

ВІДГУК

на дисертаційну роботу **Єфіменко** Тетяни Сергіївни «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ СТІЙКОСТІ ДО ХОЛОДОВОГО СТРЕСУ В ГЕНОМНО-ЗАМІЩЕНОЇ ФОРМИ ПШЕНИЦЬ», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Прогресуючі кліматичні зміни на Землі та все зростаюче антропогенне навантаження на природу призводять до погіршення умов зростання рослин. Одночасно швидко збільшуються потреби людства у продовольчому, фуражному та технічному зерні. Зростає дефіцит продовольства у цілому. Це вимагає створення нових форм рослин, що використовуються у сільськогосподарському виробництві. Саме тому одним із найважливіших напрямів сучасної генетики, селекції і біотехнології є створення нових форм культурних рослин, зокрема пшениці, як найважливішої продовольчої культури, толерантних до несприятливих умов довкілля.

Важливим є пошук зв'язку характеристик кореневої системи зі стійкістю рослин пшениці до низьких температур взимку, а також генетичного підґрунтя тих особливостей кореневої системи, що пов'язані з кращою зимостійкістю пшениці. Дикорослі родичі пшениці, що використовуються як джерела генів стійкості до різних хвороб, можуть бути використані для збагачення генофонду, зокрема генами, що забезпечують формування кореневої системи, краще пристосованої до абіотичних стресів. *Amblyopyrum muticum* (*Aegilops mutica*) є диплоїдним дикорослим родичем пшениці, що містить генوم Т, який характеризується значним рівнем гомології з D геномом пшениці. Проте цей вид не був особливо залучений до інтрогресивної гібридизації. Тому роботу Т.С. Єфіменко, метою якої було встановити морфогенетичну природу різниці у зимостійкості між сортом м'якої пшениці Аврора та геномно-заміщеним амфідиплоїдом Авротіка слід визнати важливою та актуальною як з практичного боку, так і для подальшої розробки генетичних основ селекції рослин, зокрема озимої пшениці.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із вступу, трьох розділів, узагальнення, висновків, списку використаних джерел. На початку роботи наведено анотацію українською та англійською мовами. Текст зі списком літератури (237 джерел), ілюстраціями (34 рисунка, 23 таблиці) викладено на 226 сторінках машинопису.

У вступі коротко обґрунтовується актуальність теми; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; наведено мету і завдання дослідження; дано коротке

визначення використаних об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації та публікації, структуру і обсяг роботи.

Розділ 1 «Клітинно-молекулярні механізми формування холодостійкості у рослин» – це огляд літератури, який складається з трьох підрозділів, і в якому детально проаналізовано результати досліджень та наявні відомості про молекулярні механізми морозостійкості рослин на прикладі модельних рослин (підрозділ 1.1), про особливості генетичного контролю морозостійкості та яровизації пшениці (підрозділ 1.2), а також про сучасні методи оцінки морозостійкості рослин (підрозділ 1.3). Узагальнюючи аналіз літературних даних, автор робить цілком слушні зауваження: «Незважаючи на те, що в науковій літературі є багато відомостей про різні механізми морозостійкості рослин, важливо встановити які саме механізми забезпечують високу зимостійкість досліджуваного геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка, який містить Т геном виду *Amblyopyrum muticum* (*Aegilops mutica*). У нашому випадку, як ми вважаємо, визначну роль у забезпеченні зимостійкості Авротіки можуть мати гени, що мають чужинне походження – гени Т геному. Крім того, важливо розрізняти морозостійкість як здатність рослин виживати після експериментального заморожування та зимостійкість як більш комплексну ознаку, що включає пристосування до виживання рослин в польових умовах протягом зими, остання ознака має більше значення для сільського господарства» (с. 57-58).

У цілому огляд літератури є аналітичним, містить цікаві узагальнення. Написаний він доступно, 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 даній 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 і методи” коротко, чітко та ясно охарактеризовано використаний рослинний матеріал – геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка, сорт Аврора, *Aegilops mutica* та створені чужинно-заміщені лінії пшениці; описано використані реактиви, розчини, обладнання та методику виділення ДНК; особливо детально викладено методики полімеразно-ланцюгової реакції та електрофорезу для розділення продуктів

ампліфікації, встановлення кількості хромосом у корінцях, визначення вмісту вільного проліну, дот-блот гібридизації, визначення морозостійкості рослин; наведено особливості вимірювання характеристик кореневої системи та оцінки рослин за ознаками морфології. Підкреслено ті модифікації методів, які були застосовані автором для підвищення ефективності досліджень. У цілому було використано сучасні методи, за допомогою яких отримано коректні результати, адекватні стосовно поставлених задач дослідження.

