

ВІДГУК

офіційного опонента,

на дисертаційну роботу Попович Юлії Андріївни «Поліморфізм генів гліадинів в сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої», висунуту на здобуття наукового ступеня доктора філософії, з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність обраної теми та зв'язок з науковими програмами

Світовий генофонд пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L) утворюють кілька тисяч сортів цього виду, частина з яких, подекуди, займає площі у мільйони гектарів. Інша частина сортів, створених селекціонерами раніше, все ще використовуються у селекційних програмах як джерела господарсько-корисних ознак чи екологічної пластичності для сучасних сортів і зберігаються у колекціях генетичних банків світу. Пшениця м'яка разом із рисом та кукурудзою увійшла до трійки культурних рослин, що забезпечують людство понад 70 відсотками білка завдяки своїй продуктивності, спроможності культивуватися на величезному ареалі, переважно помірної зони, включно з регіонами ризикованого землеробства. Білки зерна пшениці є збалансованими за амінокислотним складом. Зерно використовується для харчування людини і тварин. Гени, що контролюють синтез запасних білків у пшениць уже понад 50 років є у фокусі уваги дослідників. Продукти гліадинових генів відіграють критичну роль у формуванні ознаки «хлібопекарська якість борошна». І саме в Україні було виявлено зв'язок між цією ознакою у сортів пшениці і відповідним алелем гліадинового локусу. Локуси гліадинів, які локалізовано на хромосомах 1 та 6 гомеологічних груп всіх трьох субгеномів пшениці м'якої утворюють кластери. Вивчення структури гліадинових локусів як за різноманітністю генних продуктів, так і за нуклеотидною організацією, дало практичний результат у вигляді каталогізації сортів цього виду за алелями гліадинових локусів, які ідентифікуються за певними блоками гліадинів на електрофореграмах. Жоден новий сорт пшениці м'якої у провідних селекційних закладах України і світу зараз не створюється без аналізу вихідного

селекційного матеріалу за локусами генів, що кодують гліадини і глютеніни. Зі сторони фундаментальної науки – основним напрямком, що сформувався відносно недавно, є використання кластерної структури генів гліадинів як моделі, що її можна використовувати для вивчення молекулярних механізмів, які відбуваються у геномах вищих еукаріот, рослин зокрема.

Роботу Ю. Попович присвячено встановленню поліморфізмів у сортів пшениці м'якої за допомогою алель-специфічних праймерів, створених раніше до трьох гліадинових локусів: *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1*. Автор роботи взялася за важливе завдання зі встановлення відповідності між алелями за гліадиновими генами, встановленими з використання ПЛР та алелями гліадинів, які зареєстровані за результатами експресії гліадинових кластерів за електрофоретичними спектрами білків у АРААГ і для яких створено каталоги алелів світової колекції сортів пшениці м'якої. Необхідність удосконалення і розвиток системи добору за допомогою маркерів, яку започаткувало у селекції рослин саме використання запасних білків, як генетичних маркерів, у 70-і роки 20 сторіччя є безсумнівним. Створення на основі ПЛР системи маркерів, яка мала б стати доповненням до наявної системи є актуальним завданням. Рецензент вважає, що вивчення будови гліадинових кластерів у низки видів із триби Triticinae через аналіз наявних сиквенсів та через секвенування генів у досліджуваних генотипів є завданням, не менш актуальним, ніж прикладна сторона питання.

Дослідження виконувалось у ОНУ ім. І.І. Мечникова протягом 2019-2023 рр. у межах наукової теми кафедри молекулярної біології, біохімії та генетики №308 «Еколого-генетичні аспекти адаптації та генетичний поліморфізм живих систем», Державна реєстрація №0121U109169 (01.02.2021-31.12.2025).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність

Положення і висновки, наведені у дисертаційній роботі Ю. А. Попович, обґрунтовано значними вибірками рослинного матеріалу. План досліджень є

логічним, а застосовані методи є сучасними й інформативними. Достовірність отриманих результатів забезпечується відтворюваністю результатів у ході виконання дослідження. Важливим елементом роботи є використання засобів біоінформатики для аналізу даних і створення послідовностей праймерів, що фланкують нуклеотидні послідовності інтересу. Висновки відображують основні результати дослідження та узагальнюють виявлені закономірності.

Наукова новизна положень, результатів і висновків дисертаційної роботи

Наукова новизна дисертації Ю. Попович полягала у встановленні зв'язку між алелями локусів гліадинових генів, які виявляли через встановлення поліморфізму у розмірі продуктів ПЛР з праймерами, специфічними до гомеолокусів *Gli* із алелями гліадинових кластерів, які ідентифікуються за генними продуктами у білковому електрофорезі. Автор аналізувала низку сортів, створених у селекційних установах України, та колекцію сортів світової колекції. Загалом понад 150 сортів різного походження. Цікавою частиною роботи було створення праймерів до ділянки, що кодує продукт γ -гліадину локуса *Gli-A1*.

