

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Єфіменко Тетяни Сергіївни** “Молекулярно-генетичні механізми стійкості до холодного стресу в геномно-заміщеної форми пшениці”, поданої на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

1. Актуальність теми.

Одним з суттєвих факторів, що впливає на урожайність сільськогосподарських культур, зокрема озимої м'якої пшениці, є вплив низьких температур. Втрати врожаю в результаті холодних зим можуть сягати значних обсягів, наносячи великі збитки господарствам і в цілому економіці України. Недостатня морозостійкість сучасних сортів озимої пшениці може бути подолана за рахунок їх збагачення генами стійкості до біотичних та абіотичних факторів з дикорослих родичів пшениці, наприклад, егілопсів. Ці гени можуть бути залучені не тільки до набуття рослинами стійкості до морозів та різноманітних фітопатогенів, але також можуть впливати і на певні морфологічні ознаки рослин, зокрема будову кореневої системи. Отже, пошук та дослідження генів, що опосередковано впливають на морозостійкість рослин через розвиток певної архітектури коренів, є важливим завданням і має як теоретичну, так і практичну цінність.

Дисертаційна робота Єфіменко Т.С. виконувалась в рамках фундаментальних наукових тем кафедри біології Національного університету «Києво-Могилянська академія», а саме: «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, «Підвищення екологічної пластичності м'якої

пшениці через індукцію рекомбіногенезу за участю інтрогресивного хроматину», № держреєстрації 0112U003159.

2. Повнота викладу основних наукових положень та висновків у опублікованих наукових працях.

Результати наукових досліджень оприлюднені у 13 друкованих працях, включаючи 8 статей, 5 тез міжнародних і всеукраїнських наукових конференцій. Зміст опублікованих робіт та автореферату відображає основні положення дисертації і відповідає її суті.

3. Структура дисертації.

Дисертаційна робота складається з анотації, де стисло висвітлюється матеріал дисертаційного дослідження, вступу, огляду літератури (розділ I), розділу «Матеріали і методи», трьох розділів результатів власних досліджень та їх обговорення, узагальнюючого розділу, висновків, списку використаних джерел. Повний обсяг дисертаційної роботи складає 226 сторінок машинописного тексту, включаючи 23 таблиці, 34 рисунки та список використаної літератури, що містить 237 джерел.

У **Вступі** автор розкриває актуальність теми, формулює мету і визначає завдання дослідження, а також показує наукову новизну і практичне значення роботи.

У **першому розділі** дисертації представлено **огляд літератури**, де висвітлено сучасні погляди на механізми забезпечення морозостійкості рослин. Наведені приклади впливу деяких абіотичних факторів на сприйняття рослиною низьких температур, охарактеризовано гени, що відповідають за морозостійкість та за яровизацію у пшениці, описано методи оцінки морозостійкості рослин.

До незначних недоліків цього розділу можна віднести помилку в написанні назви гена *VRN3* на стор. 49, 50; відокремлення підрозділів 1.3.4.

(Метод визначення вмісту вільного проліну) та 1.3.5. (Оцінка морозостійкості рослин через визначення електричної провідності) від підрозділу 1.3.3. (Непрямі методи оцінки морозостійкості). Методи, згадані в підрозділах 1.3.4. та 1.3.5., за своєю сутністю і є непрямими методами оцінки морозостійкості.

У другому розділі описано матеріали і методи досліджень, дається характеристика обраного рослинного матеріалу, а саме: геномно-заміщеного амфідиплоїду Авротіка, сорту пшениці озимої Аврора та *Aegilops mutica*. В цьому розділі наведено методики виділення ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), електрофоретичного розділення фрагментів ДНК в поліакриламідному та агарозному гелях, методика підрахунку кількості хромосом у клітинах корінців пшениці, визначення вмісту вільного проліну, дот-блот гібридизація, наведено методи оцінки морозостійкості рослин, оцінки характеристик кореневої системи та деяких морфологічних ознак. Також в цьому розділі наводяться власноруч розроблені послідовності праймерів для оцінки поліморфізму ряду генів, пов'язаних з морозостійкістю рослин. В цілому застосовані дисертантом методи досліджень є сучасними та такими, що відповідають поставленим у роботі задачам.

