

## ВІДГУК

на дисертаційну роботу **АНТОНЮКА Максима Зиновійовича** «ІНТРОГРЕСІЯ ЯК ІНДУКТОР МІНЛИВОСТІ ГЕНОМУ ПШЕНИЦІ *TRITICUM AESTIVUM* L.», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Привнесення шляхом гібридизації чужинних генів у геном реципієнтного організму, або інтрогресія, використовується людиною здавна. Метою у рослинництві при цьому є передати культурним рослинам господарсько важливі ознаки інших рослин.

Наукові підходи до інтрогресії у рослинництві почали розробляти у XIX ст. Інтрогресії у геном пшениці активізувалися у 1950-х рр., коли вперше вдалось перенести до геному пшениці м'якої ген стійкості до бурої іржі від егілопсу зонтичного. До кінця минулого століття подібних робіт було виконано сотні.

Для пшениці відпрацьовано підходи до зменшення обсягу інтрогресивного матеріалу для досягнення кінцевої мети – передачі одного цільового гена. Проте не розроблено технології, яка б гарантувала не лише передачу чужинних генів, а й їх експресію у геномі рослини-реципієнта. Головним у роботі з інтрогресивним матеріалом все ще є фенотипний добір за цільовою ознакою та селекційна робота з гібридними нащадками після того, як інтрогресивна лінія залучена до схрещування з комерційними генотипами пшениці. Проте і це не завжди гарантує досягнення поставленої мети. Встановлено також, що інтрогресивна гібридизація призводить до підвищення геномної мінливості. Питання щодо мутагенного ефекту гібридизації є все ще не достатньо вивченим. Однак в нашій країні такі дослідження практично не ведуться. Тому роботу М.З. Антонюка, присвячену «на моделі «пшениця м'яка – розмаїття інтрогресивних ліній» надати експериментальні докази припущенню, що інтрогресивна гібридизація є пусковим механізмом активації мінливості реципієнтного

геному» слід визнати важливою та актуальною як для фундаментальної науки, так і з практичного боку, зокрема для подальшої розробки генетичних основ селекції та насінництва рослин, перш за все пшениці м'якої *T. aestivum*.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із вступу, огляду літератури (розділ 1), розділу 2 «Матеріали та методи», чотирьох розділів з результатами власних експериментальних досліджень, обговорення результатів дослідження (розділ 7), рекомендацій до практичного застосування результатів дослідження, висновків. На початку дисертації наведено анотації українською та англійською мовою, список опублікованих за темою дисертації робіт, список використаних джерел. Текст зі списком використаних джерел (943 посилання), ілюстраціями (65 рисунків, 90 таблиць) та додатком зі списком оприлюднених праць автора за темою дисертації викладено на 547 сторінках машинопису.

У вступі коротко обґрунтовується актуальність теми; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; наведено мету і завдання досліджень; дано коротке визначення об'єкта, предмета та коротко перелічені використані методи дослідження; викладено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, а також узагальнені дані про апробацію результатів дисертації та публікації, структуру та обсяг дисертації.

Розділ 1 «Інтрогресивна гібридизація як фактор штучного розширення генетичного пулу пшениці та роль (епі)генетичних механізмів у збільшенні мінливості її геному» – це огляд літератури, в якому досить детально проаналізовано результати досліджень генетичних та епігенетичних змін у геномах гібридів та їхні наслідки на рівні фенотипу. Розглянуто феномен геномного шоку та механізми його подолання. Проаналізовано механізми генетичних та епігенетичних змін у геномах гібридів, зокрема у пшениці, її віддалених гібридів та амфідиплоїдів. Розглянуто напрямки та результати інтрогресивної гібридизації за участю видів *Triticeae*, які використовуються як джерело інтрогресій для розширення генетичного пулу пшениці м'якої.

Особливу увагу приділено дослідженням, що містять докази індуктивної ролі інтрогресій у резидентному геномі щодо (епі)генетичної мінливості. У цілому, огляд літератури є достатньо аналітичним, містить цікаві узагальнення. Написаний він гарною мовою, лаконічно і логічно, в ньому достатньо повно висвітлено останні експериментальні дані з питань, що мають відношення до теми дисертації. Огляд свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в обраній галузі досліджень, критичне відношення до опублікованих результатів, здатність вичленувати і узагальнити головне з масиву розрізнених літературних відомостей, 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.

