

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про дисертаційну роботу Навроцької Дар'ї Олександрівни за темою «МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* E. DESV. У ПРИРОДІ ТА В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*» на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність теми дисертації. Роботу присвячено вивченню геному *Deschampsia antarctica*, злаку, одному з двох видів покритонасінних рослин, які зростають у екстремально холодних умовах Антарктики. Актуальність дослідження пов'язана з активним інтересом, який в останні 10-15 років викликає питання: які генетичні особливості геномів рослин дають їм можливість витримувати умови існування, які здаються несумісними з життям багатоклітинного організму, такими як різка нестача води або надмірно низькі температури. Оскільки у сучасній науці будь-який науковий інтерес до проблеми не виправдовується, якщо не підкріплюється обіцянками вирішення певної практичної проблеми, подібні досліджування завжди супроводжуються висвітлюванням перспективи того, як отриманні знання можна буде використати для покращення властивостей рослинних організмів, які людство використовує для задоволення своїх потреб. Зокрема, як можна культивувати рослини в умовах, непермісивних для їхніх природних біологічних властивостей, а такі умови на Землі складаються в багатьох місцях і обмежують можливості збільшувати площі під посівом культур, які годують людство. Низькі температури – одна з таких умов, і спеціалісти з селекції окремих видів, зокрема злаків, вважають, що добір адаптивних генотипів в рамках природного генофонду себе практично вичерпав і потрібно з'ясувати, які саме гени забезпечують екстремальну стійкість до низьких температур та як слід діяти, щоб такі гени могли ефективно запрацювати в геномах рослинних сортів, які при цьому не мають втратити своєї продуктивності. Отже, робота актуальна саме в цьому плані: геном рослини, яка зростає та дає нащадків в екстремально холодних умовах потрібно вивчати.

Зрозуміло, що вивчення геному та ще з завданням вийти на конкретні гени – завдання довготривале і ніяк не може бути виконано в рамках будь-якої окремої роботи. І робота Навроцької відкриває лише початок такому вивченню.

Дослідження було виконано з метою вивчити геном *Deschampsia antarctica*, злака, що зростає в екстремально холодних умовах Антарктики, на каріотипному та молекулярно-генетичному рівнях щодо стабільності геному за вивченими характеристиками серед нативних рослин, зібраних в місцях зростання, отриманих з них калюсних культур та рослин-регенерантів.

Дослідження виконувалось в рамках бюджетних тем «Вивчення генетичного поліморфізму і пластичності геному рослин в екстремальних умовах довкілля» (номер держреєстрації 0110U000689, 2010-2015 рр.) та «Мінливість геному рослин в екстремальних умовах зростання» (номер держреєстрації 0115U003743, 2016-2020 рр.), а також у рамках проекту «Вивчення динаміки показників адаптивності наземних рослинних угруповань Антарктики в умовах кліматичних змін» (номер держреєстрації 0115U001966, 2015 р.) Національного антарктичного наукового центру МОН України, та Державної цільової науково-технічної програми проведення досліджень в Антарктиці протягом 2011 – 2020 рр.

Текст дисертації викладено на 162 сторінках, в тому числі 112 сторінок основного тексту, включаючи 12 таблиць та 27 рисунків. Список цитованих робіт представлений 269 джерелами, з них 239 англomовних. 35 робіт оприлюднено починаючи з 2012 року. Структура дисертації звичайна: огляд літератури, матеріали та методи, результати власних досліджень викладені у трьох підрозділах розділу три, є розділ з обговоренням результатів, висновки та два додатки.

Новизна дослідження та одержаних результатів. Вперше охарактеризовано каріотип представників виду *Deschampsia antarctica*, зібраних в різних місцях зростання, на молекулярному та цитологічному рівні як у цілому константний та диплоїдний з наявними окремими відхиленнями від

диплоїдної формули у вигляді міксоплоїдів, гіпотриплоїда та носія В-хромосоми. Створено FISH-молекулярну ідіограму каріотипу за стандартними для каріотипування повторами. Вперше доведено цитогенетичну стабільність рослин *Deschampsia antarctica* за умов тривалого мікроклонального розмноження. Вперше для даного виду встановлено спрямованість хромосомної мінливості у калюсних клітинах різних пасажів та рослин, які з них регенеровані до диплоїдного рівня, якщо вихідна рослина була диплоїдною.