До недоліків цього розділу можна віднести некоректне висловлювання – полімеразно-ланцюгова реакція (стор. 63, 64). Слід писати полімеразна ланцюгова реакція. Також в розділі порушена нумерація підрозділів: після підрозділу 2.8. одразу йде підрозділ 2.10.

Результати власних досліджень викладено в трьох наступних розділах, які розділені на декілька підрозділів. В розділі 3.1, що складається з восьми підрозділів, представлені результати аналізу інтрогресивних ліній *Triticum aestivum/Aegilops mutica*, які були отримані із застосуванням методу «змішування» хромосом двох чужинних геномів у гексаплоїдному гібриді між двома пшеничними генотипами, які мають однакові субгеноми AABB і відрізняються за третім субгеномом. Було отримано гібрид F1 між сортом

пшениці Аврора та амфідиплоїдом Авротіка. Оскільки отримані гібриди ААВВDТ виявилися самофертильними, то гібриди (F₂-F₅) наступних поколінь було отримано за рахунок самозапилення. Отримані гібридні лінії автором було охарактеризовано за каріотипом і за морфологічними ознаками. Встановлено, що у рослин F₃ кількість хромосом в первинних корінцях варіювала від 33 до 46 хромосом, у рослин F₄ - від 37 до 45, а у F₅ – від 40 до 44. За умов аналізу 14 морфологічних ознак серед рослин F₄ не було виявлено таких, які хоча б за двома ознаками не відрізнялися від рослин сорту Аврора, що може свідчити про наявність інтрогресій в їх геномах. Також наявність генетичного матеріалу від *Aegilops mutica* в геномі інтрогресивних ліній пшениці було встановлено за допомогою методу дот-блот гібридизації (підрозділ 3.1.4.) та мікросателітного аналізу (підрозділи 3.1.5 – 3.1.8.). Так під час дот-блот аналізу рослин F₄ було встановлено, що майже всі вони містять в своєму геномі інтрогресії, що походять з *Ae. mutica*. Автором підтверджено використання деяких SSR-локусів для ідентифікації в геномі амфідиплоїда хроматину 5-ої хромосоми геному (Т). Зокрема із 102 вивчених локусів, специфічних для трьох хромосом 5-ої гомеологічної групи, було виявлено 9, які мали діагностичну цінність для ідентифікації хроматину хромосоми 5Т за умов наявності у геномі інших хромосом тієї самої гомеологічної групи. До недоліків цього розділу можна віднести розміщення в тексті дисертації великої таблиці 3.3 (стор.87), яка займає 11 сторінок тексту, і яку на мою думку варто було винести у додатки. Також на с. 5 автореферату наявна описка – чавлені препарати хромосом, хоча мова йде про чавлені препарати корінців.

В розділі 3.2., що складається з трьох підрозділів, наведено порівняльну характеристику рослин сорту Аврора, амфідиплоїду Авротіка та отриманих інтрогресивних ліній за показниками морозостійкості. Визначення вмісту вільного проліну в листках загартованих рослин Аврори та Авротіки (підрозділ 3.2.1.) дозволило зробити авторові висновок, що ця ознака не належить до таких, що забезпечують вищу зимостійкість геномно-

заміщеного амфідиплоїда Авротіка порівняно з сортом Аврора. Такий самий висновок, а саме про відсутність зв'язку між ознакою та морозостійкістю, був зроблений й під час дослідження електричної провідності (витікання електролітів) для рослин сорту Аврора та амфідиплоїду Авротіка (підрозділ 3.2.2.) та під час визначення морозостійкості рослин через відростання після заморожування (підрозділ 3.2.3.). Щоправда, в підрозділі 3.2.3. автор звертає увагу на те, що паростки амфідиплоїду Авротіка формують більш міцну та розвинену кореневу систему у порівнянні з коренями рослин сорту Аврора. Цей фактор став основним у подальших дослідженнях дисертанта.