У розділі 2 “Матеріали та методи” коротко, чітко та ясно охарактеризовано вихідний рослинний матеріал – широкий спектр сортів пшениці твердої та пшениці м’якої, нулі-тетрасомні лінії сорту Чайніз Спрін, різні види егілопса, а також низку низку геномно-заміщених амфідиплоїдів та інших цікавих гібридів пшениці як твердої, так і м’якої тощо. У підрозділі 2.2 описано особливості застосованого методу гібридизації, цитогенетичного аналізу, виділення та аналізу білків і ДНК, а також особливості статистичної обробки отриманих даних. Слід при цьому підкреслити, що автор використав у своїй роботі широкий спектр інтрогресивних ліній м’якої пшениці, створених і досліджених попередніми дослідниками ще у 1980-1990-ті рр. Виявлена у частини цих 42-хромосомних ліній генетична нестабільність, як автор вважає, пов’язана з процесами, які відбуваються в їхньому геномі та були запуснені свого часу інтрогресивною природою штучно створених геномів. Дослідження побудовано з використанням ознак біохімічних (гени запасних білків та ферментів), морфологічних (остистість, колір зрілої колоскової луски, форма колосу, жорсткість колоскової луски, вдавненість у основі луски, опушення луски) та спектрів компонентів ПЛР з праймерами до транспозонів та мікросателітних локусів, специфічних до певних

гомеологічних груп хромосом чи специфічних хромосом. У цілому, на нашу думку, було використано сучасні методи, за допомогою яких отримано коректні результати, адекватні стосовно поставлених задач дослідження.

Розділ 3 «Цитологічна стабільність інтрогресивних ліній» складається з двох підрозділів, в яких викладено і обговорено результати власних досліджень автором мінливості досліджених ліній за кількістю хромосом та особливостей кон'югації хромосом у М1 МКП. Наведені результати свідчать, що серед досліджених інтрогресивних ліній є анеуплоїдні рослини, хромосомні числа яких більші або менші від  $2n=42$  на 1–2 хромосоми (гіпо- та гіпердиплоїди). У рослин похідних Аврозису трапляються телоцентричні хромосоми або димінутивні хромосоми. Найбільш варіативними за кількістю хромосом були лінії – похідні Аврозису, найстабільнішими – лінії Авролати. Не було встановлено, що лінії, які характеризуються перманентною мінливістю за деякими морфологічними та біохімічними ознаками, відрізняються за цитологічними характеристиками від ліній, для яких таку мінливість не зафіксовано. У розділі 3.2 наведено дані про те, що в лініях різного походження не існує суттєвої різниці у картині М1 мейозу. Всі вони у порівнянні з Авророю формували більшу кількість закритих бівалентів. Приблизно половина ліній відрізнялась від Аврори збільшеною кількістю унівалентів. Автор вважає, що виявлені мультиваленти в М1 мейозу інтрогресивних ліній можуть формуватися в двох випадках: 1) інтрогресія генетичного матеріалу зачепила більше ніж одну пшеничну хромосому, 2) перебудови відбулися у межах лише пшеничних хромосом, так що ділянка однієї з хромосом повторена ще в одній хромосомі. Він припускає, що наявність у М1 унівалентів та мультивалентів не є прикметою цитологічної стабільності. У цілому ж дані розділу 3 свідчать про більшу цитологічну стабільність ліній, ніж можна було б очікувати за результатами вивчення мейозу, а вивчення М1 мейозу в МКП має значення для прогнозування цитологічної стабільності інтрогресивних ліній.

