

## ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу **ХАБЛАКА Сергія Григоровича**  
**«ГЕНЕТИЧНИЙ КОНТРОЛЬ РОЗВИТКУ КОРЕНЕВОЇ СИСТЕМИ**  
**У *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH»,**

представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук  
зі спеціальності 03.00.15 – генетика

На межі тисячоліть відбулися дві знакові події, що багато в чому визначають сучасний розвиток експериментальної біології рослин – секвенування геному вищої рослини *Arabidopsis thaliana* (L.) і формування уявлень про рецепцію і трансдукцію зовнішніх і внутрішніх, у т.ч. гормональних, сигналів у рослинній клітині. Це створило нові можливості для дослідження регуляції основних функцій рослинного організму, у т.ч. морфогенезу.

В рамках міжнародного проекту «*Arabidopsis* Genome Initiative» та ряду інших досліджень були ідентифіковані гени, що контролюють морфогенез листка, генеративних органів, отримано нову інформацію стосовно механізмів ініціювання розвитку кореневої системи (Dubrovsky et al., 2001; 2017; Parizot et al., 2008; 2017). Проте в цілому питання генетики морфогенезу кореневої системи рослин, навіть для модельного об'єкта *A. Thaliana*, досліджені недостатньо. Актуальним залишається визначення генетично детермінованих ознак кореня, які є важливими для продуктивності і стійкості рослин. Адже успіх селекційної зміни архітектури кореневої системи залежить від конкретної ознаки і характеру її успадкування. Стратегії дослідження розвитку кореневої системи включають методи прямої і зворотної генетики, використання мутантів, у першу чергу *A. thaliana*. Саме завдяки наявності мутантів з порушеним гормональним контролем розвитку кореня можна отримати важливу інформацію про механізми регуляції меристематичної активності і формування архітектури кореня. Результати

досліджень генетичного контролю формування і функціонування кореневої системи, отримані на модельному об'єкті, можуть бути використані для розробки селекційних прийомів удосконалення культурних рослин.

Зважаючи на це, актуальність дисертаційного дослідження С.Г. Хаблака, метою якого було з'ясування механізмів генетичного контролю морфогенезу кореневої системи *A. thaliana*, сумнівів не викликає.

Робота виконувалася у рамках тематичного плану Уманського національного університету садівництва на 2011-2017 рр. (номер державної реєстрації 0116U003207).

Сформульовані завдання в цілому адекватні поставленій меті. Ними, зокрема, передбачалося дослідження ролі генів *SHR1*, *SCR1* та *WOL1*, що регулюють функціонування апікальної меристеми кореня, в утворенні кореневої системи; особливостей успадковування ознак кореневої системи при взаємодії генів *SHR1*, *GPA1* і *COB1*; вивчення взаємодії генів та фітогормональних чинників, що контролюють розвиток кореневих волосків; визначення ролі домінантних мутацій генів *ETR1* та *ETR2* у виникненні гетерозису; дослідження чутливості мутантних ліній зі зміненою будовою кореневої системи до умов мінерального живлення.

Дисертаційна робота написана українською мовою і викладена на 332 сторінках. Вона має структуру, що відповідає чинним вимогам, і складається зі вступу, семи розділів (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, п'яти експериментальних розділів), висновків, списку використаної літератури і додатків.

Огляд літератури в цілому відображає сучасний стан досліджень генетичного контролю розвитку кореневої системи *A. thaliana*. У першому його підрозділі дається загальна характеристика арабідопсису як модельного об'єкта для генетичних і молекулярно-біологічних досліджень. Автор, зокрема, відзначає, що у Німеччині існує спеціальна дослідна програма «Арабідопсис як модель для генетичного аналізу розвитку рослин». У Великобританії, США, Канаді виділяються сотні грантів для вивчення

біології арабідопсису. В Україні, дослідження з використанням цього об'єкта поки ще не набули достатнього розвитку. Проте арабідопсис використовується у дослідженнях установ системи НАН України і деяких вишах. У Луганському національному аграрному університеті створений і поповнюється єдиний в Україні Луганський центр зразків насіння арабідопсису (Lugansk Arabidopsis Seed Stock Centre (LASSC)).

