК, умови проведення ПЛР та використані праймери, умови електрофоретичного розділення фрагментів ДНК в поліакриламідному гелі, а також особливості візуалізації фрагментів ДНК в поліакриламідному гелі та застосовані методи статистичної обробки отриманих даних. Аналіз наведених матеріалів свідчить, що автор використала сучасні методи, за допомогою яких отримано коректні результати, адекватні стосовно поставлених задач дослідження.

Розділ 3 «Біоінформатичний пошук та аналіз генів актину вищих рослин» складається з чотирьох підрозділів. У короткому підрозділі 3.1 «Біоінформатичний пошук генів актину в геномах представників однодольних та дводольних рослин» наведено результати пошуку, в результаті якого автор відібрала гени актину п'яти видів рослин, а саме *A. thaliana, O. sativa, L. usitatissimum, S. tuberosum, S. lycopersicum*, які вона в подальшому використала для аналізу та дизайну праймерів з метою оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину вибраних для дослідів рослин.

У невеликих за об'ємом підрозділах 3.2 і 3.3 наведено результати вивчення особливостей екзон-інтронної структури генів актину та ступеня ідентичності між кодувальними ділянками цих генів у п'яти вибраних видів рослин та їхніми трансльованими амінокислотними послідовностями. Показано, що у переважній більшості випадків вивчені гени мають 4 екзони та 3 інтрони. Проте для різних видів описано наявність у складі деяких генів актину по 3 екзони та 2 інтрони, по 5 екзонів та 4 інтрони тощо. Довжина екзонів складала 57 - 1077 п.н., а інтронів – 68-860 п.н. Встановлено сталість складу екзонів, які переважно мали однакову довжину: 60 п.н. (I-й екзон), 394 п.н. (II-й екзон), 614 п.н. (III-й екзон), 66 п.н. (IV-й екзон). Інтрони мають різну кількість нуклеотидів, яка варіює в широких межах. Ступінь ідентичності кодувальних ділянок генів та амінокислотних послідовностей, що транслюються з них, складала в середньому 77% та 92% відповідно. Отримані результати, на думку автора, підтверджують доцільність використання генів актину у подальшій розробці ДНК-маркерної системи для оцінки поліморфізму довжини інтронів.

У підрозділі 3.4 «Дизайн праймерів для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину у вищих рослин» наведено результати експериментів, які свідчать, що автор підібрала три пари ген-специфічних праймерів до консервативних ділянок екзонів генів актину *L. usitatissimum* таким чином, щоб отримувати багатократну ампліфікацію II-го інтрону. Побудувала та синтезувала універсальні вироджені праймери ActIn, які дозволили комплексно оцінювати поліморфізм довжини інтронів генів актину у різних видів рослин одночасно. Провела множинне вирівнювання кодувальних ділянок відібраних генів актину *A. thaliana, O. sativa, L. usitatissimum, S. tuberosum* та *S. lycopersicum.*

Розділ 4 «Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у різних видів вищих рослин» є, на мою думку, визначальним у дисертаційному дослідження. Тут спочатку наведено результати вивчення поліморфізму довжини інтронів у представників родини злакових. Зокрема, було проведено

міжсортовий аналіз поліморфізму довжини інтронів у таких культур як пшениця, ячмінь та рис. Генотиповано 7 сортів ярої пшениці та отримано специфічні ДНК-профілі з ампліконами інтронів генів актину, що розподілялися в діапазоні довжин від 600 п.н. до 1500 п.н. Виявлено, що більшість утворених фрагментів інтронів є мономорфними, однак при цьому зафіксована поява трьох зон ампліконів, де встановлено поліморфізм. Для даних сортів пшениці характерним є утворення чотирьох різних алельних фенотипів, а у сортів пшениці 'X 12' та 'Selkirk' виявлено унікальні алельні фенотипи. Значення *PIC* для сортів пшениці склало 0,69, що свідчить про досить високий рівень поліморфізму в проаналізованій вибірці. Для проаналізованої вибірки сортів ячменю (вивчено 29 сортів) характерною була поява двох різних алельних фенотипів, а *PIC* дорівнює 0,43, що свідчить про середній рівень поліморфізму у проаналізованій вибірці. А серед досліджених 6 сортів рису посівного автор не виявила поліморфних фрагментів інтронів, що, на її думку, свідчить про їх генетичну гомогенність за цим типом ДНК-маркерів. На основі отриманих результатів автор обгрунтовано підсумовує, що розроблена ДНК-маркерна система для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволила генотипувати сорти рису, пшениці та ячменю і в подальшому може бути використана для проведення генотипування інших злаків. Далі наведено результати аналізу поліморфізму довжини інтронів у представників природних популяцій егілопсу (*Ae. biuncialis*), який є важливим джерелом корисних ознак для покращення сортів пшениці. Виявлено 14 унікальних алельних фенотипів, а розраховане значення *PIC* становить 0,97, що характеризує дану популяційну вибірку *Ae. biuncialis* як високогетерогенну. Зроблено висновок, що оцінка поліморфізму довжини інтронів генів актину дозволяє чітко генотипувати та диференціювати *Ae. biuncialis* на міжпопуляційному рівні.