Розділ 4 «Структура геному ліній відносно рекурентного генотипу м'якої пшениці щодо чужинних інтрогресій» складається з чотирьох підрозділів. У першому з них наведено результати визначення геномної структури через вивчення хромосомних конфігурацій у M1 МКП гібридів, зокрема результати вивчення гібридів інтрогресивних ліній – похідних Аврозису з сортом Аврора та особливості перебігу мейозу у гібридах F1 від схрещування інтрогресивних ліній – похідних Аврозису. У підрозділі 4.2. «Визначення гомеологічної належності чужинного хроматину за допомогою генів морфологічних ознак» охарактеризовано інтрогресивні лінії за морфологічними ознаками та наведено результати вивчення генетичного контролю ознаки опушення краю листової піхви. Далі наведено результати, отримані за використання біохімічних маркерів хромосом для встановлення гомеологічної належності хроматину, зокрема перевірено хромосоמו-специфічну компетентність гена *AcpH-1*, проведено скринінг остистих інтрогресивних ліній на гомеологічну належність інтрогресій та скринінг ліній Авродесу, стійких до борошнистої роси, з застосуванням хромосомно-специфічних маркерів. У підрозділі 4.4. «Використання мікросателітних маркерів хромосом для вивчення структури геному інтрогресивних ліній» наведено результати вивчення структури геному інтрогресивних ліній *Triticum aestivum* / *Aegilops sharonensis*, мікросателітного аналізу інтрогресивних ліній, стійких до борошнистої роси. Важливим у цьому розділі є те, що на основі отриманих результатів мікросателітного аналізу автор висунув обгрунтоване припущення про можливу наявність зв'язку генів стійкості з хромосомами гомеологічних груп 3 та 6 у ліній – похідних Авродесу, 1, 2, 3, 6 — похідних Авролати та групи 2 у похідних Аврозису. Разом з тим, скринінг стійких до борошнистої роси ліній за мікросателітними локусами не дає можливості однозначно визначити хромосомну локалізацію гена стійкості через високий поліморфізм за мікросателітними локусами усередині геномів інтрогресивних ліній та неінформативність багатьох локусів. Зіставлення результатів мікросателітного аналізу з морфологічною

характеристикою вивчених ліній підтвердив висновок автора про мозаїчну будову хромосом у геномах досліджених ліній внаслідок, очевидно, транслокацій (рекомбінацій) чужинних хромосом з різних гомеологічних груп, а також гомеологічну належність цих транслокацій, виявлену мікросателітним аналізом. Автор підкреслює, що, на його думку, мікросателітний аналіз не є надійним інструментом вивчення будови геному інтрогресивних похідних, перш за все через генетичну мінливість усередині геномів гібридного походження, яка знижує діагностичні компетентності алелів мікросателітних маркерів, властивих вихідним компонентам схрещування.

У розділі 5 «Генетична нестабільність інтрогресивних ліній» у п'яти підрозділах наведено результати вивчення рослин за ознаками морфології колоса, мінливості за електрофоретичними спектрами деяких білків, гліадинових спектрів різних генерацій, спектрів ампліфікації мікросателітних компонентів гліадинових генів, проведено порівняльний аналіз сиквенсів фрагментів ДНК, отриманих з поліморфних ампліконів, та з використанням методу REMAP, результати вивчення потенціалу гаметоцидної хромосоми  $4S^{sh}$  як індуктора генетичної мінливості та природи мінливості гена бета-амілази. Встановлено, що на тлі цитологічної стабільності відбувається перманентна мінливість за ознаками морфології колоса. А стосовно генів запасних білків поява генотипів, що продукують новий, порівняно з батьківськими, спектр, спостерігається частіше, ніж для генів альфа- та бета-амілази, естерази, пероксидази. Вивчення молекулярних основ мінливості на рівні електрофоретичного спектру дозволило автору зробити обґрунтоване припущення, що одним із чинників поліморфізму у гліадинових спектрах вивчених ліній можна вважати рух ретротранспозонів. Зміна ж алелю бета-амілази, яка приводить до появи у спектрі нового, неочікуваного компоненту, на думку автора, відбувається при формуванні гамет гібридом, гемізіготним за хромосомою  $4S^{sh}$ . На основі отриманих даних, автор також вважає, що одним з доведених у його роботі механізмів зміни у нуклеотидній

послідовності гена є рух транспозона Stowaway-MITE, і наслідки цього руху відстежуються за аналізом геномної ДНК.

Розділ 6. «Генетичний аналіз інтрогресивних ліній за маркерними ознаками» складається з чотирьох підрозділів, в яких наведено результати дослідження мінливості ознаки опушення краю листкової піхви, зокрема ролі гаметоцидної хромосоми як фактора спотворення співвідношень фенотипних класів при розщепленні, життєздатності зигот як фактора, що впливає на фенотипне розщеплення у популяціях  $F_2$ ; мінливості ознаки остистості колосу, зокрема генетичного контролю утворення остей у *T. durum*, генетичного аналізу інтрогресивних ліній за остистістю колосу у вивчених ліній похідних Аврозису та Авролати; генетичного аналізу ліній за ознакою забарвлення зрілої луски; ознаки стійкості до борошнистої роси, зокрема, проведено гібридологічний аналіз ліній – похідних Аврозису та вивчено успадкування гібридами стійкості до борошнистої роси у комбінаціях схрещування за участю інтрогресивних ліній різного походження. Важливим тут, на нашу думку, є наступне заключення автора «Отримані результати показують, що завдання перенесення чужинного гена стійкості на генетичне тло комерційного сорту м'якої пшениці, яке є результатом тривалої консолідації через добір найбільш оптимальних генотипів, без використання внутрішньогенних молекулярних маркерів є не дуже простим. Підтвердження факту передачі такого гена на молекулярному рівні має передувати спробам з'ясувати, чому рослина не демонструє стійкість – чи вона не має чужинного гена стійкості, чи ген наявний у складі геному, проте не функціонує».