Практичне значення результатів дослідження. Головне практичне значення роботи полягає у встановленні факту, що вид *Deschampsia antarctica* можна ввести в культуру *in vitro*, і у культурі геном щучника, за пермісивних умов, мінливості не демонструє. Це надає можливість використовувати рослини, регенеровані в культурі, для подальшої роботи з ними для вирішення головного питання, через яке вивчають щучник арктичний: які гени та яким чином створюють ті клітинні та фізіологічні умови, які дають змогу рослині виживати та розмножуватися в умовах Антарктики. Праймери, підібрані для вивчення поліморфізму за маркерними системами ISSR та IRAP, виявились вдалим для реєстрації міжсубпопуляційного поліморфізму досліджуваного виду та можуть бути рекомендованими для подальшого застосування.

Теоретичне значення результатів дослідження полягає в отриманих біологічних характеристиках виду *Deschampsia antarctica*, для якого відкривається перспектива стати модельною рослиною для вивчення молекулярно-генетичної та клітинно-фізіологічної картини розгортання процесів вегетативного та репродуктивного онтогенезу за умов екстремально низьких температур.

Огляд літератури за розкритими питаннями теми дисертації відповідає. Розглядається мінливість геному рослин як матеріальна основа підвищення генетичної пластичності, яка, безумовно, є адаптивною ознакою для виду, що існує за умов, граничних для виживання покритонасінної рослини. У якості одного з елементів генетичної пластичності наводиться наявна на цей час у

літературі інформація про розповсюдження, особливості будови та потенційне функціональне значення В-хромосом. Зроблено ретельний, всебічний і потрібний для оцінювання результатів власної роботи аналіз вже наявних у літературі даних про каріотип різних представників роду *Deschampsia*, зареєстрованих на сьогодні показниках генетичної різноманітності серед окремих видів роду. Обговорюються фактори мікроеволюційного процесу, які можуть лежати в основі тієї картини генетичної дивергенції (чи її відсутності) між окремими субпопуляціями видів, які показані при дослідженні геномів їхніх представників за допомогою придатних для цього молекулярних маркерних систем. Наведений огляд стає підґрунтям для подальшого обговорення та порівняльного аналізу результатів власних досліджень. Як огляд літератури, так і дисертація написано доброю літературною науковою мовою і практично немає таких речень, які потребують редагування чи додаткового пояснення їхнього сенсу.

Матеріали і методи написано докладно, схеми отримання рослинних зразків та подальшої роботи з ними прописані чітко. Це створює умови для подальшої легкої орієнтації у експериментальних результатах. З іншого боку, такий ретельний підхід до опису матеріалу та кількісної характеристики окремих етапів дослідження ясно показує, який величезний обсяг експериментальної роботи автором проведено. Перш за все це стосується цитологічних досліджень, адже відтворення цих методик, на відміну від роботи з ДНК у пробірках, так і залишається елементом мистецтва, яким вдається оволодіти далеко не кожному досліднику.

В підрозділі 3.1 наведено результати цитогенетичних досліджень геному щучника антарктичного. Це встановлення хромосомних чисел, яке, по-перше, характеризує вид як диплоїдний, а по-друге вказує на можливість відхилення від диплоїдії: знайдено триплоїди в одній з субпопуляцій. Як серед диплоїдів, так і серед триплоїдів знайдені анеуплоїдні метафази. В диплоїдній популяції на анеуплоїдних метафазах ідентифіковано В-хромосоми. Визначення геномного розміру в рослинах з різних субпопуляцій підтвердило наявність

триплоїдних геномів, в цілому результати знаходяться в межах цього показника, встановленого на рослинах виду з інших місць зростання іншими дослідниками. Дані про поліморфізм у спектрах ампліконів, отриманих з ISSR- та IRAP-праймерами дали можливість розрахувати генетичні відстані Жаккарда, які дуже непогано накладаються на карту розташування субпопуляцій на стор. 57, хоча і не без виключень. Це характеризує обрані праймери як вдалі для оцінки генетичної диференціації популяцій.

