



ВІДГУК
офіційного опонента

на дисертаційну роботу *Антонюка Максима Зиновійовича* «Інтрогресія як індуктор мінливості геному пшениці *Triticum aestivum* L.» на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.15 –генетика

Актуальність теми. За даними ООН, кількість людей у світі, які страждають від голоду, зростає. У 2017 році таких нараховувалося 821 мільйон - на 6 мільйонів більше, ніж роком раніше. Міжвидові схрещування є одним із поширених методичних підходів, які використовуються для передачі генів від дикорослих родичів до культурних видів пшениць в селекційному процесі. Поповнення генофондів культивованих видів чужорідними генами стійкості до низки біотичних чи абіотичних факторів довкілля постійно триває. Однак, ефективність таких робіт не є такою, що задовольняє вирішення завдань сьогодення. Нове генетичне тло, на якому має експресуватися інтрогресивний ген, часто вносить істотні зміни в його експресію, аж до повної репресії. Ще у 80-х роках минулого століття Барбара МакКлінток вважала, що факт міжвидової гібридизації є одним з чинників, який запускає реструктуризацію геному в тому числі через посередництво мобільних генетичних елементів у новостворених геномах. Експериментальне опрацювання цієї проблеми на реальному рослинному матеріалі ще і сьогодні є актуальним, оскільки дозволяє з'ясувати на конкретних прикладах шляхи перебудов у групах рослин з інтрогресіями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках фундаментальних наукових проектів кафедри біології НаУКМА «Локалізація чужинних генів стійкості до грибних захворювань пшениці у гексаплоїдній пшениці *Triticum aestivum* L., перенесених до її геному від низки видів *Aegilops* та *Triticum*», № 0108U004087, «Формування геному поліплоїдних злаків за умов штучної інтрогресії чужинного хроматину та у природних умовах», № держреєстрації 0110U001272, «Інтрогресивні процеси у

геномі м'якої пшениці та їх застосування для генетичного аналізу Triticinae», № держреєстрації 0110U001273, «Індукція рекомбіногенезу для перенесення чужинних генів у геном м'якої пшениці», № держреєстрації 0110U001274, «Підвищення екологічної пластичності м'якої пшениці через індукцію рекомбіногенезу за участю інтрогресивного хроматину», № держреєстрації 0112U003159, «Генетична природа динамічності геномів інтрогресивних ліній м'якої пшениці», № держреєстрації 0116U006010 «Розширення генетичного пулу м'якої пшениці за рахунок генофондів дикорослих рослин», № держреєстрації 0116U004705.

Новизна дослідження та одержаних результатів. Автором роботи вперше експериментально продемонстровано на пшенично-чужинних амфідиплоїдах та їх похідних власної селекції особливості пластичності генетичного апарату, які можна спостерігати на рівні фенотипу в процесі селекційної роботи. Доведено, що різниця між генетичним апаратом інтрогресивних ліній та реципієнтним сорту Аврора полягає не лише у включенні до нього чужинного генетичного матеріалу, а і у змінах власного генетичного матеріалу пшениці. Показано вперше, що певні мутації спричиняються мобільними генетичними елементами у генах *Gli* та *β -Amy* та експансією повторів CAA і CAG кодонів глутаміну у гліадинових генах. За результатами роботи автором вперше ідентифіковано кілька нових генів: гени – промотори остистості *Awn1* на хромосомах 1U та 1S^{sh}, ген опушення краю листової піхви *Hs-S^{sh}* на хромосомі 4S^{sh}, ген чорного забарвлення зрілої колоскової луски *Bg2* на хромосомі 5U.

Практичне значення результатів дослідження. Автором запропоновано деякі нові підходи до проведення генетичного аналізу ліній пшениці, які мають інтрогресивне походження. У роботі продемонстровано важливість аналітичного вивчення рослинного матеріалу, яке має передувати виконанню генетичного аналізу, а саме констатовано, що необхідно проводити попереднє вивчення селекційного матеріалу щодо структури генетичного апарату за наявністю та гомеологічною належністю ДНК. Автором продемонстровано, що мінливість

ліній інтрогресивного походження, не завжди є наслідком присутності у генетичному апараті фрагментів ДНК інших видів. Мінливість може бути наслідком мутаційного процесу, який ініціюється інтрогресивною гібридизацією в нуклеотидних послідовностях самого реципієнтного геному. Оцінювання ліній пшениці за фертильністю, фенотипною та цитологічною стабільністю має виконуватися для побудови моделей успадкування за участю генів чужинного походження.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Положення, сформульовані в роботі проілюстровані 65 рисунками та 88 таблицями. Результати, отримані автором, опрацьовані та обговорені з врахуванням даних сучасної літератури. **Бібліографічний список складається з 943 літературних джерел, переважна більшість з яких опублікована в останні десять років.** На достовірність отриманих результатів вказує використання **сучасних методів дослідження** (гібридологічних, молекулярно-генетичних, статистичних). подача матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Висновки, зроблені здобувачем, аргументовані та логічно узагальнюють отримані результати. Тому **достовірність положень та висновків**, сформульованих у дисертації, не викликає сумніву.