Наступний підрозділ огляду присвячено генетиці морфогенезу кореневої системи *A. thaliana*. Дисертант аналізує відомості про вплив конкретних мутацій на морфологію кореневої системи. Зокрема, відзначається, що оскільки дотепер не проводилися дослідження впливу рецесивних алелів генів *SHR1*, *SCR1* і *WOL1* на будову кореневої системи арабідопсису в цілому, то актуальним є вивчення її морфології у рослин відповідних мутантних ліній. Значну увагу автор приділяє гормональній регуляції морфогенезу кореня. Наводиться характеристика мутацій за ауксиновим сигналіном та їх вплив на стан окремих органів. Відзначається, що недостатньо дослідженими є молекулярно-генетичні механізми дії ауксину при утворенні бічних коренів, регуляції їх галуження. Описані відомості про участь цитокінінів у регуляції морфогенезу. При цьому констатується, що багато аспектів молекулярного-генетичного механізму дії цитокінінів на процеси утворення коренів і їх ріст в довжину ще мало вивчені. Недостатньо вивченою, на думку дисертанта, є і роль генів етиленового сигналіну *CTR1*, *ETO1*, *ERS1* і *EIN2* в регуляції генетичної програми морфогенезу кореневої системи.

Окремо аналізуються відомості про гени причетні до регуляції потовщення коренів. Обґрунтовується актуальність вивчення впливу мутацій генів *COB1*, *LIT1* і *SAB1* на будову коренів. Наводиться інформація про роль певних генів у регуляції утворення кореневих волосків. Відзначається, зокрема, що недостатньо вивченим є вплив на будову кореневих волосків мутацій за генами, які беруть участь у передачі світлового сигналу. В цілому в огляді виокремлено, які саме особливості генетичного контролю росту і

розвитку кореневої системи арабідопсису залишаються недостатньо вивченими. Список цитованої літератури, посилання на яку наводяться переважно в оглядовому розділі, містить 521 позицію, з яких близько 30% роботи останнього десятиліття.

На початку розділу 2 «МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ» наводиться детальна ботанічна характеристика виду *A. thaliana*. У наступному підрозділі цього розділу дається загальна характеристика мутантних ліній арабідопсису, що використовувалися у дослідженнях. Позитивною є чітка уніфікація подачі інформації: номер за каталогом, ген, продукт гена і фенотип. У підрозділі 2.3 наводяться умови вирощування рослин *A. thaliana* в агаризованій водній та ґрунтовій культурах. Далі описано методики визначення основних досліджуваних показників рослин, схрещувань та генетичного аналізу.

Розділ 3 (перший з експериментальних) має назву «ЗАГАЛЬНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ РОЗВИТКУ КОРЕНЕВОЇ СИСТЕМИ *ARABIDOPSIS THALIANA*». Автор, зокрема, відзначає, що в конкретних експериментальних умовах у рослин рас Col-0 і La-0 утворювалася коренева система змішаного типу, у якій із зародкового корінця розвивався потужний головний корінь, а на початку стебла на гіпокотилі формувалися додаткові корені. Дисертант зазначає, що вважати кореневу систему у рослин *A. thaliana* стрижневою (як у багатьох джерелах), а не змішаною, було б помилковим. На рис. 3.5 наводиться узагальнена схема розташування коренів у кореневій системі рослин рас Columbia і Landsberg з виокремленням систем головного та додаткових коренів. Наводячи результати досліджень особливостей розвитку кореневої системи у рослин двох рас, дисертант констатує, що у них на різних фазах онтогенезу коренева система виявляє різну лабільність. Значна морфологічна мінливість будови кореневої системи спостерігається в репродуктивний період розвитку на пізніх фазах розвитку і росту, менша на ранніх фазах. Одним із цікавих підсумків експериментів з вивчення особливостей росту і розвитку кореневих систем у рас Columbia і Landsberg є

встановлення факту, що у складі кореневих систем рослин цих рас у фазах цвітіння, плодоношення і дозрівання насіння за довжиною коренів переважає головний корінь, тоді як за числом коренів домінують бічні корені 2-го порядку галуження головного кореня. У підрозділі 3.3 наводиться загальна схема морфогенезу кореневої системи у рослин *A. thaliana* в онтогенезі. За оцінкою автора, хід розвитку кореневої системи в життєвому циклі з урахуванням онтогенетичної мінливості можна представити у вигляді 6 типів розвитку, а саме: базімесотонного, базіакротонного, мезобазітонного, мезоакротонного, акробазітонного і акромезотонного. Основним із них є базімесотонний тип.

