

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **Навроцької Дар'ї Олександрівни** «Мінливість геному *Deschampsia antarctica* E. Desv. в природі та культурі *in vitro*», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)) – один з двох видів судинних рослин, що ростуть на західному узбережжі Антарктичного півострова та прилеглих до нього островах. Генетична й біохімічна обумовленість таких ознак, як морозостійкість, стійкість до світлового стресу, високий рівень фотосинтезу за низьких температур та можливість існування в умовах підвищеної ультрафіолетової радіації робить цей вид надзвичайно цікавим об'єктом для дослідження, особливо зважаючи на його здатність не лише вегетувати, а й вільно розмножуватись у цих суворих умовах Антарктики. Це унікальний вид для вивчення механізмів, що відповідають за пристосування рослинного організму до навколишніх несприятливих умов. Крім того, геном *D. antarctica* може бути цінним джерелом генів, пов'язаних із стійкістю та адаптацією до абіотичних стресових чинників.

Відомо, що зовнішні стресори можуть створювати умови для виникнення структурних перебудов геному рослин, що проявляються у зміні хромосомного числа (міксо-, анеу- та поліплоїдії, появі В-хромосом), морфології та диференційного забарвлення хромосом, а також мінливості послідовностей ДНК. Тому вивчення процесів геномної мінливості в популяціях типових для Антарктики видів рослин має значне фундаментальне значення. Разом з тим, на сьогодні ще недостатньо відомостей про особливості генетичної мінливості у рослин щучника антарктичного за мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*. Відсутні дані про типи, спрямованість та глибину змін, які відбуваються за тривалого культивування калюсних культур. Практично не досліджена соматклональна мінливість у рослин-регенерантів *D. antarctica*. Залишається відкритим питання про генетичні механізми, які призводять до нестабільності геному культивованих клітин, та молекулярні процеси, які її супроводжують. У зв'язку з цим, дисертаційна

робота Навроцької Д.О., присвячена дослідженню особливостей структури та мінливості геному на цитогенетичному та молекулярно-генетичному рівнях у щучника антарктичного (*Deschampsia antarctica* E. Desv.) з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики є безумовно актуальною і практично значимою. Такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал як для поглиблення наших знань про генетичну стабільність та мінливість *in vivo* та *in vitro*, як одного із фундаментальних напрямів генетики рослин, так і для розробки практичних аспектів застосування генетичних підходів для створення нових сортів цінних господарських культур, здатних витримувати дію несприятливих умов навколишнього середовища.

В дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, що налічує 269 найменувань. Дисертація містить 12 таблиць і 27 рисунків.

У розділі 1 «Огляд літератури» розглянуто особливості мінливості геному соматичних клітин рослин за дії стресових умов, зумовлених зовнішніми і внутрішніми чинниками. Наведено значення поліплоїдії та наявності В-хромосом у каріотипі для еволюції та адаптації рослин до несприятливих умов довкілля. Описано вплив стресових умов культивування *in vitro* на геном рослин та визначено процеси, які зумовлюють виникнення соматональної мінливості. Дано детальну характеристику *D. antarctica* E. Desv.: описано таксономічне положення, наведено морфологічні особливості будови, узагальнено літературні дані щодо молекулярно-генетичних досліджень внутрішньовидового різноманіття. Охарактеризовано хромосомні числа інших представників роду *Deschampsia*. Викладений в літературному огляді матеріал свідчить про володіння дисертантом інформацією про сучасний стан проблеми, що дозволило їй вибрати адекватні методичні підходи для вирішення основної мети та завдань, які поставлені в роботі.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» детально описані умови проведення експериментів: рослинний матеріал; умови культивування

тканин *in vitro*; отримання асептичних проростків та умови вегетативного розмноження; отримання калюсних культур та підбір умов для їхньої проліферації; методи цитогенетичного та молекулярно-генетичного аналізу: диференційне забарвлення хромосом, флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH), проточна цитофлуориметрія, виділення ДНК, ПЛР-аналіз, електрофорез ДНК в агарозному гелі; статистичні методи обробки результатів досліджень.