Загалом, робота оформлена за правилами, написана українською мовою, хоча є і **дрібні недоліки**. У тексті зустрічаються не зовсім коректні терміни. Наприклад, автор пише про «рух» мобільних генетичних елементів, тоді як в літературі застосовують терміни «активація», «переміщення», «проліферація» та інші. «Вияв» ознаки, переважно в літературі застосовується термін «прояв», "... до складу генів, що кодують гліадини, входить повторювальний домен", зазвичай термін «домен» вживають стосовно амінокислотних послідовностей, «Для чотирьох генів з п'яти підбирали дві пари праймерів до певної мікросателітної ділянки, за допомогою різних програм. Це було зроблено для збільшення шансів ампліфікації цільової (target) ділянки: за умови коли одна пара праймерів не забезпечує ефективної ампліфікації або буде демонструвати

компоненти низької якості, її можна замінити іншою парою, що її було розроблено з використанням іншого програмного забезпечення», підібрати декілька пар праймерів до певної послідовності можна і в одній програмі, та ін. Застосовуються невдало перекладені англомовні терміни, так «transposable element», у трактуванні автора це транспозонний елемент (стр 54), «секвенування» замість сиквенування (стр.49) та ін. Назви видів також дивують «бавовна» замість бавовник (стр. 46, 53). Автор не бачить різниці між термінами «транспозон» та «мобільний генетичний елемент» (стр. 56). Зустрічаються невдалі вирази: «З цього факта автори висловлюють припущення» (стр. 57), «Цей механізм негайно було залучення для пояснення...» (стр. 64), «транспозони, що не замовчуються» (стр. 57), «вивільнення транспозонів» (стр. 58), «...зміни у картині метилювання... джерело генотипної мінливості...» (стр. 58), «знаки активного хроматину» (стр. 61), «Роль транспозонів у організації мінливості геному» (61), «ретротранспозони... рухаються через посередництво молекули РНК» (стр. 61), «...частина транспозонів є LTR-ретротранспозонами..» (стр. 61), «транспозонів обох класів» (стр. 62), «...компонент...важчий за масою... на 70 нуклеотидів..» (стр. 251), «...праймери ...продукували нові компонент...» (стр. 251). Рис. 6 автореферату та 5.11 основного тексту дисертації та 7 автореферату та 5.12 дуже низької якості.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За темою роботи опубліковано 67 наукових праць, включаючи 39 статей, серед яких 14 у фахових журналах згідно зі списком МОН України, 12 – статті в журналах, включених у міжнародні наукометричні бази, 2 – у закордонних виданнях, 28 тез у матеріалах наукових конференцій та з'їздів, які достатньо повно висвітлюють основні положення дисертаційної роботи. Матеріал, наведений в авторефераті, відповідає такому у рукописі дисертації.

Робота Антоноука М.З. є новим внеском у вивчення особливостей генетичних наслідків міжвидової гібридизації. У першій частині розділу, де викладаються результати досліджень (**розділ 3**), охарактеризовано цитологічні особливості ліній пшениці з інтрогресіями від трьох видів егілопсів. Досліджено

перебіг мейозу у рослинах різних ліній, ідентифіковано та охарактеризовано анеуплоїдні рослини, які було знайдено серед них. Рослини було характеризовано за модальною кількістю хромосом, яка зберігалася стабільною у низці поколінь.

Розділ 4 присвячений з'ясуванню генетичної структури досліджуваних ліній пшениці за хромосомними конфігураціями у M1 МКП гібридів, певними генами, біохімічними маркерами хромосом та мікросателітними маркерами хромосом. Наведено інформацію щодо хромосомної локалізації генів, які контролюють низку ознак та були контрастними для досліджуваного матеріалу, у тому числі стійкість до борошнистої роси.

