**Відзив офіційного опонента**

на дисертацію Антонюка Максима Зиновійовича «Інтрогресія як індуктор мінливості геному пшениці *Triticum aestivum* L.» на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

 **Актуальність теми дисертації.** Дослідження було здійснено з метою обґрунтувати експериментального припущення, що інтрогресивна гібридизація пшениці м’якої з її близькими родичами з підтриби *Triticinae* може відігравати роль пускового механізму для активації мінливості реципієнтного геному.

Дослідження 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*», № держреєстрації 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.

Текст дисертації викладено на 547 сторінках, з них 417 сторінок основного тексту, 22 сторінок анотацій двома мовами, 98 сторінок списку літератури та 9 сторінок додатків. Основний текст включає 88 таблиць, частина з них займає більше одної сторінки, і 65 рисунків. Список цитованих робіт складає 943 джерел, серед них 40 україномовних, 33 російськомовних, 1 стаття німецькою мовою, решта – англійською. Не менше 20% цитованих джерел оприлюднені за останні 5–7 років. Структура дисертації стандартна: огляд літератури, матеріали і методи, результати власних досліджень викладені у чотирьох розділах. Розділ 7 вміщує обговорення результатів. Є рекомендації для роботи з інтрогресивним рослинним матеріалом пшениці, висновки.

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** Вперше доведено експериментально з залученням придатного рослинного матеріалу, що пшенично-чужинним амфідиплоїдам та отриманим на їхній основі лініям пшениці властива перманентна, односпрямована та незворотна мінливість, яку можна спостерігати на фенотиповому рівні. Доведено, що відмінність між геномом інтрогресивних ліній та реципієнтним геномом сорту Аврора полягає не лише у включенні до нього чужинного генетичного матеріалу, а і у змінах власного генетичного матеріалу пшениці. Показано вперше, що певні, односпрямовані мутації, що викликаються мобілізацією транспозонів Sukkula (гліадинові гени), MITE (ген бета-амілази) та експансією тринуклеотидних повторів CAA і CAG кодонів глутаміну у гліадинових генах виникають саме у пшеничних генах ліній інтрогресивного походження і не є включеннями чужинного генетичного матеріалу до реципієнтного геному. Кілька нових генів *Triticinae* ідентифіковано у роботі: ген опушення краю листкової піхви *Hs-Ssh*  на хромосомі 4Ssh, гени–промотори остистості *Awn1* на хромосомах 1U та 1Ssh, ген чорного забарвлення зрілої луски *Bg2* на хромосомі 5U.

 **Практичне значення результатів дослідження.** Автор роботи довів, що залучення до генетичного аналізу ліній інтрогресивного походження вимагає їхнього попереднього вивчення за структурою геному щодо наявності та гомеологічної належності чужинного хроматину. І це потрібно враховувати у практиці генетичного аналізу з залученням інтрогресивного рослинного матеріалу. Моделі успадкування за участю генів чужинного походження мають будуватися з обов’язковим урахуванням таких характеристик ліній як фертильність, фенотипова та цитологічна стабільність. Надійність моделі значно підсилюється, якщо схрещування виконуються за циклічною схемою, до роботи залучаються індивідуальні рослини та нащадки індивідуальних рослин, ведеться ретельний облік виживаності рослин протягом онтогенезу та їхньої фертильності. Тільки знання структури геномів компонентів схрещування дає підґрунтя для формування очікуваних співвідношень сегрегації за фенотиповими класами. Важливим практичним наслідком виконаного дослідження є доведення факту, що мінливість ліній інтрогресивного походження не завжди є тільки наслідком включення до їхнього геному нуклеотидних послідовностей чужинного походження, а може бути й наслідком мутаційного процесу, який ініціюється у нуклеотидних послідовностях реципієнтного геному.

**Теоретичне значення результатів дослідження** полягає у галузі генетики, присвяченої вивченню чинників мінливості геному, і як таким чинником у роботі висовується сам факт інтрогресивної гібридизації пшениці, що порушує стабільність раніше консолідованого реципієнтного геному.

