

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за получаване на образователната и научна степен “ДОКТОР”, научна специалност 01.06.06 – ГЕНЕТИКА

Автор: Георги Николаев Бончев

Тема: “Молекулярно-генетична характеристика на мутантни форми тип *sphaerococcum* при *Triticum aestivum* L. и *Triticale* с помощта на транспозони”

Рецензент: доц. д-р Светлана Ланджева

Дисертационният труд на асистент Георги Бончев изследва приложимостта на молекулярни маркерни системи, базирани на подвижни генетични елементи (ПГЕ), за характеризиране на индуцирано генетично разнообразие при пшеница и тритикале. ПГЕ (ДНК транспозони и ретротранспозони) са ценен източник на маркери за изследване генетичното разнообразие при растенията на ниво ДНК. Участието на ПГЕ в хромозомната реконструкция е важна тема за изясняване еволюцията на растителния геном. Същевременно, съвременното разбиране за ПГЕ като епигенетични регулатори на генома ги определя като добър инструмент за проучване на геномната стабилност и генната експресия в отговор на биотичен и абиотичен стрес. Значимостта на информацията за генетичното разнообразие при растителните ресурси, както и необходимостта от изясняване на адаптивните и еволюционни механизми при растенията ми дават основание да определя темата на дисертацията като актуална и перспективна.

Дисертационният труд е написан на 117 страници, от които 95 страници основен текст, 20 страници библиографска справка и 2 страници справка за публикации и участия в научни проекти, форуми и специализации във връзка с темата. Трудът е добре структуриран, като са спазени препоръчителните съотношения между разделите. Запознаването със състоянието на проблема, описанието на експерименталния материал и методите и излагането на основните резултати са илюстрирани с 22 фигури и 6 таблици.

Кратко въведение насочва към обекта и инструмента на изследванията в дисертацията. Литературният обзор, базиран на 258 източника, е изготвен целенасочено и изчерпателно и показва добро познаване на проблематиката. В този раздел е дадена

класификация на ПГЕ и характеристика на основни представители. Разгледана е ролята на различни стресови фактори за активиране на ПГЕ и повишаване на геномната вариабилност, както и влиянието им върху епигенетичната регулация на транспозонната активност. Направен е преглед на основните геномни промени, които се индуцират от ПГЕ. Разгледана е приложимостта на ПГЕ като молекулни маркери като накратко са описани няколко маркерни системи, базирани на транспозони. Накрая, сравнително пестеливо са представени сферококумните мутантни форми при обикновената пшеница и Triticale, индуцирани чрез химически мутагенез, като моделен обект за изследване активността на ПГЕ. Прави впечатление диспропорцията между описанието на моделната система и на инструмента за нейното изследване.

На базата на направения анализ в този раздел е изведена основната насоченост на дисертационната теза – характеризират се на три вида ПГЕ в структурно и функционално отношение с оглед изясняване ролята им за възникване на сферококуидни мутации при пшеница и тритикале и за определяне потенциала им като генетични маркери. Изследователската цел е формулирана като повторение на заглавието с уточняване на използваните ПГЕ. Поставени са четири задачи, изпълнението на които води до установяване потенциала на ПГЕ за характеризират се на растителния геном и неговата динамика.

Раздел 'Материал и Методи' представя в 20 страници експерименталния материал и широкия набор от методи за неговото анализиране. Използваният растителен материал включва разнообразие от мутантни форми при пшеница и тритикале, създадено по-рано чрез третиране с химически мутаген. Представени са използваните олигонуклеотидни праймери, векторите за клониране на ДНК фрагменти и сондите за флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH). Избраният методически подход е адекватен на поставените задачи. Отлично впечатление прави богатството на използваните молекулярно-генетични методи, а именно методи за изолиране на ДНК и РНК, ДНК рестрикционен анализ, различни PCR-базирани техники (SSAP, REMAP, IRAP, RT-PCR), методи за клониране, трансформация, пренос, белязане и хибридизация; молекулярно-цитогенетичен метод (FISH); кластерен анализ и монозомен анализ за хромозомно локализиране на гени. Приложен е и подходящ статистически анализ.

В раздел 'Резултати и Дискусия' на 34 страници са представени основните резултати като изложението следва реда, в който са формулирани изследователските задачи. Илюстративният материал включва 14 фигури и 4 таблици с добро качество и

информативност. Приложен е монозомен анализ в опит за локализиране на гените, обуславящи сферококоидния ефект. При мутантните линии са идентифицирани ДНК последователности, хомоложни на царевичния Ac транспозонен елемент, характеризирани е тяхната вариабилност и профила на метилиране в сравнение с контролите. Показано е, че Ac-подобни последователности могат да се идентифицират както чрез PCR-базиран метод, така и чрез FISH. Установена е степента на полиморфизъм при мутантните форми пшеница и тритикале в близост до сферококоидните гени с използване на маркери, базирани на два широко разпространени ретротранспозона (BARE-1 и WIS 2-1A). Идентифицирани са локусите на инсерция на BARE-1 и е демонстрирано модулиране на транскрипционния профил при WIS 2-1A при мутантните форми пшеница и тритикале. Това, от една страна, предполага динамика на двата ретротранспозона под действие на използвания химически мутаген и, от друга, допуска участие на ПГЕ в обуславяне на сферококоидните мутации. Демонстрирана е приложимостта на ретротранспозон-базираните маркери за анализ на генетичното разнообразие. Целият раздел 'Резултати и Дискусия' създава впечатление за логически добре замислено изследване. Получени са достатъчно доказателства в полза на изходната хипотеза, а именно че сферококоидните мутации могат да възникнат вследствие на активиране на ПГЕ под действието на химически мутаген. Във всеки подраздел представените резултати са придружени от коментар, при което личи умението на докторанта да анализира и интерпретира данните, да проявява критичен подход и да поставя нови въпроси. На места недостатък на дискуссионната част е ограниченото съпоставяне на резултатите от настоящата работа с такива в литературата.

