

РЕЦЕНЗИЯ

върху дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен “Доктор” по специалност Генетика, шифър 01.06.06

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

Автор на дисертационния труд: асистент Георги Николаев Бончев – Секция Молекулярна генетика, Институт по физиология на растенията и генетика, Българска академия на науките

Рецензент: доцент д-р Анелия Венева Янчева – АгроБиоИнститут, София

През последните години използването на колекции от мутантни форми е нов подход при изучаване регулацията на транспозонната активност, влиянието им върху генната експресия, както и откриването и клонирането на гени, проучване на тяхната функция и взаимодействието им с други гени. Данните относно разпространението, динамиката и функционирането на подвижните генетични елементи в генома на житни и в частност на пшеницата са оскъдни и изискват задълбочени изследвания с цел използването им като молекулярни маркери в съвременната селекция.

В този аспект, актуалността на разработения дисертационен труд не може да бъде подложена на съмнение още повече, че в наши дни се натрупват резултати, отразяващи намаляване на генетичното разнообразие при пшеница. По-задълбоченото охарактеризиране на мутантни форми тип *sphaerococcum* при хексаплоидните *Triticum aestivum* и *Triticale*, получени чрез третиране с етилметан сулфонат, е от особен интерес, както за фундаментални и приложни изследвания, така и като форми за инициране на бъдещи селекционни програми. Този дисертационен труд дава началото на по-пълно цитогенетично и молекулярно-генетично охарактеризиране на мутантни форми тип *sphaerococcum*, като основен интерес представлява връзката между стрес, функционална и структурна динамика на подвижните генетични елементи и тяхното влияние върху експресията на мутантния фенотип.

Дисертационният труд е написан на 117 страници и включва 22 фигури и 6 таблици. Използвани са 258 литературни източници на латиница. Той е изграден по класическа

схема: Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и Методи, Резултати и Дискусия, Заключение, Изводи, Приноси, Литература.

Във въведението докторантът отразява основните резултати в дисертационния труд, като дава представа за използваните методи и растителен материал. Литературният обзор обхваща 26 страници, и засяга основните проблеми, свързани с темата, които са разпределени в няколко раздела: Подвижни генетични елементи – дава се определение за транспозони, тяхното откриване, разпространението им в генома на еукариоти и прокариоти, процентно съотношение, значението за еволюцията на растителните видове, както и значението им за способстването пластичността на генома при адаптирането на видовете към неблагоприятните условия на околната среда. Отражена е класификацията на транспозоните и структурната им характеристика, като са описани клас I транспозоните или ретротранспозоните, тяхната специфика в генома на житни, характеризираща се с висока копийност, силно хетерогенни популации и хромозомно разпространение. Акцентирано е върху разпространението на ретротранспозоните BARE-1 и WIS2-1A в генома на житни, като е отчетена липсата на пряка зависимост между копийност, вид на генома и ниво на пloidност. При клас II транспозоните или (ДНК транспозоните) е представена структурата и класификацията им, както и основната Ac/Ds транспозонна система. В раздела Стрес и експресия на транспозоните е обобщено становището, че външните и вътрешни стресови фактори предизвикват физиологичен и морфологичен отговор на организма и промени в геномната структура и епигенетична регулация както на гените, така и на подвижните генетични елементи. Подчертана е основната роля на метилирането на ДНК върху транспозонната активност, както и стресовите фактори, които влияят върху епигенетичната регулация. В раздел 5 на литературния обзор е отчетено влиянието на транспозоните върху структурата, динамиката и еволюцията на еукариотните геноми. Проучено е приложението на транспозоните за инсерционен мутагенез и използването на този подход за изолиране и клониране на гени. Акцентирано е върху използването на ретротранспозоните като молекулярни маркери, поради високата им копийност и способността им да се интегрират в различни геномни локуси, създавайки структурен и функционален инсерционен полиморфизъм. Описани са основните молекулярни маркерни системи основани на LTR ретротранспозоните, в частност базирани на BARE-1 и WIS2-1A, и приложението им при житни, за които има оскъдни данни. Последният раздел 7 от литературния обзор разглежда особеностите на генома на пшеницата – характеризиращ се с наличието на естествено съществуващи

sphaerosocsum тип форми, както и мутантни форми, получени в резултат на химичен мутагенез с етилметан сулфонат.

Въпреки, че има някои пропуски литературният обзор е изчерпателен, онагледен с 3 цветни фигури, а изборът на литературата е позволил на докторанта ясно да формулира целта на дисертационния труд. Логично поставените задачи дават насока за нейното реализиране.

В раздел „Материали и Методи” е представена използваната колекция от мутантни форми тип sphaerosocsum, получени след третиране с химичен мутаген етилметан сулфонат на контролните сортове хексаплоидна пшеница *Triticum aestivum* Садовска ранозрейка 2 и хексаплоидно *Triticale* МТ47 Armadillo. Мутантните форми тип sphaerosocsum са разделени в две групи в зависимост от проявлението на този фенотип:

а) с нестабилен фенотип вариращи изцяло или частично към дивия *aestivum* тип 613sph, 6512sph, 49L.