 **Основний зміст дисертації.** Перелік наукових фактів та проблем, що розглядаються у огляді літератури, відповідає змісту виконаного дослідження. У першій частині розглядаються молекулярні механізми, які, за сучасними генетичними дослідженнями, можуть генерувати (епі)генетичну мінливість геному взагалі і виникають внаслідок «геномного шоку», за терміном Барбари МакКлінток, у відповідь на порушення консолідованого геному через його входження до геному гібридного складу. Це зміни у послідовності нуклеотидів, тобто власне мутації, зміни у експресії генів, в тому числі за участю механізмів, які на сьогодні розглядаються як основа епігенетичних змін. У другий частині огляду ретроспективно охарактеризовано сучасний стан робіт з інтрогресивної гібридизації пшениці методами геномної та хромосомної інженерії. Більш докладно розглядаються порівняльні характеристики транслокаційних та рекомбінантних ліній, методи вивчення структури геному для доказу наявності інтрогресій. У пункті 1.2.4 докладно розглядаються та коментуються сучасні експериментальні роботи з інтрогресивної гібридизації рослин, результати яких можна трактувати на користь індуктивної ролі віддаленої гібридизації для промоції мінливості геному. Наведений огляд завершується формулюванням авторської концепції зробленого дослідження: «…сама по собі інтрогресивна гібридизація є фактором підсилення генетичної пластичності у нащадків віддаленої гібридизації у порівнянні з батьківськими генотипами», доведенню чого і присвячено виконане дослідження.

 У розділі «Матеріали і методи» наведено загальний опис рослинного матеріалу, який було використано для дослідженнь. Більш детальна характеристика інтрогресивних ліній, які були головним суб’єктом дослідження, наводиться у відповідних експериментальних розділах дисертації. Застосовані методики описані докладно і включають методи візуальної оцінки фенотипу рослин, цитологічні методи, електрофорез білків та візуалізацію спектрів, методи роботи з ДНК, спрямовані на отримання та візуалізацію спектрів фрагментів ДНК, створених методом ПЛР. Підходи для розробки праймерів, а також завдання з секвенування фрагментів ДНК та вирівнювання послідовностей очікуваних та отриманих фрагментів наведено у відповідних підрозділах роботи, що, на наш погляд, спрощує читання дисертації. Методи статистичної обробки даних адекватні характеру даних та меті обробки.

 Розділ 3 присвячений характеристиці ліній пшениці м’якої з інтрогресіями від трьох видів егілопсів щодо їхньої цитологічної стабільності. Цитологічна характеристика подана за кількома показниками: за модальною кількістю хромосом, що зберігається лінією протягом генерацій, за наявністю та різновидом анеуплоїдних рослин, які зустрічаються серед рослин досліджених ліній, та за картиною перебігу мейозу у рослинах окремих ліній.

 Матеріали розділу 4 стосуються спроб визначити структуру геномів ліній, які за певними ознаками були схожі не з сортом Аврора, а з амфідиплоїдом, з яким схрещували сорт Аврора під час створення ліній. Отже, за думкою автора, чужинний вираз ознаки був наслідком включення до геному лінії інтрогресії з відповідним геном. Для цього в роботі використано два підходи, які взаємно доповнюють один одного. Для встановлення кількості інтрогресій та їхнього обсягу (транслокація фрагменту – плече – хромосома) використовували запропонований ще Кіхарою метод геномного аналізу гібридів між тестерним генотипом (в роботі – Аврора) та досліджуваним генотипом (в роботі – лінії зі зміненим стосовно сорту Аврора фенотипом). Для встановлення гомеологічної належності інтрогресії, з якою потенційно пов’язаний розвиток ознаки, фенотип за якою характеризує її як чужинну для Аврори, використано також широко відомий метод молекулярно-генетичного маркерування. Цей метод для пшениці виявився надзвичайно конструктивним ще в ті часи, коли починали працювати з білковими маркерами, через наявність унікального набору нулі-тетрасомних ліній, яким не може похвалитися жодний інший модельний об’єкт. Автором використано практично всі білкові генетичні маркери, за якими досліджуваний матеріал демонстрував поліморфізм. Серед ДНК-ових маркерів обрано мікросателіти, які, по-перше, часто демонструють поліморфізм між досліджуваними генотипами, по-друге, мають визначену хромосомну локалізацію щодо номера гомеологічної групи та, як правило, субгеному пшениці. Наведена в цьому розділі інформація про геномну структуру ліній щодо кількості та гомеологічної належності інтрогресій виявилася критичною для розуміння результатів генетичного аналізу ліній за ознаками, поліморфними для Аврори та її ліній, а також стала підґрунтям для хромосомної локалізації генів, що беруть участь у контролі вивчених ознак.