В підрозділі 3.2 наведено результати, якими автор дисертації може пишатися. Адже скласти ідіограму каріотипу виду, нового щодо подібних досліджень, вказавши розташування всіх послідовностей, які традиційно використовуються у таких дослідженнях, тобто рибосомальні, теломерні та центромерні повтори – це новизна достойного рівня. Причому вивчено були як диплоїдні, так і гіпотриплоїдні рослини і отримані у цілому результати логічно взаємопов'язані. Підтверджено факт наявності В-хромосом.

Підрозділ 3.3 є, на погляд опонента, центральним за значенням для того, щоб вказати на щучник антарктичний як на придатну модель для подальших досліджень. По-перше, вдалось мікроклональне розмноження у культурі рослин, вирощених з насіння, взятих з природних умов. Тим самим показано, що створено джерело рослин, з якими можна працювати без постійного поповнення запасу насіння з природних популяцій. По-друге, розроблено протоколи для отримання та культивування калюсу, який також є рослинним матеріалом, придатним для розв'язування певних молекулярно-генетичних питань при дослідженні виду. По-третє, з калюсів отримано рослини-регенеранти, з якими також можна працювати далі. Однак ці результати не набули б того значення, які, на нашу думку, є не лише головним практичним значенням цієї роботи, а і дають свій внесок у вирішення тієї величезної проблеми сучасної генетики, яка називається нестабільністю геному, якби пошукачем не було здійснене порівняльне вивчення геномів рослин щучника за умов мікроклонального розмноження, у клітинах калюсу та у рослинах-регенерантах, з калюсу отриманих. На думку опонента, наше сучасне

захоплення динамікою геному, трошки гіперболізується. Тобто факт онтогенетичної динаміки геному, який є, за суттю, одним з механізмів розгортання онтогенезу, а також процеси генетичних перебудов та епігенетичних змін, які є властивими геномам гібридного походження в момент його формування, переносяться на міжгенераційний рівень біологічних видів взагалі. З одного боку ми розуміємо, що якщо б це було так, напевно біологічні види не могли б існувати як дискретні системи. З іншого боку, є велика спокуса шукати та знаходити ознаки цієї геномної нестабільності, щоб внести свою лепту в вирішення наймоднішого питання генетики. Чи очікувала дослідниця такі результати, що отримала, чи не очікувала, але у третьому підрозділі своїми даними вона показала наступне: 1) серед рослин – продуктів мікроклонального розмноження каріотипної чи генетичної (поліморфізм за системами маркерів ISSR) немає; 2) в клітинах калюсних культур, вивчених після 2, 3 та 4 пасажів, були клітини з хромосомною формулою, що відрізнялась від модального числа хромосом, властивого рослині-джерелу калюса, але мінливість ця прямувала до модального числа, перш за все для калюсів, отриманих від диплоїдних рослин; мінливість за кількістю хромосом була більшою для калюсів, отриманих від гіпотриплоїда та рослин з В-хромосомами, що можна сприймати як наслідок зниження цитологічної стабільності цих рослин у порівнянні з диплоїдами; 3) рослини-регенеранти з клітин калюсів за хромосомними числами були диплоїдними, коли походили від диплоїдних рослин, та мали кількість хромосом від $2n$ до $3n$, коли походили від гіпотриплоїда. Це підтверджує висновки дослідників, які також працюють з рослинами-регенерантами на різних видах, що регенеранти виникають переважно з клітин калюсу без цитологічних відхилень від модального каріотипу. Все разом це свідчить, що геном виду, незважаючи на всю свою онтогенетичну динамічність, зберігає сталість як носій генетичної інформації, яка створює чи забезпечує автентичність конкретного біологічного виду, навіть якщо на якихось етапах свого функціонування він проходить через певні стреси. В даному випадку, такими стресами є мікроклональне розмноження, культивування у клітинному