б) със стабилен сферококумен фенотип – 613sph homz., 6512sph homoz., 49compactum, 49L/13, 2Кх613, МТ 47sph.

Използвана е и спомагателната генетична система на *T. aestivum* – сорт Chinese spring от 21 монозомни линии.

В методологично отношение докторантът показва опит при използването на цитогенетични и молекулярни методи, като: изолиране на плазмидна ДНК, растителна ДНК и РНК, Садърн блот хибридизация, флуоресцентна *in situ* хибридизация, PCR, RT-PCR, молекулярно-генетични методи основани на ретротранспозони – SSAP, REMAP, IRAP.

Отразяването на резултатите следва реда на поставените експериментални задачи. Фигурите, илюстриращи получените резултати, са с добро качество и резолюция. Наличието на мутантни форми тип sphaerosocsum в *T. monococsum*, *T. durum*, 6X *Triticale* МТ47 притежаващи само А и В геномите, позволява на докторанта да допусне, че sphaerosocsum ефектът се обуславя от ген или гени извън D генома. С помощта на спомагателната монозомна серия на *Chinese spring*, в хода на експерименталната работа и на база на получените резултати, докторантът потвърждава допускането, че генът Sp3, обуславящ sphaerosocsum ефекта при мутантна форма 6512sph, е локализиран в 3А хромозома, а генът Sp2 при мутантна форма 613sph - локализиран в 3В хромозома.

Присъствието, структурната и функционална характеристика на Ac транспозон подобните последователности в генома на контролните и мутантни линии тип sphaerosocsum е доказано от докторанта с PCR базирани методи. PCR подходът с

праймерна двойка (ПР1 и ПР2) при всички изследвани форми, в това число и други видове житни, позволява намножаването само на един фрагмент с дължина 458 б.д. Секвенционният анализ показва, че изследваните форми притежават почти пълно сходство един спрямо друг, както и с проучените ВАС клонове на *T. urartu* и *T. turgidum*. При използването на праймерна двойка (ПР3 и ПР4) докторантът установява силно изразено специфично модулиране на геномно ниво на Ас транспозонната активност. Тази двойка праймери генерира много по-сложен амплификационен профил и голям брой фрагменти. Установен е отчетлив полиморфизъм, както между отделните мутантни форми, така и спрямо контролните линии. Въпреки това са изолирани, клонирани и секвенирани само два фрагмента при контролните форми Садовска ранозрийка 2 и 6X *Triticale* МТ47, които показват хомоложност със съществуващи клонове на *Aegelops speltoides* и *T. urartu*.

Хибридизационния профил на геномното разпространение на Ас-подобна последователност, специфична за пшеница, е изследван от докторанта при контролните форми Садовска ранозрейка 2, *Triticale* МТ47 както и царевица. Резултатите показват, че тази последователност липсва в царевичния геном и присъства в геномите на пшеница и тритикале, като при *Triticale* е с по-висока копияност, което се потвърждава и от експеримента, проведен от докторанта при изследване на метилационния профил. Идентифицирането на Ас хомоложни последователности в мутантните форми пшеница - 613sph и 6512sph чрез флуоресцентна *in situ* хибридизация, позволяват на докторанта да установи, че тези две форми притежават различен профил по отношение на разпространението и активността на Ас подобните елементи.

Генетичният полиморфизъм при сферукокумните мутантни форми пшеница и *Triticale* МТ47 е оценен от докторанта чрез прилагане на прецизните молекулярни маркерни системи SSAP (Секвенционно специфичен амплификационен полиморфизъм), IRAP (междутранспозонов амплификационен полиморфизъм), REMAP (ретротранспозонов-микросателитен амплификационен полиморфизъм), базиран на транспозоните BARE1 и WIS2-1A. SSAP анализите на контролните и мутантни линии показват по-висока степен на полиморфизъм при *Triticale* в сравнение с пшеничните форми. Установени са нови BARE1/WIS2-1A инсерции в глутениновия и гама-глиадиновия гени, както и инсерции в други транспозонни последователности. По отношение на приложените IRAP и REMAP методи (с единичен праймер за BARE1) при мутантни и контролни форми на *Triticale* са получени полиморфни фрагменти с различна дължина, които са определени като ретротранспозон-микросателитни

маркери. Отчетеният полиморфизъм, засягащ микросателитни локуси в близост до сферококумните гени S1 и S2, позволяват на докторанта да направи допускането, че ретротранспозоните BARE1/WIS2-1A участват в рекомбинационни събития, засягащи S1 и S2 гените и вероятно са свързани с мутация тип сферококум.

С помощта на проведените анализи, базирани на IRAP при пшенични мутантни форми, докторантът установява полиморфни ДНК фрагменти, сегрегирани в отделните групи мутантни форми. ДНК фрагменти с дължина 1400, 850 и 750 бд. са специфични за мутантната група 49L и 2Kx613. Профилът на мутантната група 613 е полиморфен по отношение на контролната форма Садовска ранозрейка 2. Отчетени са разлики в мутантната група 6512 както между тях, така и с контролната форма.