 Розділ 5 є, вочевидь, центральним для експериментального доказу концепції дисертації. Його розпочато феноменологичним описом спостереження, що лягло в основу ідеї дисертації: гібридогенне походження геному може закладати основу перманентної мінливості, яка має спрямований характер і не затухає доти, поки одна градація фенотипу (і це завжди градація, притаманна амфідиплоїду) не досягне фенотипового прояву, притаманного реципієнтному генотипу Аврора. Перш за все це було констатовано на рівні морфологічних фенотипів. На рівні фенотипів різних білкових спектрів картина виявилась ще більш складною: межі мінливості у білкових спектрах виходили за рамки мінливості, притаманної компонентам ініціальних схрещувань (Аврора та геномно-заміщені амфідиплоїди). Утворювались спектри, які не були ані батьківськими, ані гібридними, тому що містили нові компонентні спектру. Причину їхньої появи автор розглядає на моделі гліадинових генів. Ця модель була обрана тому, що гени гліадинів не лише секвеновані, а й ретельно досліджені щодо особливостей структури кластерів, в які вони зібрані у геномі пшениці. Дві особливості подібної будови автор вважав такими, що вони можуть пояснити появу нових компонентів спектру: наявність глутамінових повторів у складі генів, які є основою для утворення нових алелів через ампліфікацію тринуклеотидів САА та САG, та насиченість міжгенних просторів транспозонами. Їхній рух також може спричинювати внутрішньокластерну мінливість гліадинових генів, що буде відбиватися на фенотиповому рівні як поява нових компонентів на електрофоретичному спектрі гліадинів. Отже поява нових компонентів ніяк не пов’язана з наявністю чужинного хроматину саме у гліадиновому кластері і є доказом нової мінливості, яка відбувається у гліадинових генах реципієнтного геному.

 Другою моделлю, докладно розробленою в цьому розділі, став ген бета-амілази. Він потрапив до поля зору автора з іншої причини, а саме: ген локалізований у хромосомах 4-ої гомеологічної групи пшеницевих, а в хромосомі 4Ssh виду *Aegilops sharonensis*, одного з джерел інтрогресій для досліджуваних ліній, є гаметоцидний ген *Gc*. І лінії, походження яких хоча б на якомусь етапі створення було пов’язане з наявністию у геномі хромосом 4Sshабо її довгого плеча з гаметоцидним геном *Gc*, демонструють мінливість за компонентами спектру генів бета амілази, *β-AmyA1* та *β-AmyD1.* Генетичний аналіз з використанням гібридів, які мали чи не мали у родоводі інтрогресивну лінію з гаметоцидною хромосомою 4Ssh, привів до висновку, що нові стосовно компонентів схрещування алелі виникають під час гаметогенезу. Зважаючи на молекулярний механізм дії гаметоцидного гена було припущено участь транспозону в утворенні нових алелів. Порівняльний аналіз сиквенсів гена бета-амілази у різних лініях та інших рослинних зразків показав, що алелі відрізняються за рахунок руху транспозону МІТЕ, локалізованого у одному з інтронів гена бета-амілази, і тому поява нових алелів не пов’язана безпосереднє з чужинним хроматином.

У розділі 6 представлені результати генетичного аналізу інтрогресивних ліній за ознаками, за якими фенотипово відрізняються Аврора та геномно-заміщений амфідиплоїд, а інтрогресивна лінія, що залучена до схрещування, співпадає за фенотипом з амфідиплоїдом. На цій підставі автор вважав, можливо й справедливо, що не властивий Аврорі вираз ознак контролюється геном (генами) чужинного походження. Ознак було всього чотири: опушення краю листкової піхви, остистість колосу, забарвлення зрілої луски та стійкість до борошнистої роси. Саме на матеріалах цього розділу було сформульовано практичні рекомендації щодо проведення генетичного аналізу з використанням інтрогресивних ліній. У жодному випадку сегрегацію у F2 від схрещування рослин з контрастними за ознакою фенотипами не можна було описати, спираючись лише на базове для трансмісивної генетики співвідношення (3 : 1)n або (1 : 2 : 1)n. У кожному випадку автору довелось шукати причину непридатності базової моделі моно- чи дигенного успадкування відмінностей ознаки, і такими чинниками виявились: розташування гена інтересу у гаметоцидній хромосомі, що порушує правило однакової життєздатності всіх зигот для побудови моделі розщеплення (опушення краю листкової піхви), розташування критичного гена у хромосомі, яка не утворює бівалент з пшеничною хромосомою у гібрида F1, що впливає на частоти формування гамет з різним хромосомним складом (забарвлення зрілої колоскової луски, остистість колосу), неоднакова життєздатність зигот на різних стадіях онтогенезу (опушення краю листкової піхви). Матеріали розділу показують, що досліднику взагалі не вдалося б побудувати теоретичні співвідношення розщеплення, якби залучені до схрещувань лінії не були вивчені щодо структури їхніх геномів стосовно кількості та гомеологічної належності чужинного хроматину в них через вивчення конфігурацій хромосомних асоціацій у F1 гібридів між лініями одна з одною та з сортом Аврора.