У роботі показано можливість використання праймерів до внутрішньогенного мікросателіту разом із праймерами, що покликані дискримінувати окремі алелі за локусами генів *Gli* у споріднених до пшениці м'якої видів пшеницевих.

Практичне значення отриманих результатів

Робота фактично впроваджена для докторів філософії за ОНП «Біологія» за спеціальністю 091 Біологія та біохімія на Біологічному факультеті ОНУ імені І.І. Мечникова, та рекомендована як корисна модель при виконанні кваліфікаційних робіт в ОНУ.

Повнота викладу результатів дисертаційної роботи та наукових положень в наукових публікаціях за темою дисертації, апробація роботи

Автором разом із співавторами опубліковано чотири наукові статті, три з яких опубліковані у журналах, що входять до бази Scopus, у тому числі дві у журналах 1 та 2 квартилю, одна стаття у фаховому виданні. Матеріали дослідження доповідалися на міжнародних та вітчизняних конференціях, автор має вісім тез доповідей. Загалом же за темою дисертації оприлюднено 12 публікацій.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація побудована за такою схемою: вступ, огляд літератури, розділ матеріалів та методів досліджень, три розділи з описом результатів досліджень, окремий пункт з узагальненням результатів досліджень, висновки, список використаних джерел та два додатки. Загальний обсяг дисертації – 194 сторінки друкованого тексту, що містить 28 рисунків та 23 таблиці. Список використаних джерел складає 160 найменувань, переважно англомовних.

Відсутність чи наявність порушення академічної доброчесності

У роботі ми не виявили ознак академічного плагіату, фабрикування, фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві зазначено особистий внесок дисертанта. Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи.

Загальна характеристика роботи

У літературному огляді автор дисертації аналізує літературу, що стосується кількох аспектів: спочатку наведено загальні уявлення про структуру геному *Triticum aestivum* L., далі інформація про запасні білки у пшениці, будову гліадинкодуювальних локусів та експресію генних продуктів. Пізніше наводиться інформація про розподіл гліадинових алелів у різних зразках пшениць різного селекційного походження та асоціації алелів, притаманних певним сортам пшениці м'якої і хлібопекарських властивостей

цих сортів і нарешті наводиться інформація про дослідження гліадинових генів на рівні нуклеотидів.

У розділі 2 містить перелік сортів та ліній, що їх аналізувала дисертант, також, з необхідною повнотою, описано основні методи, якими було отримано обговорювані у роботі результати. У розділах 3-5 та пункті «узагальнення результатів» автор роботи детально описує отримані у ході дослідження результати. Спочатку це аналіз поліморфізму наявних у неї генотипів за генним локусом *GLI-B1*, який автор роботи виявляла за ПЛР та шляхом АРААГ білків гліадинів. Два наступні розділи є, по-суті, подібними за структурою і стосуються аналізу поліморфізмів за локусами *Gli-A1* та *Gli-D1*, відповідно. Важливим елементом усіх цих розділів є використання біоінформатичного пошуку для аналізу нуклеотидних послідовностей із наявних баз даних та секвенованих послідовностей, отриманих за результатами власних досліджень. Аналіз сиквенсів виконано з достатньою повнотою та уважністю. У підрозділі «Узагальнення результатів» автор коротко згадує найважливіші, на її думку, положення дослідження. Дослідження є самостійним дослідженням, яке базується на реальних даних і демонструє самостійність у аналізі отриманих даних.

Проте, у опонента у ході прочитання роботи виникла низка зауважень і запитань, на які автору дисертації варто зреагувати, дати відповіді або пояснити, що саме опонент не зрозумів у тексті.

По всьому тексту автор роботи вживає словосполучення «біоінформаційний аналіз». Але це словосполучення має походити не від слова інформація (будь який аналіз це, зрештою, аналіз інформації), а від слова інформатика і є аналізом даних засобами біоінформатики. Має бути «біоінформатичний аналіз».

В тексті дисертації, висловлюючись генетичною мовою, присутні делеції, інсерції букв у словах, дуплікації букв, іноді слів.

У огляді літератури на стор. 38 автор пише, що «опираючись на великі нуклеотидні послідовності...було створено генетичні карти *Gli-1* та *Gli-2*

локусів». Виходячи з малюнка, до якого читача відсилає автор роботи, тут мова іде не про генетичну карту, відстань між генами на якій визначається у категоріях сантиморганід, а карта фізична, відстань на такій карті визначають у парах основ. На стор. 48 автор пише: «Використання ДНК-маркерів для збільшення ефективності і точності звичайної селекції отримало назву маркер-асоційована селекція (MAS)». Такий переклад не точний: селекція англійською буде *breeding*, а MAS має бути перекладено, як «добір за допомогою маркерів», і у такому разі очевидною стає спрямованість роботи: добір бажаних генотипів за молекулярним фенотипом, який дослідник отримує у представників з популяцій, що розщеплюються на основі аналізу поліморфізмів макромолекул.