Важливим і цікавим є заключний розділ 7 «Обговорення результатів досліджень». Це досить детальний, усесторонній, глибокий, узагальнюючий аналіз результатів досліджень з широким залученням літературних даних. Узагальнюючи отримані результати, автор робить підсумок про те, що головне питання, яке він вирішував, - це, що саме насправді є причиною вибуху мінливості, яка спостерігається серед нащадків гібридних геномів:

наявність у цих геномах чужинного хроматину, який безпосередньо залучений у контролі ознак, які вважаються інтрогресованими, тому що такі градації ознак не були притаманні реципієнтному організму, а характеризували вид – джерело інтрогресії. Чи зміни виникають у хроматині резидентного геному також, стабільність якого порушується молекулярними процесами, які запускаються при зведенні різних сталих, консолідованих геномів у спільний гібридний геном. На думку автора, цей останній механізм збільшення мінливості у інтрогресивних нащадків не можна відкинути хоча б через те, що мінливість рослин інтрогресивного походження і за результатами його досліджень, і в роботах інших авторів часто виходить за межі варіювання, властиві для вихідних геномів. Мінливість, яку спостерігали для генів гліадинів та бета-амілази, не була пов'язана з перенесенням чужинних алелей. Нові алелі виникали через мутації в генах, спричинені транспозиціями. Проте автор вважає, що це лише частина мінливості. На його думку, порушення консолідованості геному, яке викликається внесенням до нього чужинного хроматину навіть якщо він і не зберігається, може спричинювати епігенетичні події, які зумовлюють зміну градацій ознак морфології, фізіології, молекулярного фенотипу.

У цілому експериментальний матеріал викладено доступною мовою, чітко і логічно, основні результати достатньо підтверджено власними експериментальними даними, представленими, зокрема, у вигляді таблиць, оригінальними та якісними ілюстраціями, зокрема, унікальними фотографіями та схемами. У процесі викладу автор 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 автор своїм дослідженням зробив істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі генетики та генетичних основ селекції рослин, зокрема пшениці м'якої.



Важливо також, що наприкінці дисертації, перед самими висновками, автор робить обґрунтовані рекомендації, які, на мою думку, значно полегшать спланувати роботу майбутнім дослідникам при застосуванні і вивченні інтрогресивного матеріалу, зокрема пшениці м'якої.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно впливають з експериментальних даних. І хоча їх, на мою думку, забагато (19 пунктів), вони викладені досить чітко та ясно.

Зауважень щодо наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає.

Хочу звернути увагу лише на те, що дисертаційна робота містить надзвичайно великий експериментальний матеріал, якого з надлишком вистачило б не на одну дисертацію. І це створює для читача певні труднощі у тому плані, щоби «не втопитись» у величезній кількості наведеного матеріалу і не загубити головну провідну наукову лінію роботи, упевнитися, що це дійсно є докторська дисертація, а не нагромадження величезної кількості експериментальних даних. Мені, як опонентові, це, здається, вдалось, хоч і було нелегко.

Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота «Інтрогресія як індуктор мінливості геному пшениці *Triticum aestivum* L.» заслуговує позитивної оцінки. Вона відповідає сучасному рівню 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 – Антонюк Максим Зиновійович заслуговує присудження йому пошукового наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді 67 наукових праць, з них 14 статей у фахових виданнях, 12 статей у виданнях, що включені до міжнародних наукометричних баз даних, 28 тез матеріалів наукових конференцій та з'їздів.

Зав. відділом генетики клітинних популяцій  
Інституту молекулярної біології та генетики НАН України,  
член-кореспондент НАН України,  
доктор біол. наук, професор



В.А. Кунах

Підпис *Кунах В.А.*  
посвідчується  
Зав. канц. *Ін. Шевченко*