Розділ 3.3., що складається з трьох підрозділів, присвячений вивченню архітекtonіки кореневої системи амфідиплоїду Авротіка як можливого чинника її підвищеної зимостійкості. Автором встановлено, що під час вирощування рослин у пакетах з ґрунтовою сумішшю спостерігалася різниця за ознакою об'єм витісненої рідини, в той же час не було виявлено різниці за такими ознаками як довжина найдовшого кореня та кількість коренів. Автором було припущено, що рослини амфідиплоїду Авротіка утворюють більшу кількість бічних розгалужень коренів, або корені мають більшу товщину. За отриманими результатами, формування більш розвиненої кореневої системи, що оцінювалося за обсягом витісненої рідини, статистично значуще пов'язано з наявністю маркерів (алелів SSR-локусів) хромосоми 5Т замість маркерів хромосоми 5А. Це може вказувати на можливий зв'язок з хромосомою 5А пшениці генів, які беруть участь у формуванні кореневої системи пшениці.

Також було показано, що рослини сорту Аврора відрізняються від рослин амфідиплоїду Авротіка за співвідношенням об'єм коренів (за витісненою рідиною)/кущистість. Лінії, що характеризувалися високим співвідношенням об'єм коренів/кущистість, показали більш високий відсоток рослин, що вижили, порівняно з показником сорту Аврора. Отримані результати дали авторові змогу припустити, що стійкість рослин ліній до зимових стресових умов пов'язана з об'ємом кореневої системи відносно

продуктивної кущистості та збільшується разом зі зменшенням відношення кількості продуктивних стебел до об'єму кореневої системи.

У підрозділі 3.3.3., який насправді є підрозділом 3.3.2, автором здійснено спробу ідентифікувати гени-кандидати, що впливають на процес формування кореневої системи. На підставі аналізу літературних даних автором було обрано гени: *AGL21* та *AGL14* (гени, що впливають на накопичення ауксину в корені), *BRI* – ген рецептора брасиностероїдів. Також було перевірено ген *CBF-A14* – транскрипційний фактор родини CBF (C-repeat Binding Factor) – один з основних транскрипційних регуляторів морозостійкості. Під час проведення ПЛР з власноруч розробленими праймерами до генів *TaAGL14*, *BRI* та *CBF-A14* автором не було виявлено відмінностей у спектрах ампліконів сорту Аврора та амфідиплоїду Авротіка, тому інтрогресивні лінії за цими генами в подальшому не аналізувалися. Для гена *AGL21* було встановлено наявність різниці в спектрах ампліфікації ДНК сортів Аврора та амфідиплоїду Авротіка, що було в подальшому використано для диференціації геномів. Серед 250 проаналізованих рослин інтрогресивних ліній було виявлено 55 рослин, що під час ПЛР утворювали продукт ампліфікації схожий на продукт, який характерний для сорту Аврора, та 178 рослин, що утворювали такий продукт ампліфікації, як амфідиплоїд Авротіка. За умов співставлення результатів ПЛР аналізу з оцінкою зимостійкості автором було показано, що лінії з певним спектром ампліконів частини гена *TaAGL21*, властивим амфідиплоїду Авротіка, за успішністю у перенесенні зимових стресів перевищують лінії, яким властивий електрофоретичний спектр, характерний рослинам сорту Аврора. До недоліків цього розділу можна віднести відсутність на електрофореграмах маркера молекулярних мас (як в дисертації так і в авторефераті), що створює незручності під час візуального аналізу ампліконів.

Останній підрозділ 3.3.4. (насправді 3.3.3.) присвячений аналізу взаємозв'язку між архітектурою кореневої системи та поліморфізмом гена *TaAGL21* у рослин сорту Аврора, рослин амфідиплоїду Авротіка та

отриманих інтрогресивних ліній. В цілому автором було встановлено, що за умов низьких температур, рослини амфідиплоїду Авротіка формують краще розвинену кореневу систему, що може бути пов'язано з одним з алельних станів гена *TaAGL21* (наявність алеля «2»), що, в свою чергу, має позитивний зв'язок із зимостійкістю. Серед недоліків цього розділу слід згадати прикру опіску: замість *TaAGL21* вживається *ALG* (стор. 183 і наступні дисертації) та стор. 19 автореферату.