Четвертий розділ дисертації присвячений генетиці ознак кореневої системи *A. thaliana*. На його початку наводяться результати, що засвідчують роль генів *SHR1*, *SCR1* і *WOL1* в регуляції активності апікальної меристеми кореня. Автор відзначає, що, за даними літератури, для рослин мутантних ліній за генами *shr-1*, *scr-1* і *wol-1* характерна коренева система стрижневого типу. Однак на прикладі детального дослідження рослин ліній N6503, N8539, N9817 дисертантом отримано дані, що свідчать про можливість утворення мичкуватої кореневої системи за вказаних мутацій.

Наступний підрозділ розділу 4 присвячений впливу мутацій за генами, що контролюють рецепцію і трансдукцію гормональних сигналів. Зокрема, вивчення морфології кореневих систем ліній, мутантних за генами метаболізму або чутливості до ауксину, дозволив розділити мутації за характером їх впливу на ступінь розгалуження коренів на дві групи: мутації, які зменшують галуження, і мутації, що підвищують ступінь галуження коренів. Водночас вивчення впливу рецесивного алеля *gpa1-3* за геном *GPA1* на будову кореневої системи дозволило дисертанту виявити особливості генетичного контролю формування стрижневої кореневої системи. Отримані результати, на думку автора, свідчать про те, що утворення кореневої системи у рослин арабідопсису залежить від генів, які контролюють

активність не тільки апікальної меристеми кореня, а й функціонування клітин перициклу.

Дисертантом також проведено дослідження будови кореневих систем у рослин, мутантних за сигналінгом цитокінінів – ліній *ahk2-5* і *ahk3-7*. Ці дослідження показали, що мутації в генах *АНК2* і *АНК3*, що кодують відповідні гістидинкінази, зумовлюють збільшення порядків галуження бічних коренів. Отже, на думку автора, отримані результати вказують на негативну роль цитокінінів в регуляції галуження коренів в кореневій системі, що полягає в інгібуванні утворення бічних коренів і пригніченні їх подальшого росту.

Вивчення мутантів арабідопсису за етиленовим статусом *ers1-2*, *ein2-1*, *ctr1-1* і *eto1-1* дозволило розділити мутації на дві групи: ті, що зменшують ступінь галуження коренів (*ctr1-1* і *eto1-1*), і ті, які підвищують галуження коренів (*ers1-2* та *ein2-1*).

Окремий підрозділ присвячено дослідженню успадковування ознак кореневої системи при взаємодії генів *SHR1*, *GPA1* і *COB1*, що беруть участь в реалізації ефектів ауксину і контролі формування клітинних стінок. Показано, зокрема, що рослини, у яких рецесивні алелі двох генів *SHR1* і *GPA1* перебувають в гомозиготному стані (*shr-1*, *shr-1*, *gpa1-3*, *gpa1-3*), не виживають і гинуть на стадії проростка через припинення розвитку кореневої системи.

У першому підрозділі розділу 5, присвяченого генетиці морфогенезу кореневих волосків, йдеться про вплив мутацій за генами *AXR1*, *AXR2*, *AXR3* та *AUX1*, що беруть участь в ауксиновому сигналінгу, на будову волосків епіблеми. Показано, що мутації *axr1-1*, *axr2-1*, *axr3-1* і *aux1-7* спричиняють у рослин пригнічення утворення волосків епіблеми.

У наступному підрозділі йдеться про вплив на будову кореневих волосків мутацій за генами етиленового сигналінгу *CTR1*, *ETR1*, *EIN2* та *ETO1*. За даними автора, мутації *ctr1-1* і *eto1-1* зумовлюють у кореневій

системі посилення утворення виростів клітин шкірки кореня, а мутації *etr1-1* і *ein2-1* пригнічують формування кореневих волосків.

Підрозділ 5.3 присвячено вивченню дії на будову волосків епіблеми мутацій генів, що беруть участь у сприйнятті і передачі світлового сигналу. Отримані результати вказують про існування відмінностей у мутантних ліній *rhd3-1*, *rhd4-1*, *rhd6-1*, *shv3-1*, *bst1-1*, *phyA*, *phyB*, *cpc-1*, *gl-2*, *rhl1-1*, *rhl2-1*, *rhl3-1*, *ttg-1*, *wer-1* и *cow1-1* за довжиною, кількістю, формою і ступенем розгалуження виростів клітин шкірки кореня.