У розділі 3 «Результати експериментальних досліджень» представлено результати власних експериментальних досліджень автора з вивчення особливостей структури та мінливості геному щучника антарктичного на цитогенетичному та молекулярно-генетичному рівнях. У результаті цитогенетичного аналізу рослин показано, що у більшості проаналізованих зразків було виявлено типовий для виду набір хромосом $2n=26$. Водночас, рослини деяких генотипів виявилися міксоплоїдами з анеуплоїдними клітинами. Показано, що розмах мінливості за числом хромосом у рослин генотипу DAR12 був у межах 13-28 хромосом з модальним числом 26, а частка анеуплоїдних клітин складала 7,7 - 26,7 %. Поряд із клітинами з 26 хромосомами було виявлено клітини з 1-2 В-хромосомами. Рослини генотипу Y66 мали гіпотриплоїдний набір хромосом $2n=36-39$ та містили у значній кількості анеуплоїдні клітини (до 25 %), а також невеликий відсоток диплоїдних та гаплоїдних клітин. Розмах мінливості за числом хромосом у таких рослин становив 13-39 хромосом, що відповідає гаплоїдному та триплоїдному набору цього виду. Модальний клас формували клітини з 36 хромосомами. Аналіз інших зразків з о. Великий Ялур виявив диплоїдний (Y62) та міксоплоїдний (Y67) генотипи.

Методом проточної цитофлуориметрії було встановлено, що середній вміст ДНК на ядро у диплоїдних рослин становив 10,88 пг/2С. Вміст ДНК у DAR12 з додатковими хромосомами був близьким до 10,86 пг/2С, що знаходиться в межах діапазону значень, отриманих для диплоїдних рослин. На противагу цьому, вміст ДНК у рослин гіпотриплоїдного генотипу Y66 ($2n=36-39$) становив 16,46 пг/2С, що в 1,5 рази більше, ніж середнє значення, отримане для диплоїдних рослин.

Для молекулярно-генетичного аналізу рослин *D. antarctica* було використано 10 ISSR та 4 IRAP праймери. Загалом, для досліджених зразків отримано 63 амплікони, серед яких 16 (25,4 %) були поліморфними. За даними ПЛР-аналізу було розраховано генетичні відстані між дослідженими генотипами за Жаккардом. Найбільш відмінними виявились генотипи W1 і DAR12, генетична відстань між якими дорівнювала 0,1803. Найменші значення в межах 0,0323–0,0645, було встановлено для групи генотипів, куди входили гіпотриплоїд, місоплоїд та диплоїди. Генетичні відстані між диплоїдними рослинами коливалися в межах 0,0476 - 0,1746. Проведені дослідження вказують на те, що відмінності між диплоїдними рослинами та гіпотриплоїдом, або генотипом з В-хромосомами не перевищують рівня відмінностей між окремими диплоїдними рослинами.

В результаті аналізу флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) з послідовностями генів 5S рРНК і 45S рРНК в якості зондів, було виявлено 10 сайтів 5S рРНК локусів і 4 сайти 25S рРНК локусів у каріотипі диплоїдних рослин генотипів G/D12-2a, R35, S22, DAR12. У каріотипі гіпотриплоїда Y66 було виявлено 14 сайтів 5S рДНК в проксимальних регіонах 8 хромосом та в термінальних регіонах 6 хромосом. і 6 сайтів 25S рДНК, які знайдені в проксимальних та термінальних регіонах 6 хромосом. Використання в якості зондів теломерних та центромерних послідовностей дозволило підтвердити наявність додаткової хромосоми в каріотипі рослин DAR12.

Автором вперше проведено вивчення генетичної мінливості *D. antarctica* за мікроклонального розмноження та тривалого культивування *in vitro*. Молекулярно-генетичний аналіз вихідних рослин для яких попередньо було знайдено відмінності за числом хромосом, з використанням 10 ISSR-праймерів виявив 106 ампліконів, з яких 39 (35%) були поліморфними. Значення попарних генетичних відстаней Жаккарда між різними генотипами були в межах 0,1446–0,2772. В результаті порівняльного молекулярно-генетичного аналізу вихідних рослин і їхніх тривало-культивованих нащадків, взятих через різні проміжки часу, відмінностей у спектрах ПЛР-продуктів не виявили ані для рослин із диплоїдним каріотипом, ані для гіпотриплоїда та рослини з В-хромосомами.

Цитологічний аналіз показав, що на відміну від рослин з типовим для виду числом хромосом $2n=26$, у яких за тривалого культивування воно не змінювалось, у рослин із додатковими хромосомами та гіпотриплоїда (DAR12 та Y66) спостерігалась мінливість кількості анеуплоїдних клітин залежно від пасажу культивування. Показано збереження генетичних характеристик за ISSR-ПЛР та цитогенетичного аналізу у рослин-клонів *D. antarctica* за мікроклонального розмноження та тривалого (впродовж 57–79 пасажів) культивування *in vitro*. Генетичних відмінностей ані всередині кожної з груп рослин одного генотипу, ані порівняно із вихідним предком не виявлено.