На стор. 66, при описі протоколу фарбування сріблом фрагментів ДНК у гелях читаємо таке: «частину відновного розчину ($12\text{гNa}_2\text{CO}_3$ (безводний) 200 мкл 0,019% формальдегід на 400мл H_2O)». Ця фраза не зрозуміла. На стор. 20 згадано реактив аргентум 11 нітрат. Такої сполуки не існує.

У таблицях 2.1, 3.1, 4.3 та у тексті дисертації згадується нулі-тетрасомна лінія сорту Chinese Spring N10T1B, а також, наприклад, лінія 1B1D. Оponent не знає, що це означає, оскільки таке позначення не відповідає загальновідомому позначенню нулі-тетрасомних ліній пшениці.

На стор. 85 автор завершує підрозділ 3.1 абзацом, сенс якого полягає у тому, що метод на основі ПЛР дасть змогу прискорити процес відбору рослин під час селекції, бо беручи ДНК з будь-якої частини рослини, можна не чекати зрілості зернівки. Але ж на рослині формується зернівка наступного покоління, а це має критичне значення при аналізі рослин з популяцій, що розщеплюються.

На стор. 105, у описі відносної рухливості фрагментів ДНК на фореграмі у ПААГ є помилка. Виглядає так, що різниця у рухливості фрагментів, які відрізняються на 30 пар нуклеотидів становитиме 0.75 см, а не 0.75мм, як написано у автора.

На стор. 107 автор описує результати секвенування продуктів ампліфікації *GliB1.1* – у сортів Gabo та Миронівська 808, які мають однакові за

довжиною фрагменти у 369 п.о. А на цій же сторінці нижче Юлія Андріївна описує результати секвенування цих продуктів, і виявляє, що сиквенси цих сортів відрізняються на один глютаміновий мікросателіт. Тобто на три нуклеотиди. Причина невідповідності у роздільній спроможності електрофорезу?

На стор. 114 автор робить спробу пояснити наявності двох алелів у деяких аналізованих генотипів. Як можливу причину називає «гетерогенність триплоїдного ендосперму». Термін гетерогенність слід використовувати для опису відмінностей між особинами у популяції, а наявність обох алелів у одній особині – це гетерозиготність. А от пояснення наявності обох алелів, як результат дуплікації певного району гену, що ампліфікується у ПЛР, на мою думку, цілком слушне.

У таблицях 3.5 та 4.2 загальна кількість сортів не є сумою сортів, які наведені у стовпчиках, де перераховані кількості сортів з певного селекційного центру України. Для розрахованих частот слід було навести похибку.

Як автор роботи може пояснити той факт, що деякі з проаналізованих нею за допомогою методу АРААГ сортів (от як Миронівська слава за локусом *Gli-A1*) мають інший алель, ніж можемо бачити у каталогах гліадинових алелів, наприклад, оприлюднених Н.О. Козуб.

Чому дендрограми, які відображені на малюнках 3.14 і 4.10 побудовано з використанням різних методів Neighbor joining та UPGMA, відповідно? Відомо, що в основі цих методів лежать різні алгоритми. Як ці дерева можна співставити?

Вказані запитання і зауваження не применшують значення роботи, як дослідження структури гліадинових генних кластерів і встановлення зв'язку між нуклеотидними послідовностями і ідентифікованими генними продуктами. Робота Ю.А. Попович є поступом у цьому напрямку. Опонент вважає, що без глибокого і всебічного вивчення будови гліадинових послідовностей як у культивованих, так і у дикорослих видів *Triticinae*, важко очікувати на значний прогрес у вирішенні прикладних питань. Адже наявність протяжних

поліглутамінових трактів, псевдогенів, дуплікацій, тощо зовсім не обов'язково приводить до змін у складі білків гліадинів, від властивостей яких залежить перспективність того чи іншого сорту за ознакою «хлібопекарська якість»

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Попович Юлії Андріївни «Поліморфізм генів гліадинів в сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої» є завершеним науковим дослідженням з актуального напрямку генетики рослин. Робота містить оригінальні результати, що мають як теоретичне, так і практичне значення. Дослідження містить нові дані про молекулярну організацію гліадинових кластерів у пшениць, описано алелі, які можуть використовуватися для характеристики сортів пшениці м'якої. Робота відповідає «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12.01.2017 року № 40, які висуваються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії. За своєю актуальністю, новизною отриманих результатів, обсягом виконаних досліджень, за повнотою оприлюднення результатів дослідження у науковій періодиці робота Попович Ю.А відповідає вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

Завідувач кафедри біології

Національного університету «Києво-

Могилянська академія», доктор біологічних

наук

АНТОНЮК М.З.