Дисертацията завършва с кратко заключение, в което докторантът представя основните резултати в тяхната цялост и взаимовръзка, а така също нови изследователски проблеми. Смятам, че ценността на една научна разработка се състои и в това да формулира въпроси. В това отношение трудът на Г. Бончев е значим и има перспективи за продължаване, за да даде отговор на нововъзникналите въпроси.

Изводите (9 на брой) обобщават получените резултати и съответстват на поставените задачи. Съгласна съм с 8 от тях. Бих приела извод №1 само след добре аргументирани отговори от страна на докторанта на зададени по-долу въпроси.

Подкрепям справката на докторанта за приносите в дисертационния труд. Принос №2 е методически и се отнася до иновативно прилагане на молекулярни маркерни системи, базирани на ретротранспозони, за анализ на сферококумни мутанти

при пшеница и тритикале. Приноси №№1, 3 и 4 са с оригинален характер по отношение на използваните мутантни генотипи и се отнасят до натрупване на нови знания за ПГЕ и тяхното значение за характеризиране на сферококумни мутантни форми.

Авторефератът в обем от 30 страници е структуриран подобно на дисертационния труд, отразява неговата същина и отговаря на изискванията за такъв тип научни трудове.

Дисертацията е написана в добър научен стил. Спецификата на проблематиката изисква използването на голям брой термини на английски език. Някои от тях са добили гражданственост в българската научна литература, други са използвани със съответните абrevиатури, за които е приложен списък. В стилово отношение недобро впечатление прави единствено честата употреба на чуждици, за които може да се намери български еквивалент и към които неясно защо е добавено характерно за езика ни окончание (напр. дизайнван, детектиран, фланкиращ). Забелязва се също така непоследователност при означаване на сферококоидните мутантни гени, както и неправилна употреба на глагола 'корелирам' и словосъчетанието 'корелативна връзка'. С термина 'корелация' се означава определен клас статистически взаимоотношения между две случайни величини, а в случая не е правен корелационен анализ, затова препоръчително е в бъдеще да се избягва подобен род неточност в научен текст.

Изследванията по дисертационната тема са извършени в Института по генетика-БАН, в рамките на пет научни проекта, и частично в Университета Съсекс, Великобритания, по време на специализация по програма, финансирана от фондация 'Мария Кюри'. Част от резултатите, представени в труда, са отразени в две публикации – една в международно списание с импакт фактор (ИФ-2009 0.915), в която докторантът е първи автор, и една в българско списание без ИФ в годината на публикуване, в която докторантът е втори автор. Резултати са представени също така като доклади и постери на научни форуми в чужбина (3) и у нас (3), като докторантът е първи автор в три от петте съвместни работи; има и самостоятелен доклад на международен форум. Това ми дава основание да определя неговия дял при разработване на дисертацията като съществен.

Имам забележка по отношение на заглавието и формулирането на целта на труда. Считаю, че построяването на литературния обзор и представянето на резултатите в определена логическа последователност предполагат по-различно заглавие на труда и

друга формулировка на целта, фокусирани по-скоро върху възможностите за различни приложения на ПГЕ, отколкото върху характеризирането на мутантните форми.

Имам и следните въпроси към докторанта:

1. При монозомен анализ основанието за локализиране на интересуващ ни ген в дадена хромозома при доминантно унаследяване на признака е следното: в F_2 на монозомните F_1 -хбриди при критичната кръстоска да се получи значително отклонение от очакваното разпадане в съотношение 3:1 (доминантни : рецесивни), като рецесивен фенотип се проявява при не повече от 1/10 от потомството (в нулизомиците). Какво дава основание на докторанта при получено разпадане 1:1 да направи извод №1?

2. Правен ли е тест за алелизъм при двете използвани мутантни форми пшеница за да се докаже или отхвърли алелността на носените от тях мутации? В раздел 'Материал и Методи' е посочено, че и двете мутантни линии пшеница (613 и 6512) са кръстосани с всички монозомни линии. Има ли резултати от разпадането в F_2 при кръстоските '613 × моно 3А' и '6512 × моно 3В' и какви са те?

3. В заключението е посочено, че картирането и характеризирането на нови ретротранспозонни маркери в близост до сферококоидните гени може да намери приложение за целите на маркерната селекция при житните. В какви случаи представлява интерес селекцията по тези гени?

Заклучение

Представеният дисертационен труд на ас. Г. Бончев е добре проведено научно изследване върху приложимостта на ПГЕ за изследване на генната експресия и генетичното разнообразие. Формулираната работна хипотеза е атакувана с адекватен комплекс от методи и е доказана с резултатите от изследването. Авторът показва задълбочени познания по специалността, отлична методическа подготовка, а тълкуването на резултатите свидетелства за аналитично и критично мислене. На базата на изложените в рецензията положителни качества на дисертационния труд и неговото съответствие с нормативните изисквания препоръчвам на почитаемите членове на Научното Жури да присъдят на ас. Георги Николаев Бончев образователната и научна степен ДОКТОР (шифър 01.06.06).

Дата: 10.06.2011

София

Рецензент:

Доц. д-р Светлана Ланджева