Коло питань, яке розглядається у **розділі 5** присвячено ідентифікації причин мінливості досліджуваних ліній. Вивчено електрофоретичні спектри деяких білків, мінливість генів гіадинів та β - *Amy* в тому числі з використанням методу REMAP. Аналіз продуктів ПЛР у гелях виявив нові компоненти спектрів ДНК. Показано, що ідентифіковані нові варіанти послідовностей генів є результатом поширення тринуклеотидних повторів глютамінових кодонів геному пшениці, а також інсерцій транспозону MITE.

Розділ 6 дисертації присвячений генетичному аналізу інтрогресивних ліній за маркерними ознаками: опушення краю листової піхви, остистість колосу, забарвлення зрілої луски, стійкість до борошнистої роси. За всіма перерахованими ознаками ідентифіковано невідповідність у розподілі емпіричних фенотипних класів щодо очікуваних, виходячи з менделівських співвідношень. Для встановлення потрібної моделі генетичного контролю брали до уваги локалізацію гену (опушення листової піхви) у гаметоцидній хромосомі. Така локалізація визначає неоднакову життєздатність зигот. Аналізували і локалізацію гену інтересу у хромосомі, що не кон'югує з пшеничним гомеологом, цей факт впливає на утворення гамет з певним хромосомним складом у гібридів (ознаки забарвлення зрілої колоскової луски, остистість колосу). Автор робить висновок щодо важливості встановлення обсягу та гомеологічної приналежності хромосом та частин хромосомного

матеріалу у гібридах першого покоління між інтрогредованою рослиною та сортом-реципієнтом. Для ознаки стійкість до борошнистої роси автору не вдалось побудувати модель успадкування. За результатами матеріалів, висвітлених у цьому розділі, було сформульовано практичні рекомендації для проведення генетичного аналізу з використанням інтрогресивних ліній, які наведені у кінці дисертації.

У **розділі 7** автор обговорює отримані результати в контексті необхідності проведення генетичного аналізу інтрогредованого рослинного матеріалу паралельно з його всебічним аналізом щодо генетичної структури з використанням молекулярних маркерних систем та цитогенетичних методів.

Загалом позитивно оцінюючи дану дисертаційну роботу слід зазначити деякі **зауваження, запитання та побажання**, які не впливають на достовірність положень та висновків, сформульованих у даній роботі:

- 1) В огляді літератури наводиться аналіз епігенетичних явищ в умовах міжвидової гібридизації, які не досліджуються в роботі, та відсутній матеріал стосовно мікросателітних повторів, які вивчалися автором.
- 2) В розділі «Матеріали та методи» описано методику розгонки фрагментів ДНК в поліакріламідному та агарозому гелях, однак в рисунках тип гелю не вказано, що не дає змоги оцінити адекватність його застосування.
- 3) Автор вказує на стр. 251 та далі: «Компонент 230 п.н. був важчим за масою від очікуваного продукту 164 п.н. приблизно на 70 нуклеотидів, однак сиквенс встановив лише 155 перших нуклеотидів. Загалом ідентичність послідовностей, що порівнювалися, складала 57,3 %». Залишається не зрозумілим, яка саме послідовність використовувалась, як референс, скільки варіантів таких послідовностей є в GenBank? Крім того, така низька ідентичність може вказувати на проблеми в постановці ПЛР.
- 4) Узагальнену частину висновків вважаю не зовсім коректною, оскільки автор на конкретному прикладі описав деякі елементи процесів, які відбуваються за віддаленої гібридизації, одночасно. Для твердження про незворотну та односпрямовану мінливість (висновок 1), яка у тому числі

ґрунтується і на наслідках активності мобільних генетичних елементів, мені не вистачає дослідження динаміки поведінки МГЕ, оскільки відомо і автор пише про це в роботі, що ці елементи геному здатні не тільки інсертувати, але і вирізатися з ДНК, наслідком чого є повернення до вихідного стану певної послідовності.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які висуваються для отримання наукового ступеня доктора біологічних наук. На основі проведеного аналізу дисертаційної роботи, опублікованих праць, із врахуванням актуальності, новизни, наукової та практичної цінності проблеми, яка вирішується, обґрунтованості сформульованих наукових висновків та достовірності отриманих результатів, вважаю, що рецензована дисертаційна робота відповідає вимогам **«Порядку присудження наукових ступенів»**, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор Антонюк М.З. заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15-генетика.

Офіційний опонент

Заступник директора з наукової роботи

ДУ «Національний антарктичний центр» МОН

України, доктор біологічних наук



І.А. Козерецька

Підпис Козерецької І.А. засвідчую :

провідний фахівець з кадрових питань Ливченко Н. М. [Signature]