Єдиною ознакою серед вивчених, для якої автору роботи не вдалось побудувати модель успадкування, куди вписувались би отримані результати, була стійкість до борошнистої роси. І це незважаючи на те, що дослідження тривало багато років із залученням як компонентів схрещувань інтрогресивних ліній різного походження і крім сорту Аврори до схрещувань залучали сорти селекції Селекційно-генетичного інституту НААН з Одеси. Загалом, з цієї невдачі було зроблено три висновки. Перший, лінії – похідні Аврозису мало придатні не лише для генетичного аналізу за стійкістю до борошнистої роси, тому що Аврозис має дві гаметоцидні хромосоми, 4Ssh та 2Ssh, а остання, за даними розділу 4, є носієм гена стійкості до борошнистої роси, а також є малоперспективними для подальшого використання. Другий, у сегрегуючих популяціях спостерігається суттєвий дефіцит стійких рослин і пояснити це можна тільки через припущення про «замовкання» гена стійкості через порушення експресії чужинного гена, що може викликатися будь-яким з молекулярних механізмів, які згадувались у підрозділі 1.1. Третій, стійкість носить кількісний характер, тому що кількість стійких рослин у популяціях F2 у цілому позитивно корелює з рівнем стійкості компонентів схрещування, коли стійкість стійкого компонента коливалась у межах 7–9 балів, а вразливого –– 3–5 балів.

**При читанні дисертації виникли деякі питання та зауваження, що потребують пояснення.** При оцінюванні роботи Максима Зиновійовича перш за все зазначу відповідність її структури вимогам ДАК-МОН, підкресливши надмірну деталізованість від самого змісту через огляд літератури і експериментальну частину до кінцевих висновків (яких аж 19 за різною важливістю). Якби головні нумеровані висновки були підпорядковані гарно викладеним пунктам наукової новизни та практичної значимості (з деталізацією французькими абзацами), їх було б менше та й сприймалися б вони більш чітко. А відштовхуючись вже від таких висновків, можна було б частково скоротити об’єм та оптимізувати сам зміст (тобто писати роботу бажано розпочинати з формулювання висновків, і все їм підпорядковувати). Але все це вже справа тільки самого автора, оскільки я розумію, як йому шкода щось «викинути або не включити», хоча далеко не об’єм визначає цінність роботи. Мені доводилося бачити докторські дисертації різного об’єму від 3 сторінок (колишній завідувач кафедрою анатомії та фізіології рослин у Бєлдержуніверситеті академік НАН Бєларусі Годнєв Т.М. – автор формули хлорофілу) тільки з самою формулою та її описом до більше 2000 сторінок (колишній доцент кафедри дарвінізму й генетики доцент Палілов А.І., який так і не подав до захисту).

**До розділу 3**. Терміни нулі-, моно-, ді-, трисомік (з кількістю хромосом 40-43) стосуються виключно окремих хромосом, а не каріотипу в цілому, оскільки каріотип з такою кількістю хромосом може бути аномальним не тільки по одній, а по декількох хромосомах, і їх потрібно спеціально ідентифікувати.

**До розділу 4**. На жаль, якість електрофореграм (розподіл шляхом ізо-електричного фокусування) більшості ферментів (до речі, автор вживає чомусь менш прийнятий термін широкого значення «спектр») не дозволяє чітку їх генетичну інтерпретацію через можливу присутність різних ізоферментів, які кодуються генами на різних хромосомах.

Відсутність електрофореграм стандартів або інших ліній на більшості рисунків (особливо важливі рис. 4.13 та 5.3) також утруднює генетичну інтерпретацію, і можливо, тільки через це автор користується не генетичними поняттями (локус, алель), а скоріше механічним поняттям «спектр».