Розділ 3 «Результати дослідження та їхнє обговорення» складається з трьох частин:

3.1. Створення інтрогресивних ліній *Triticum aestivum/Aegilops mutica*; 3.2. Порівняльне вивчення Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній за показниками морозостійкості; 3.3. Архітектоніка кореневої системи Авротіки як можливий чинник її підвищеної зимостійкості. Розглянемо детальніше викладені тут результати власних досліджень автора.

Частина 3.1. складається з восьми підрозділів у яких наведено результати вивчення створених ліній *T. aestivum/Ae. mutica* методом «змішування» хромосом третього субгеному у гібриді F1 між геномно-замішеним амфідиплоїдом Авротіка, геном якого містить тетраплоїдний компонент AABB сорту Аврора та геном TT виду *Aegilops mutica*, та сортом м'якої пшениці (Аврора). Вивчення кількості хромосом у первинних корінцях гібридів F3 показало, що їхня кількість була в межах 33-46. Для рослин F4 кількість хромосом була в межах 37-45, а для рослин F5 – 40-44. Починаючи з покоління F4, для яровизації та вирощування автор добирала рослинки з кількістю хромосом не меншою, ніж 40, які вона вважала найперспективнішими для створення гексаплоїдних ліній. Автор також показала, що процес формування гібридних геномів може супроводжуватися перебудовами хромосом. Наслідком цього були рослини, каріотип яких містив нетипові телоцентричні, дицентричні та «демінутивні» хромосоми, спостерігали також зміну кількості супутникових хромосом. Далі наведено дані про те, що сорт Аврора та геномно-замішений амфідиплоїд Авротіка відрізняються за кількома ознаками морфології колосу та вегетативної частини рослини. Серед ліній виявлено градації, які не були властиві жодному з компонентів схрещування. Оцінку отриманих рослин проводили за багатьма морфологічними ознаками. Оцінювали також стійкість до борошнистої роси. Показано, що серед рослин F4 не було таких, які хоча б за двома ознаками не відрізнялись від Аврори, що, на думку автора, може свідчити про наявність інтрогресій в їхніх геномах.

Наведені далі результати перевірки наявності генетичного матеріалу від виду *Aegilops mutica* в геномі інтрогресивних ліній пшениці за допомогою методу дот-блот гібридизації показали, що майже всі рослини покоління F4 містять в своєму геномі інтрогресії, що походять з T геному *Aegilops mutica*. За допомогою мікросателітного

аналізу було знайдено рослини, які за всіма SSR локусами були схожі на Аврору, а також такі, що за всіма локусами схожі на Авротіку. Автор припускає, що в першому випадку хромосоми 5-ої гомеологічної групи у цих рослин не перебудовані. В другому випадку лінії, що повторюють гаплотип Авротіки, можуть містити у відповідних ділянках хромосом інтрогресії. Для детальнішого вивчення цього питання для мікросателітного аналізу хромосом 5-ої гомеологічної групи рослин наступного покоління (F5) автор обрала більшу кількість мікросателітних локусів. Спочатку знову обирали локуси, що утворювали відмінні продукти ампліфікації для Аврори та Авротіки. Відмінні продукти ампліфікації утворювалися Аворою і Авротікою як з праймерами до мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 5D (що може пояснювалися гомологією хромосом генотипів D і T та розширеною специфічністю SSR локусів), так і з праймерами до мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 5A та 5B (що теж може пояснювалися розширеною специфічністю SSR локусів, рекомбінацією між хромосомами A і B генотипів м'якої і твердої пшениці під час виділення Аврори, та можливими перебудовами в генотипі під час процесу амфідиплоїдизації Авротіки). За мікросателітного аналізу 234-х 42-хромосомних рослин F5 залучили сім SSR-локусів, що мають діагностичне значення для виявлення заміни мікросателітного локусу, властивого хромосомі 5D на локус, властивий хромосомі 5T. Показано, де саме на хромосомах цих рослин розміщуються алелі від Авротіки, від Аврори, а також інші (відмінні від обох батьківських форм). На основі цих даних автор припускає наявність заміщеної хромосоми, заміну одного плеча, або наявність «мозаїчних» (рекомбінантних) хромосом, підсумовуючи, що дослідження більшої кількості мікросателітних локусів, що локалізовані в різних частинах хромосоми, дозволяє більш точно ідентифікувати наявність інтрогресій, особливо невеликого розміру (які зокрема можуть утворюватись через здатність хромосом D і T генотипів до рекомбінації).