У результаті вивчення числа хромосом в клітинах калюсних тканин *D. antarctica*, отриманих від рослин п'яти генотипів з різним числом хромосом, виявлено їх нестабільність: частка клітин з різним рівнем плоїдності змінювалась від пасажу до пасажу у кожному дослідженому варіанті калюсу. Калюс генотипу Y66 ($2n=36-39$) характеризувався наявністю більшої кількості клітин з гіпотриплоїдним набором хромосом. У клітинах калюсу DAR12 ($2n=26+0-2B$) відмічали наявність метафаз, що містили мікрохромосоми. Найбільший розмах мінливості числа хромосом (18–63) виявлено у калюсі, отриманому від диплоїдної рослини G/D12-2a ($2n=26$). Найменша мінливість числа хромосом була виявлена у калюсі R35 (16–52 хромосом). Модальний клас в культурі тканин *D. antarctica* формували диплоїдні клітини та клітини з біядиплоїдним числом хромосом. Найвищий рівень анеуплоїдії було виявлено у культурі тканин генотипу R35 (60,6 %), а найменшу кількість анеуплоїдних клітин виявлено у калюсі S22 (44,0 %). Отримані дані свідчать про підвищену хромосомну мінливість в клітинах калюсних культур *D. antarctica* на початкових етапах культивування та збереження цитогенетичних характеристик у рослин диплоїдних генотипів G/D12-2a, DAR12, S22.

Автором вперше досліджена соматклональна мінливість рослин-регенерантів. У регенеранта R-1 (який походив від диплоїда G/D12-2a) було виявлено значну частку анеуплоїдних клітин, а рослина R-2 (диплоїдного походження від R35) була диплоїдною з числом хромосом $2n=26$. У регенерантів гіпотриплоїдного походження зустрічалися клітини з числом

хромосом $2n=26, 28, 33, 36$. Встановлено, що здатність до регенерації притаманна як для диплоїдних, так і для гіпотриплоїдного генотипів рослин. У всіх соматоклонів, незалежно від плоїдності вихідного експланту, виявлено переважання диплоїдних клітин у проліферативному пулі.

У розділі 4 «Аналіз і узагальнення результатів дослідження» стисло і чітко узагальнені результати досліджень, які підтверджують обґрунтованість робочої гіпотези автора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України відповідно до державних 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.

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором *вперше*: проведено комплексне дослідження мінливості геному на хромосомному та молекулярному рівнях: встановлено хромосомне число для рослин з регіону Аргентинських островів Морської Антарктики (район Української антарктичної станції «Академік Вернадський»), що знаходиться на південному краю ареалу виду; знайдено нові хромосомні форми – рослини з гіпотриплоїдним набором хромосом, міксоплоїдні та з В-хромосомами. Визначено розмір геному ($2C/pg$) рослин з різним числом хромосом. Проведено порівняльний молекулярно-генетичний аналіз рослин з різним числом хромосом та показано їхню генетичну подібність. Встановлено хромосомну локалізацію генів 5S рРНК і 45S рРНК, теломерних і центромерних повторів у геномі рослин з різним числом хромосом за допомогою методу флуоресцентної *in situ* гібридизації. Показано генетичну стабільність рослин з різним числом хромосом на хромосомному і

молекулярному рівнях за тривалого мікроклонального розмноження. Проведено цитогенетичний аналіз калюсних культур і рослин-регенерантів, отриманих від рослин з різним числом хромосом, і показано домінування клітин із диплоїдним та білядиплоїдним числом хромосом.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані автором результати є складовою частиною комплексної оцінки стану рослинності в Антарктичному регіоні і складають основу для подальшого моніторингу стану антарктичних екосистем за впливу людської діяльності та кліматичних змін у регіоні. Використання цитогенетичних, молекулярних та біотехнологічних підходів дозволяє застосувати отримані дані щодо особливостей мінливості і добору в популяціях рослин *D. antarctica* як основи адаптації організмів, а також вивчати пристосування природних, модельних і штучних клітинних систем до екстремальних умов існування. Створена колекція генотипів рослин *in vitro* та калюсних культур *D. antarctica* є перспективним модельним об'єктом для подальших молекулярно-генетичних досліджень. Культура тканин виду може бути використана як джерело для пошуку біологічно-активних речовин та інших біотехнологічних розробок. Наукові результати роботи можуть становити інтерес для науково-дослідних установ та вищих навчальних закладів при викладанні лекційних курсів, проведенні лабораторно-практичних робіт з дисциплін «Генетика» та «Генетика популяцій» для студентів біологічних та екологічних спеціальностей.