У підрозділі 4.2 «Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у сортів льону-довгунця з використанням ген-специфічних праймерів»

спочатку представлено результати аналізу поліморфізму довжини інтронів генів актину льону Lus10021057 та Lus10029286 у 10 сортів льону-довгунця зарубіжної та вітчизняної селекції, проведеного з використанням ген-специфічних ПЛР-праймерів Lus-F та Lus-R. Продемонстровано утворення двох смуг ампліконів інтронів. Верхня смуга ампліконів містить фрагменти однакової довжини 913 п.н. У межах нижньої поліморфної смуги фрагментів містяться амплікони інтронів гена актину Lus10021057, довжини яких складають 820 п.н. та 780 п.н. Значення *PIC* склало 0,48. Далі наведено результати оцінки поліморфізму довжини інтронів 16 сортів льону-довгунця української селекції з використанням трьох пар ген-специфічних праймерів до різних генів актину (Lus10021057, Lus10029286, Lus10040826, Lus10016259. Встановлено поліморфізм довжини інтронів цих генів льону-довгунця Lus10021057, Lus10029286 та Lus10016259. Таким чином, і результати аналізу зразків льону-довгунця різної селекції з використанням ген-специфічних ПЛР праймерів засвідчили придатність методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину для диференціації різних генотипів.

Далі наведено результати оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину з використанням вироджених праймерів у видів льону та сортів льону-довгунця української селекції та білоруських ландрас. Результати аналізу 28 сортів льону-довгунця української селекції та білоруських ландрас, а також двох видів льону – льону дворічного (*L. bienne*) та льону вузьколистого (*L. angustifolium*) – з використанням універсальних вироджених праймерів свідчать про утворення видоспецифічних ДНК-профілів, що містили мінімум 10 ампліконів інтронів, довжини яких варіювали в межах від 700 п.н. до 1200 п.н. Загалом, проаналізовані зразки льону-довгунця характеризувались наявністю поліморфних фрагментів інтронів в діапазоні довжин від 800 п. н. до 900 п. н., що дало можливість диференціювати їх між собою. З використанням розробленого методу проведено генотипування льону дворічного (*L. bienne*) та льону

вузьколистого (*L. angustifolium*). Авторові не вдалося встановити відмінності між ДНК-профілями *L. bienne* та *L. angustifolium* та продемонструвати їх ідентичність з ДНК-профілем льону-довгунця. У цілому отримані дані підтвердили високу генетичну спорідненість вивчених представників роду *Linum*.

Далі наведено результати вивчення сортів льону-довгунця української селекції. За використання специфічних праймерів до гена Lus10016259 у 9-ти сортів льону-довгунця було виявлено поліморфізм довжини інтронів, в той час як при використанні праймерів до гена Lus10040826 лише в одному сорті льону (Зоря 87) виявлено поліморфні амплікони інтронів актину. Переважна більшість сортів льону-довгунця (12 із 16 сортів) охарактеризовано як генетично неоднорідні за універсальними праймерами. Інформативнішими були саме універсальні праймери порівняно із специфічними праймерами до генів Lus10016259 та Lus10040826 льону. Автор обгрунтовано підсумовує, що розроблені ДНК-маркери для виявлення поліморфізму довжини інтронів можна розглядати як новий підхід для оцінки внутрішньосортового поліморфізму сортів льону-довгунця.

Завершується підрозділ 4.2 викладенням результатів оцінки ефективності ДНК-маркерів для виявлення поліморфізму довжини інтронів генів актину в порівнянні з SSR-маркерами та ТВР-методом. Автор провела мікросателітний аналіз внутрішньосортових вибірок 16 сортів льону-довгунця української селекції за двома SSR-локусами та порівняла з отриманими іншими авторами результатами внутрішньосортового ТВР-аналізу тих же самих зразків льону-довгунця. Раніше в результаті оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину було показано неоднорідність більшості сортів льону-довгунця (12 із 16 сортів). Продемонстровано генетичну гетерогенність більшості досліджених сортів за обома мікросателітними локусами (12 із 16 сортів), а за допомогою ТВР-методу було охарактеризовано 10 сортів льону-довгунця як генетично неоднорідні. Отримані результати з використанням трьох різних ДНК- маркерних систем

(оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину, SSR-маркерів та ТВР-методу) дозволили авторові підсумувати, що запропонована нею система для оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину характеризується аналогічною ефективністю порівняно з мікросателітними маркерами та вищою ефективністю у порівнянні з ТВР-маркерами.