**До розділу 5**. Чим автор може спростувати можливість спонтанного перехресного запилення попередніх поколінь геномно-заміщених амфіплоїдів (наприклад, Авролати) зі звичайними сортами пшениці м’якої, оскільки в лініях 1-8, 9, 15, 20, 21, 25-35 при теоретичній відсутності геному D чітко ідентифікується алель *1D1* локусу *Gli-D1* (рис. 5.4), і на цьому ж рисунку (як і на рис. 5.6б та 5.8б) на електрофореграмах відсутні секаліни як маркер житньої транслокації на хромосомі 1В Аврори (заміщені локусом *1В1* від гентипів без транслокації)?

Як бєларус за походженням та освітою я вважаю себе **не в праві аналізувати коректність української мови** роботи (хоча, безумовно, вона потребує явного покращення). Але… як фахівець з генетики рослин та багаторічний референт наукових публікацій щодо генетики й селекції пшениці (більше 6000 рефератів робіт з 10 мов) не можу не звернути увагу на суттєві недоречності при термінотворенні та їх перекладах українською мовою, що нерідко спотворює біологічний сенс особливо при зворотних перекладах іноземцями. Одразу ж зазначу, що це скоріш за все не є провиною дисертанта, а загальна біда вітчизняних мовознавців і відсутність спілкування з досвідченими фахівцями. Наведу лише декілька прикладів з даної роботи:

* «роздільна здатність», невдалий переклад російськомовного «разрешающая способность» (англійською «discriminability»), за сенсом українською скоріш за все має бути «розрізняльна спроможність»;
* «розщеплення», переклад українською зі спотвореним сенсом не зовсім вдалого терміну «расщепление» російською, які обидва не відповідають сенсу первісного англомовного терміну «segregation» (від латинського аналога в законах Менделя, що означає «відділення, ізоляція, сегрегація» в гамети алелів, гомологічних хромосом, і не має відношення до «зчеплення неалельних генів» («linkage») у одній хромосомі, яке було описано пізніше (1906 року) Бетсоном і Пеннетом. І хоча словники надають переклад «расщепления» як «розщеплення або розчеплення» (англійською щось як «ungrafting, decoupling»), але ж корені цих слів українською («щеплення й чіпляння») мають зовсім інший (не біологічний) україномовний сенс, що суттєво відрізняється від первісній «сегрегації». І недарма абсолютною більшістю європейських мов (навіть польською) цей термін подається як транслітерація «segregation», тобто і українською правильніше має бути «сегрегація», а потомки «сегреганти».
* «фенотипний, генотипний», що б ні стверджували філологи НаУКМА, але ж україномовний прикметник від іменника «тип» буде «типовий», а ніяк не «типний», і тому від «фенотип» - «фенотиповий», від «генотип» - «генотиповий», а ось від «генетика» - «генетичний»;
* і нарешті, «маркування» як віддієслівний іменник від «марка», у зворотному перекладі англійською «stamping!» (за сенсом означає процес наклеювання марки поштової), аж ніяк не «marking», що має сенс процесу нанесення позначки, помітки, маркера (навіть російською «маркирование»). І тут навіть фахівці нашого Інституту мовознавства припускаються явної помилки, виходячи зі співзвучності англомовного «mark» (помітка, позначка, маркер і тільки марка фабрична) та україномовної «марки» (з головним сенсом поштової). Даний термін за біологічним сенсом має походити від іменника «маркер» («marqueur» французькою) з віддієслівним іменником «маркерування» як нанесення позначки або маркера подібно російськомовному терміну.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Роботу виконано із застосуванням сучасних цитологічних, молекулярних, молекулярно-генетичних методів. Етапи роботи відповідають сформульованим завданням та сприяють досягненню поставленої мети. Дослідження у цілому ґрунтується на великому обсязі експериментальної роботи. Висновки повністю обґрунтовані результатами експериментальної частини, застосовані методи статистичної обробки є адекватними. Достовірність сформульованих висновків та рекомендацій принципових сумнівів або зауважень не викликає. Дисертацію оформлено згідно вимогам ДАК МОН України до оформлення докторських дисертацій.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті.** Результати включених до дисертації досліджень повністю представлені в 39 статтях рецензованих фахових видань, 12 з яких оприлюднені у міжнародних журналах, та у 28 тезах доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових форумів спеціалістів. Зміст автореферату відповідає основному змісту дисертації.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред’являються до наукового ступеня доктора біологічних наук.** Дисертацію написано за результатами завершеного експериментального дослідження, націленого на вирішення конкретної наукової проблеми: чи може інтрогресивна гібридизація генерувати мінливість реципієнтного геному, яка не пояснюється прямим включенням до його складу фрагментів чужинного генетичного матеріалу.