стані на середовищі, регенерація рослини. Немає жодної можливості заперечувати, що все вищезгадане – це фактори соматклональної мінливості, адже це доведено та задокументовано, як і доведено генетично-специфічну реакцію на подібні стреси. З літератури відомі і вдалі приклади отримання цікавих мутацій та їхнього закріплення потім у лінійному матеріалі. Проте, для нас звично думати, і ці думки спираються на всі наші уявлення про молекулярно-генетичні процеси, що відбуваються у живому організмі, та мікроеволюційні процеси, що протікають у популяціях біологічних видів, що є механізми, які утримують цю мінливість в певних межах у момент формування наступної генерації. Ці механізми не дають так просто змінитися консолідованому геному і у такому зміненому вигляді дати фертильних нащадків з конкурентоспроможною пристосованістю.

Отже, за даними автора, спектри ПЛР-ампліфікації з ISSR праймерами не виявили відмінностей між вихідними рослинами та продуктами мікротклонального розмноження після великої кількості пасажів, не було і відмінностей між окремими клонами, що пішли від одного і того самого генотипу. При контролі хромосомних чисел – вихідне число зберігається у соматоклонах, отриманих від диплоїдів. У рослин з В-хромосомами та гіпотриплоїда було зареєстрована мінливість за кількістю хромосом, проте ця мінливість була притаманна і вихідним рослинам (табл. 3.1). Все це дає змогу стверджувати, що щучник антарктичний є вид, придатний для введення в культуру, регенерації та мікротклонального розмноження без руйнівного впливу цих чинників на його геном.

При читанні дисертації виникли деякі питання та зауваження, що потребують пояснення.

У літературному огляді:

1. У підписах до рисунків немає посилань на літературне джерело.
2. На стор. 30 два останні речення. Посилання на МакКлінток та типи стресу – дуже нечітко і не зрозуміло, автор дисертації розуміє, що там написано?

3. Приклад помилкового цитування. На стор. 32 джерела 30 та 31 помінено місцями і це викликає страшне обурення. Тому що сучасним авторам, хай це і відомі Heslop-Harrison та Schwarzacher приписується відкриття того, що було описано ще в 1958 році дослідниками, які стали легендою цитогенетики ще тоді. Одночасно закрадається думка: а скільки ж таких помилок з цитування є у роботі, просто вони не є такими, на які звернув увагу опонент.
4. Стор. 47. «Формування елементів суцвіття відбувається в апексі, що перебуває в основі трубки, де й відбувається запилення.» Питання до автора тексту: що таке у злаків трубка і як в її основі може відбуватися запилення? Тим більш, що поряд з клейстогамними квітками у виду у наявності хазмогамні, як виходить з тексту огляду.
5. «Разом з тим відомо, що у *D. antarctica* статеве розмноження із цвітінням відбувається рідко, а дозрівання насіння дуже залежить від кліматичних умов, що лімітує завершення утворення гамет.» Яким чином дозрівання насіння може біти пов'язаним з утворенням гамет? Ініціація утворення насіння – так, залежить, але як залежить дозрівання?

Щодо розділу «матеріали та методи»:

1. Судячи з таблиці 2.1 місьць збору було 8, паростки з насінин отримали з них усіх, але ніде не вказано, скільки саме паростків. А на стор.71 написано, що для проточної цитофлюориметрії використано 2-3 рослини кожного генотипу. Кожен генотип – це окремий паросток з насіння певної субпопуляції? Чи це продукти мікроклонального розмноження?
2. Чи варто кожному застосовану методику попереджати загальною інформацією про сферу її застосування та труднощі, які потрібно долати для її реалізації (стор.64-66, 72)? Зазвичай цього не роблять.
3. Статистичні методи розроблені та застосовуються для опису отриманих даних та перевірки статистичних гіпотез, які висуваються

при аналізі цих даних за допомогою статистичних критеріїв. Статистичний критерій вказує, наскільки ми помиляємось (на 5% чи на 1%), коли приймаємо чи спростовуємо певну гіпотезу. Визначення генетичних відстаней не є статистичною процедурою хоча б через те, що при їхньому визначенні статистична похибка не визначається та статистичні критерії для оцінки цих відстаней не застосовуються. Тому потрібно було створити окремий пункт 2.8. Кількісна оцінка генетичного поліморфізму.