Підрозділ 4.3 присвячено викладу результатів оцінки поліморфізму у представників родини *Solanaceae.* Спочатку наведено результати аналізу поліморфізму довжини інтронів у 4-х сортів картоплі. Виявлено 3 алельні фенотипи. Значення *PIC* (0,625) вказує на досить високий рівень поліморфізму у вивченій сортовій вибірці. Далі проаналізовано поліморфізм довжини інтронів у 12-ти сортів томату. Кожен із досліджених зразків ДНК містив не менше 7 ампліконів інтронів генів актину в діапазоні від 700 п.н. до 1500 п.н., а 11 із 12 проаналізованих сортів томату виявилися генетично мономорфними. У сорту 'Американський Синій' був виявлений амплікон довжиною 1351 п.н. та показана відсутність фрагменту гена актину довжиною 1486 п.н., що і вирізняє цей сорт з поміж інших. Загалом вивчена вибірка сортів томатів охарактеризована як низькополіморфна (*PIC*=0,15). Слід підкреслити, що автор отримала специфічні ДНК-профілі з інтронами генів актину сортів томату та картоплі, що значно відрізнялися на міжвидовому рівні, однак містили низку спільних фрагментів ДНК, що, на думку дослідниці, свідчить про (підтверджує) генетичну спорідненість та спільне філогенетичне походження цих видів.

Підрозділ 4.4 «Аналіз поліморфізму довжини інтронів генів актину у різних представників родини *Brasicaceae*» присвячено переважно ідентифікації міжвидових гібридів ріпаку з дикорослими видами шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину. Проведено генотипування кількох ліній ріпаку та дикорослих видів флори України (*E. cretaceum, D. tenuifolia* та *B. juncea*), а також їх міжвидових гібридів. Продемонстровано утворення специфічних ДНК-профілів проаналізованих зразків, які містили значну кількість фрагментів інтронів. Утворені ДНК-

профілі з інтронами *B. napus*, *E. cretaceum, D. tenuifolia* та *B. juncea* значно відрізнялись один від одного за кількістю та розподілом утворених ампліконів. ДНК-профілі міжвидових гібридів ріпаку поєднували в собі фрагменти інтронів обох батьківських форм одночасно, що дозволяє достовірно ідентифікувати як батьківські генотипи, так і генотипи міжвидових гібридів. Автор обгрунтовано вважає, що метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину може повноцінно використовуватись для молекулярно-генетичного аналізу генотипів та дослідження походження видів і міжвидових гібридів рослин.

У заключному розділі «Узагальнення» коротко, з елементами обговорення автор підсумувала логіку проведення власних експериментів та головні отримані нею результати. Критичний аналіз отриманих результатів дозволив їй обгрунтовано підсумувати «…метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів актину зарекомендував себе як новий, ефективний та надійний підхід для проведення молекулярно-генетичного аналізу, генотипування, ДНК-профілювання та диференціації вищих рослин на різних рівнях організації: видовому, популяційному, сортовому та внутрішньосортовому. В подальшому підхід може бути використаний в популяційно-генетичних та селекційних дослідженнях, для молекулярної характеристики будь-яких вибірок вищих рослин та при визначенні чистоти сортового матеріалу господарськоцінних культур». Саме у цих словах, на мою думку, і полягає квінтесенція рецензованої кандидатської дисертації.

У цілому експериментальний матеріал викладено доступною мовою, чітко, лаконічно і логічно, основні результати достатньо підтверджено оригінальними та якісними ілюстраціями, зокрема, чіткими фотографіями, графіками та схемами. У процесі викладу авторка ретельно і критично аналізує власні результати, робить у процесі опису коректні заключення та підсумки. Обговорення та узагальнення проведено чітко, на високому професійному рівні, із залученням літературних даних по всьому тексту дисертації, воно свідчить про те, що авторка своїм дослідженням зробила

істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі молекулярної генетики рослин, а також у розробку генетичних основ селекції рослин.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно випливають з експериментальних даних. Вони викладені у цілому достатньо чітко, лаконічно та ясно.

Зауважень щодо наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. Хочу звернути увагу лише на наступні дискусійні моменти і упущення.

Зокрема, по всьому тексту стрічаються не виправлені граматичні помилки й стилістичні огріхи. На мою думку, автор застосовує неправильний, внаслідок буквального перекладу з російської мови «отжиг праймеров», термін «відпал праймерів». Правильним буде «гібридизація праймерів». Також правильним українською буде «сиквенування» (від «сиквенс») на відміну від «секвенування», що його застосовує автор. Дещо «коструба́то» звучить «Метою роботи було обгрунтувати розробку методу..», краще було б «…розробити метод…». Краще писати не «кодуючі ділянки генів» а «кодувальні ділянки», треба - «гени відбирали», а не «відбиралися», тощо

Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною і величезною кількістю одержаних експериментальних даних, достовірністю та новизною висновків. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота «Поліморфізм довжини інтронів генів актину як ефективний інструмент внутрішньо- та міжвидової диференціації рослин» заслуговує позитивної оцінки. Вона відповідає сучасному рівню біологічних, зокрема – молекулярно-генетичних, досліджень і вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №657 «Порядок присудження наукових ступенів і

присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор — Анастасія Сергіївна Постовойтова заслуговує на присудження їй пошукового наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22– молекулярна генетика.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді 14 праць, з них - 8 статей у фахових виданнях і 6 тез та матеріалів доповідей на наукових конференціях.

Зав. відділом генетики клітинних популяцій
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор біол. наук, професор В.А. Кунах

Підпис Кунах В.А.
посвідчується