У наступному підрозділі викладено результати досліджень особливостей успадковування форми волосків епіблеми, отриманих дисертантом при схрещуванні рослин мутантних ліній. Автор робить висновок, що успадковування форми кореневих волосків у *A. thaliana* при взаємодії генів *RHD3*, *RHD4*, *CEN1* і *SARI* відбувається за типом комплементарної дії генів, за якої кожен з генів виявляє власний специфічний ефект.

Розділ 6 має назву «ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК СИГНАЛЬНИХ СИСТЕМ РОСЛИНИ ТА ВЗАЄМОДІЇ ГЕНІВ ПРИ УСПАДКОВУВАННІ ОЗНАК КОРЕНЕВОЇ СИСТЕМИ». На підставі результатів схрещувань мутантних ліній за компонентами ауксинового, цитокінінового і етиленового сигналінгу автор стверджує, що здатність рослин збільшувати ступінь галуження коренів залежить від окремих генів та може успадковуватися як рецесивна ознака за типом полімерної взаємодії генів. У зв'язку з цим, на думку дисертанта, пошук рослин-донорів, що зумовлюють збільшення ступеня галуження коренів, здатних ефективно поглинати і використовувати поживні речовини, необхідно проводити серед гормональних мутантів з підвищеною чутливістю до ауксину, мутантів зі зниженим вмістом і блокованою сигналінгом цитокінінів та етилену.

Заключний (7-й) розділ присвячено генетичним аспектам мінерального живлення рослин арабідопсису. Було досліджено співвідношення надземної маси і коренів у процесі формування урожаю у рослин мутантних ліній

арабідопсису, що розрізняються за будовою кореневої системи. У 14 мутантних ліній (*shr-1*, *scr-1*, *axr3-1*, *wol-1*, *slr-1*, *alf4-1*, *gpa1-3*, *shy2-2*, *msg1-2*, *axr1-3*, *tir1-1*, *big-1*, *iar2-1* і *nph4-1*) було виявлено перевищення коефіцієнта продуктивності (співвідношення між масою надземної частини рослин і масою коренів) величини контролю (Col-0). Зниження коефіцієнта продуктивності порівняно з вихідною расою Col-0 встановлено у 9 мутантних ліній: *sur1-1*, *axr2-1*, *agp1-2*, *ahk2-5*, *ers1-2*, *ein2-1*, *cob-1*, *lit-1* і *sab1-1*. Важливою їх властивістю є те, що у них підземна маса у багато разів перевищує надземну частину.

Особливо цікавими у цьому розділі є результати порівняльного вивчення впливу основних елементів живлення (азоту, фосфору і калію) на урожайність мутантних ліній з порушеною будовою кореневої системи. Отримані автором результати свідчать, що досліджувані мутантні лінії мали неоднакову реакцію за урожайністю насіння на рівень живлення. Одна група мутантних ліній була здатна в умовах високої забезпеченості елементами живлення ефективно поглинати і використовувати поживні речовини (*axr1-3*, *nph4-1*, *iar2-1*, *big-1*, *msg1-2*, *tir1-1*, *shy2-2*, *shr-1*, *axr3-1*, *wol-1*, *scr-1*, *gpa1-3*, *slr-1* і *alf4-1*). Вони характеризувалися низькою відносною масою коренів, але високим коефіцієнтом продуктивності роботи кореневої системи. У цих рослин надземна маса значно перевищувала масу коренів. У другу групу увійшли мутантні лінії *ers1-2*, *ahk2-5*, *agp1-2*, *axr2-1*, *sur1-1*, *ein2-1*, *sab1-1*, *cob-1* і *lit-1*, яким притаманна висока відносна маса коренів, але низький коефіцієнт інтенсивності роботи кореневої системи.

Дисертаційна робота С.Г. Хаблака являє собою перше вітчизняне комплексне дослідження у галузі генетики кореневої системи арабідопсису. Серед результатів, які заслуговують на увагу, слід відзначити з'ясування ролі генів *SHR1*, *SCR1*, *WOL1*, *COB1*, *LIT1*, *SAB1* і *GPA1* в утворенні кореневої системи і встановлення генетичних причин переходу кореневої системи від одного типу до іншого. Результати щодо зміни ступеня галуження коренів за наявності мутацій, що впливають на реалізацію ефектів ауксину, цитокініну і



етилену, доповнюють уявлення про значення цих гормонів у контролі формування кореневої системи. Дисертантом встановлено роль домінантних мутацій *Etr1-1*, *Etr2-1* у виникненні гетерозису, що полягає у домінуванні у гібридів F<sub>1</sub> мутантного гена над геном дикого типу. З використанням різних фонів живлення у рослин мутантних ліній з порушеннями розвитку кореневої системи виявлено наявність генетичного поліморфізму за ознаками адаптації до умов мінерального живлення. Ці результати мають не лише теоретичне, а й практичне значення, оскільки створюють підґрунтя для використання певних ознак в селекції культурних рослин, спрямованій на адаптацію до різних ґрунтових умов.