Степента на генетично сходство между сферококумните форми пшеница и *Triticale* е представена от докторанта с помощта на дендрограма, построена на базата на ДНК-профила, генериран от IRAP метода. Оформени са три основни групи. Към група I са отнесени контролните форми Садовска ранозрейка 2 и оригиналните мутантни форми 613sph и 6512sph и техните сегрегати 613aest и 6512aest. Втората основна група включва мутантните форми, деривати на оригиналните 613sph и 6512sph, получени след анализиращо кръстосване с контролата *T. aestivum*: 49comp, 49L/13, 2Kx613spelta, 2Kx613comp, 49Lsph, 49Laest. В III група логично са обособени представителите на *Triticale* MT47 (контролна и мутантна форма).

За характеризиране експресията на подвижните генетични елементи, която е от съществено значение за изучаване на механизма на индукция и влиянието на транспозицията върху геномната структура и еволюция, докторантът проследява транскрипционния профил на ретротранспозона WIS2-1A в контролните и мутантни форми тип сферококум. Сравнителният PCR анализ на геномна и копи ДНК за три изследвани амликони 5'LTR (дълъг краен повтор), INT (интеграза), RT (обратна транскриптаза) отчита различни профили, които се дължат на различия в копийността им в изследваните геноми и на областно-специфични структурни характеристики или наличие на дефектни, копия получени в процеса на транспозиция. Отчетено е повишение на транскрипцията на ретротранспозона при оригиналните мутантни форми 613sph и 6512sph в сравнение с контролата, изразено по-силно при 6512sph, което е в корелация с получените резултати от IRAP, както и понижаване на транскрипционната активност в ревертантните форми тип *aestivum* (613aest 6512aest) и деривативните форми (49L/13, 2Kx613comp, 49comp).

Като резултат от експерименталната работа приемам направените изводи. Приносите са с оригинален характер и смятам, че точно и ясно отразяват получените резултати. От посочените приноси искам да открия втори и трети – приложение на молекулярни маркерни системи за анализ на мутантно разнообразие и генотипиране на сферококумни форми пшеница. Картирането и характеризирането на нови ретротранспозонни маркери в областта на сферококумните гени може да намери приложение за тяхното изолиране и за бъдещо прилагане на маркерна селекция при житни.

Имам и някои препоръки и забележки по представения дисертационен труд, които ни най-малко не омаловажават стойността и достойнствата му и не повлияват на цялостната ми положителна оценка.

1. Амплификационният профил на Ас хомоложни ДНК-последователности при контролни и мутантни форми на *T. aestivum* и *Triticale*, генерирани с ПР3 и ПР4, дава много полиморфни фрагменти особено при изследваните мутантни форми, а са секвенирани само 2 фрагмента от контролните форми.

2. Изборът на еднакъв BARE1/WIS2-1A 5'LTR праймер насочен навън и за двата ретротранспозона води до по-ограничен брой полиморфни фрагменти. При избор на праймер от по-вътрешен участък на LTR областта от ретротранспозоните или различни праймери за двата ретротранспозона биха се получили различни и много вероятно по-информативни амплификационни профили. Това се отнася и до използването на единичен ретротранспозонен праймер при IRAP и REMAP анализите, което ограничава намножаването на LTR последователността само в една ориентация. Трябва да отбележа обаче, че докторантът коментира тези си пропуски, което предполага едно бъдещо по-детайлно проучване на сферококумните форми и техните контроли.

3. Дискусионният момент в раздел Резултати и обсъждане на моменти отсъства, но това най-вероятно се дължи на недостатъчния брой или липса на изследвания върху динамиката на ретротранспозоните в мутантни колекции при житни.

4. Направени са и някои технически и правописни грешки на стр. 13, 21, 27, 30, 54.

Част от резултатите по дисертационния труд са отразени в две публикации с импакт фактор, едната в списание *Central European Journal of Biology*, а другата в *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, където докторантът е първи и втори автор. Представен е списък от участия в научни форуми, специализации и проекти свързани с темата на дисертацията. Авторефератът отразява обективно получените резултати от

експерименталната работа и приносите на дисертационния труд и е изготвен в съответствие с общоприетите изисквания. Всички необходими документи са коректно попълнени.

Заключение:

Дисертационният труд е изцяло дело на докторанта. Въз основа на обема на извършената експериментална работа и получените резултати, които са основа за бъдещи детайлни проучвания на ретротранспозонните маркерни системи за анализ на мутантния тип *srhaegocossim* при пшеница и *Triticale* си позволявам да препоръчам на уважаемото жури да присъди на асистент Георги Николаев Бончев образователната и научна степен “Доктор” по научна специалност Генетика, шифър 01.06.06.

София 10.06.2011

Рецензент:

/доцент д-р Анелия Янчева/