Щодо розділу 3.

1. Начебто коли приводимо мікрофото, прийнято вказувати об'єкти в окуляр у підпису до рисунка.
2. Як видно з таблиці 3.1 з 14 вивчених генотипів п'ять було представлено кількома рослинами, 3 та 4, решта популяцій – однією рослиною. В трьох випадків з п'яти всі метафази мали одну і ту саму кількість хромосом, 26. В двох випадках різні метафази мали різні кількості хромосом. Не зрозуміло, чи корінці фіксувались як суміш зі всіх рослин і тоді вже не можна було охарактеризувати кожен рослин окремо. Чи фіксувались окремо і тоді є інформацію за мінливістю за кількістю хромосом для кожної рослини. Чому тоді це не показано у таблиці? Це ніяк не коментується у обговоренні результатів і на цьому інформація, можливо, втрачається. І те саме питання до табл.3.5: дослідити по 5 рослин і все об'єднати – для чого?
3. Є незрозуміле протиріччя між таблицями 3.1 та 3.2. В останній для всіх генотипів вказано кількість рослин зі встановленим хромосомним числом 2-3, а в таблиці 3.1 в багатьох випадках по одній рослині. Потрібно пояснити.
4. Невдале наповнення таблиці 3.6. Плоїдність >2 – це ж будь-який трисомік і в той же час гіпотриплоїд. Однак моносомік – це білядиплоїдне число хромосом, а гіпотриплоїд – білятриплоїдне. Йдеться про те, що неможливо зіставити текст, де йдеться про

біядиплоїдні числа, та дані таблиці. І те саме для <2 , але наскільки, чи можна стверджувати, що це біядиплоїдне число.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Роботу сплановано та успішно виконано як перший етап систематичного та багатогранного вивчення геному щучника арктичного з застосуванням сучасних цитологічних, молекулярних, молекулярно-генетичних методів. Етапи роботи відповідають поставленій меті, всі вони базуються на великому обсязі експериментальної роботи. Завдання виконано, мету досягнуто. Особливо привертає увагу практичне значення роботи, в якій показано, що з рослинами дослідженого виду можна працювати без постійного подальшого отримання все нових і нових насінин з місць зростання, використовуючи нащадків від мікроклонального розмноження. Достовірність сформульованих висновків сумнівів або зауважень не викликає, тому що вони повністю обґрунтовані результатами експериментальної частини. Дисертацію оформлено згідно вимогам ДАК МОН України до оформлення кандидатських дисертацій.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Результати дослідження, що містяться у дисертаційній роботі, повністю представлені у 7 статтях рецензованих фахових видань та 16 тезах доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних форумів спеціалістів. Зміст автореферату відбиває основний зміст дисертації.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертацію написано за результатами завершеного експериментального дослідження, націленого на вирішення конкретної наукової проблеми: вивчити особливості геному щучника арктичного за каріотипом та молекулярним паттерном за обраними маркерами у представників, взятих з популяцій, що зростають в різних місцях Аргентинських островів Прибережної Антарктики, та оцінити

їхню стабільність для представників з різних популяцій та за умов вирощування рослин *in vitro*. Робота відповідає вимогам п.11 постанови КМ України від 24 липня 2013 року №567 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», паспорту спеціальності 03.00.22 — молекулярна генетика, а її автор, Навроцька Дар'я Олександрівна, заслуговує на присудження їй наукового ступеню кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.22 — молекулярна генетика.

Зав. кафедри біології факультету
природничих наук Національного університету
“Киево-Могилянська академія”

доктор біол. наук професор
15 березня 2018 р.

Т.К. Терновська

Т.К. Терновська