Поряд із загальною позитивною оцінкою треба відзначити ряд недоліків дисертаційної роботи.

- 1) Окремі завдання у «Вступі» сформульовані занадто узагальнено. Наприклад: «дослідити генетичну і гормональну регуляцію галуження коренів», «дослідити взаємозв'язок сигнальних систем регуляції розвитку рослини і взаємодії генів при успадковуванні ознаки кореневої системи»;
- 2) Огляд літератури поряд з актуальними науковими фактами містить відомості навчального або науково-популярного характеру. Наприклад, інформація про введення в фізіологію рослин терміну «гормон» (с. 48), або ж твердження про те, що «з метою вивчення генетики корневих систем, генетичного контролю поглинання і засвоєння елементів живлення вчені рекомендують використовувати як об'єкт досліджень модельну рослину *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.» (с. 33).
- 3) Список цитованої літератури містить надмірну кількість посилань на підручники і практикуми [114, 300, 410, 411, 413-417, 420-422, 472, 508], словники [111, 113, 507], статті у науково-популярних журналах [36, 40, 57, 97, 151, 163, 173, 251]. Проте залишилися не згаданими нові роботи Dubrovsky et al.; 2017; Parizot et al., 2017, що

стосуються механізмів ініціації утворення бічних коренів у арабідопсису, фундаментальний огляд Е.Л. Ільїної і співавт. (Ильїна и др., 2017), в якому проаналізовано гормональні і молекулярно-генетичні механізми галуження коренів.

- 4) В розділі «МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ» значною мірою дублюється загальний опис рослини арабідопсису, наведений у попередньому оглядовому розділі. Занадто детально, як для студентського лабораторного практикуму, описуються очевидні речі з вирощування рослин, приготування живих розчинів, збору насіння і т. ін. Проте математична обробка результатів описана стисло і формально, без конкретизації методів і обґрунтування їх вибору.
- 5) В експериментальних розділах трапляються повтори викладеного в огляді літератури.
- 6) У розділі 7, присвяченому генетиці мінерального живлення арабідопсису, ніяк не пояснюється відсутність прибавки урожаю від внесення додаткових доз NPK у рослин дикого типу. При цьому неясно, як добирали оптимальні дози. Величини НІР у табл. 7.2 дозволяють порівнювати між собою лише генотипи на певних рівнях мінерального живлення. Водночас немає статистичного показника для порівняння реакції кожного генотипу на різні дози NPK.
- 7) Деякі положення наукової новизни сформульовані занадто узагальнено, наприклад, «доведено вплив сигнальних систем регуляції розвитку рослини на взаємодію генів при успадковуванні ознак кореневої системи» або «на підставі взаємозв'язку сигнальних систем рослини і взаємодії генів при успадкуванні ознак удосконалено концепцію щодо механізму взаємодії генів, яка базується на сучасних уявленнях про молекулярні принципи біологічної відповіді».

8) У роботі відсутній узагальнюючий розділ, наявність якого дозволила б більш наочно і переконливо показати зв'язки між результатами, представленими в експериментальних розділах.

Незважаючи на вказані недоліки, в цілому дисертаційна робота С.Г. Хаблака є самостійною завершеною цілісною науковою роботою з достатнім ступенем новизни і практичного значення. Достовірність основних результатів підтверджена відповідними показниками статистичної обробки. Автореферат дисертації відображає її основний зміст. Результати роботи опубліковані у 45 працях, у т.ч. одноосібній монографії та 32 статтях у фахових виданнях, серед яких є ті, що входять до провідних наукометричних баз.

Таким чином, дисертаційна робота Хаблака Сергія Григоровича за актуальністю, обсягом і змістом відповідає основним вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України 23.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент  
доктор біол. наук, професор,  
зав. кафедри ботаніки і фізіології рослин  
Харківського національного аграрного  
університету ім. В.В.Докучаєва

Ю.Є. Колупаєв



Підпис  
Керівник відділу діловодства і канцелярії

Т. Маршала

2019 р.