Теоретичне значення результатів досліджень. Дослідження особливостей структури та мінливості геному *D. antarctica* на цитогенетичному та молекулярно-генетичному рівнях поглиблюють та розширюють уявлення: про стабільність та мінливість геному в популяціях рослин *in vivo* та в культурі *in vitro*; генетичні механізми, які призводять до нестабільності геному культивованих клітин та молекулярні процеси, які її супроводжують; генетичні та фізіологічні основи детермінованості процесів морфогенезу в умовах *in vitro*.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант опрацював значний масив даних літератури стосовно особливостей мінливості геному

соматичних клітин рослин за дії стресових умов, зумовлених зовнішніми і внутрішніми чинниками. Понад 80 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати великий обсяг експериментального матеріалу, який чітко та послідовно викладений в розділах власних досліджень та аналізу результатів. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: культивування рослинних тканин *in vitro*, цитогенетичний аналіз, диференційне забарвлення хромосом, флуоресцентна *in situ* гібридизація (FISH), проточна цитофлуориметрія, виділення ДНК, ПЛР аналіз, електрофорез ДНК в агарозному гелі, методи статистичного аналізу даних.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу великого фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням методів досліджень. Достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. Тому, вважаю, що наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на міжнародних наукових форумах. Зокрема, за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 20 наукових праць, з яких 7 статей у фахових виданнях, що входять до переліку затвердженого МОН України, та тези 13 доповідей наукових конференцій та конгресів.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.

Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Проте слід зазначити деякі слабкі місця представленої роботи:

1. Текст дисертації містить деякі граматичні та стилістичні помилки: «алелей» замість алелів (с.32); «засушливі» (с.34) та «засуха» (с.48) замість посушливі та посуха; «наслідуючи» (40) замість успадковуючи;

«аналіз апікальної меристеми» (с.67) замість аналіз клітин апікальної меристеми; «перетяжка» (с.93) замість перетинка і т.і.

2. Краще було б писати не «визначити розмір геному методом проточної цитофлуориметрії», а визначити вміст ДНК, оскільки даний метод дозволяє визначити саме масу ДНК на ядро. На сьогодні розмір геному прийнято вимірювати у парах нуклеотидів, кіло- та мегабазах, а не за масою ДНК (2С/пк).
3. Не зовсім коректно писати «непрямі» регенеранти, якщо вони індуковані з калюсних культур. Існує прямий та непрямий органогенез, а регенерант - це рослина, незалежно від способу її отримання.
4. Не зрозуміло, чому цитоміксис (с.39). віднесено до **хромосомних** мутацій ?
5. Не зовсім вдала назва розділу 3.1.1. « Дослідження цитогенетичних особливостей **каріотипу** виду», оскільки тут мова йде не саме про каріотип (структурну організацію хромосом) і кількість метацентричних, телоцентричних і т.д. хромосом, а про рівень пліодності, тобто кількість хромосом у клітині.
6. У табл. 3.6 потрібно було б вказати загальну кількість проаналізованих клітин.
7. Прийнято писати не маркер молекулярних розмірів, а маркер молекулярних мас. Для точного визначення розміру фрагмента потрібні спеціальні програми.

Проте вказані зауваження не носять принципового характеру і не знижують наукової цінності дисертації.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів генетики. Результати роботи Навроцької Д.О. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках інститутів, що займаються генетикою рослин, проблемами збереження та відтворення генофонду цінних культур, а також в курсах лекцій з клітинної біології, генетики популяцій та молекулярної генетики рослин Київського національного

університету ім. Т. Шевченка, Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.
 Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, рецензована дисертаційна робота «Мінливість геному *Deschampsia antarctica* E. Desv. в природі та культурі *in vitro*», є завершеною науковою роботою, яка виконана на сучасному науково-методичному рівні, є новим етапом розвитку спеціальної генетики цінних культур, та цілком відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Навроцька Дар'я Олександрівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,
 пров. н. сп. відділу генетичного
 поліпшення рослин Інституту фізіології
 рослин і генетики НАН України,
 доктор біол. наук



О.В.Дубровна