У розділі 3.2 наведено результати порівняльного вивчення Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній за показниками морозостійкості. Спочатку описано результати визначення вмісту вільного проліну. Показано, що накопичення проліну в листках під час холодового загартовування не належить до тих механізмів, що забезпечують вищу зимостійкість геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка порівняно з сортом Аврора. Визначення електричної провідності (витікання електролітів) показало, що Авротіка виявила більшу відносну провідність, ніж Аврора, з чого автор робить висновок, що вища зимостійкість Авротіки забезпечується іншими механізмами, відмінними від певних особливостей клітинної мембрани, які б мали забезпечувати менше витікання електролітів після низькотемпературного стресу. Визначення морозостійкості рослин пшениці через

відростання після заморожування показало, що виявлена різниця у відростанні була на користь Авротіки. При цьому було виявлено, що рослини Авротіки формують кореневу систему, яка є розвиненішою у порівнянні з коренями Аврори, за умови вирощування проростків при дії низьких позитивних температур (4°C, умови холододового загартовування).

Розділ 3.3. «Архітектоніка кореневої системи Авротіки як можливий чинник її підвищеної зимостійкості» складається з трьох різних за обсягом підрозділів. Тут наведено результати вивчення кореневої системи Аврори, Авротіки та інтрогресивних ліній F5. При порівнянні характеристик кореневої системи Аврори та Авротіки не виявлено різниці за ознаками довжина найдовшого кореня та кількість коренів, але спостерігали різницю за ознакою об'єм витісненої рідини. Було припущено, що Авротіка утворює більшу кількість бічних розгалужень коренів, або корені мають більшу товщину. За отриманими результатами, формування більш розвиненої кореневої системи пов'язано з наявністю маркерів (алелей SSR-локусів) хромосоми 5T замість маркерів хромосоми 5A. Це, на думку автора, може вказувати на можливий зв'язок з хромосомою 5A пшениці генів, які беруть участь у формуванні кореневої системи пшениці. Рослини, що вирощували в полі, оцінювали також за кущистістю (кількість продуктивних стебел) та успішністю зимування (кількість рослин, які після зими перейшли до стадії колосіння). Показано, що Аврора відрізняється від Авротіки за співвідношенням об'єм коренів/кущистість у менший бік удвічі. Лінії, які характеризуються високим відношенням об'єм коренів/кущистість, показали вищий відсоток рослин, що вижили, порівняно з показником Аврори. Отримані результати дозволили авторові припустити, що стійкість рослин ліній до зимових стресових умов пов'язана з об'ємом кореневої системи відносно продуктивної кущистості.

Далі чомусь немає підрозділу 3.3.2, а відразу викладено підрозділ 3.3.3. «Спроба ідентифікації генів-кандидатів на участь у формуванні кореневої системи». За аналізу електрофоретичних спектрів Аврори та Авротіки за продуктами ампліфікації, утвореними з праймерами до генів *TaAGL14*, *BR11*, *CBF-A14*, що, за літературними даними, можуть мати зв'язок із зимостійкістю, не було виявлено поліморфізму за спектрами продуктів ампліфікації з праймерами до цих генів, тому надалі інтрогресивні лінії автор не аналізувала за цими праймерами. Вивчення інтрогресивних ліній за геном *TaAGL21*, що бере участь у регуляції розвитку коренів, показало наявність поліморфізму для продуктів ампліфікації, утворених з праймерами до другої частини гена *TaAGL21* (*TaAGL21-2*). Ці праймери використано для утворення продуктів ампліфікації з ДНК ліній – похідних Авротіки та аналізу продуктів ампліфікації щодо того, чи вони є схожі за масою на

продукт Авротіки, чи на продукт Аврори. При порівнянні результатів з оцінкою зимостійкості за критерієм Колмогорова-Смірнова показано, що лінії з алеллю гена *TaAGL21*, властивою Авротіці, за успішністю у перенесенні зимових стресів перевищують лінії, яким властива алель Аврори за цим геном.