Розділ узагальнення результатів дослідження вдало підсумовує та узагальнює основні результати, отримані в роботі.

Висновки змістовні та відображають головні досягнення проведеної роботи.

4. Ступінь обґрунтованості основних наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Сформульовані Т.С. Єфіменко основні наукові положення та висновки обґрунтовані достатнім об'ємом проведених молекулярно-генетичних та морфометричних аналізів. Застосовані методи наукових досліджень відповідають меті та поставленим завданням. Зроблені автором висновки логічно випливають з одержаного фактичного матеріалу. В цілому результати досліджень, представлені в дисертації Т.С. Єфіменко, їх аналіз, основні наукові положення та зроблені висновки достатньо обґрунтовані.

5. Новизна основних наукових положень, висновків та одержаних результатів, сформульованих у дисертації.

Вперше створено набір гексаплоїдних інтрогресивних ліній з залученням генетичного матеріалу виду *Aegilops mutica*, який досі у віддаленій гібридизації практично не використовується.

В роботі вперше показано, що одним з можливих механізмів підвищення зимостійкості геномно-заміщеного амфідиплоїда Авротіка у порівнянні з сортом м'якої пшениці Аврора є формування у нього більш розвиненої кореневої системи.

Встановлено, що лінії, які мають заміщення мікросателітних локусів, специфічних для хромосом 5-ої гомеологічної групи пшениці, на локуси хромосоми 5T, характеризуються більш високим відношенням об'єм коренів/кількість пагонів та кращою зимостійкістю у порівнянні з сортом пшениці Аврора.

Вперше автором встановлено, що за умов загартовування краще зимують лінії з властивим амфідиплоїду Авротіка алелем гена *TaAGL21*, що кодує транскрипційний фактор, ефектор синтезу ауксину, який залучений до утворення бічних коренів.

6. Науково-практична цінність роботи і конкретні шляхи застосування результатів досліджень.

Дисертаційна робота має як теоретичне, так і практичне значення. Створені дисертантом інтрогресивні лінії Аврора/Авротіка можуть бути використані як джерело корисних ознак для покращення м'якої пшениці, серед яких: підвищена зимостійкість, стійкість до борошнистої роси та листової іржі. Лінії можна використовувати для створення картуючих популяцій, придатних для генетичного аналізу геному пшениці за морфологічними та фізіологічними ознаками, за якими амфідиплоїд Авротіка відрізняється від сортів м'якої пшениці. У разі спроби використати лінії для покращення зимостійкості пшениці скринінг гібридних популяцій за геном *TaAGL21* можна використовувати для добору рослин з потенційною здатністю формувати таку архітектуру кореневої системи, яка буде забезпечувати кращу зимостійкість рослин через збереження коренів та краще забезпечення наземної маси водою та мінеральними речовинами.

7. Висновок.

Аналіз поданих для розгляду матеріалів (рукопису дисертації, автореферату, публікацій) дозволяє зробити висновок, що, не зважаючи на існуючі недоліки, за актуальністю, обсягом опрацьованого матеріалу та його аналізом, новизною та практичним значенням отриманих результатів,

особистим вкладом автора робота «Молекулярно-генетичні механізми стійкості до холодового стресу в геномно-заміщеної форми пшениці» є повноцінним науковим дослідженням, проведеним на високому рівні із застосуванням сучасних молекулярно-генетичних, морфометричних та статистичних методів аналізу. Робота є завершеним науковим дослідженням, що цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів...», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. №567, а її автор, Єфіменко Тетяна Сергіївна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент

кандидат біологічних наук,

старший науковий співробітник,

завідувач Відділу популяційної генетики,

учений секретар ДУ «Інститут харчової

біотехнології та геноміки НАН України»



Я.В. Пірко

3 листопада 2017 року