Розділ 3.3.4. присвячено вивченню різниці між Авророю, Авротікою та інтрогресивними лініями за ознаками кореневої системи та поліморфізмом за геном *TaAGL21*. Встановлено, що за умов загартовування Авротіка формує краще розвинену кореневу систему, що, на думку автора, може бути зумовлено наявністю алелі «2» гена *TaAGL21*, що має позитивний зв'язок із зимостійкістю. Вивчення інтрогресивних ліній, генотипованих за геном *TaAGL21*, показало, що природне загартовування сприяє формуванню розвиненішої кореневої системи завдяки збільшенню довжини коренів за наявності алелі «2» гена *TaAGL21*, у той час як без загартовування краще розвивається коренева система у рослин з алеллю «1» гена *AGL21*. На основі цього автор робить висновок, що наявність алелі гена *TaAGL21*, властивої Авротіці, сприяє формуванню більш розвинутої кореневої системи за умов природного загартовування і не сприяє розвитку коренів за умов відсутності загартовування.

Важливим і цікавим є розділ «Узагальнення». Це досить детальний, усесторонній, глибокий і, разом з тим, лаконічний узагальнюючий аналіз результатів досліджень. Підсумком цього порівняно короткого обговорення і критичного аналізу є констатація «...вартим уваги тут є тільки абсолютне збільшення обсягу кореневої системи інтрогресивних ліній у порівнянні з рекурентним генотипом (Аврора).... ..корисним для цього може бути ген *TaAGL21*, що кодує транскрипційний фактор, ефектор синтезу ауксину. Інтрогресивні лінії, що мали алель цього гена, властиву Авротіці, характеризувались більш розвинутою кореневою системою і можуть бути рекомендовані для передачі у генофонд м'якої пшениці властивого геному *T. Ae. mutica* алеля гена *TaAGL21*.» (с.199). З цим положенням я цілком погоджуюсь як з повністю підтвердженим узагальнюючим висновком, зробленим автором на основі власного експериментального матеріалу, отриманого сучасними методами досліджень.

Таким чином, автор дисертаційної роботи дійсно, як вона пише в узагальнюючому висновку, вивчила геномно-заміщений амфідиплоїд Авротіка з геномом AABVTT стосовно молекулярно-генетичної природи його підвищеної зимостійкості шляхом створення та вивчення інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. mutica* (TT) на базі рекурентного генотипу Аврора. Встановила, що підвищена зимостійкість Авротіки у порівнянні з Авророю зумовлена архітектурою кореневої системи Авротіки та може бути

пов'язана з алельною специфічністю за геном *TaAGL21*, який кодує транскрипційний фактор – промотор утворення сайтів розгалуження кореня.

У цілому експериментальний матеріал викладено доступною мовою, чітко, лаконічно і логічно, основні результати достатньо підтверджено 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 зробила істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі генетики та генетичних основ селекції рослин.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно випливають з експериментальних даних. Вони викладені досить чітко, лаконічно та ясно.

Зауважень щодо наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. Хочу звернути увагу лише на наступні дискусійні моменти і упущення. Вважаю надто сміливим і амбіційним для автора назвати свою роботу «Молекулярно-генетичні механізми стійкості...». Фактично автор вивчила лише деякі особливості морфології рослин та деякі молекулярно-генетичні маркери, що, очевидно, зумовлюють чи асоційовані з вивченою ознакою – підвищеною зимостійкістю (див. мету роботи). Також, на жаль автор не вказує, скільки метафаз досліджували для встановлення числа хромосом у проростків і чи не було серед них міксоплоїдних форм. Є упущення, які свідчать про недостатньо ретельну «вичитку» тексту дисертації. Так, наприклад, після розділу 2.8 йде розділ 2.10 (немає розділу 2.9), чи після розділу 3.3.1 йде розділ 3.3.3 (немає розділу 3.3.2), або у змісті вказано, що розділ «Узагальнення» починається на с.194, а насправді – на с. 192 тощо.

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 «Молекулярно-генетичні механізми стійкості до холодового стресу в геномно-заміщеної форми пшениці» 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 — **Єфіменко** Тетяна Сергіївна заслуговує присудження їй пошукового наукового ступеня кандидата 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 13 наукових робіт, з них 8 статей у фахових наукових виданнях та тези 5 доповідей у збірниках матеріалів міжнародних і всеукраїнських конференцій.

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



В.А. Кунах

В.А. Кунах

Підпис *В.А. Кунах*
посвідчується
Зав. канц. *М. Майсєве*