

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Попович Юлії Андріївни, «Поліморфізм генів гліадинів у сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційної роботи. Локуси запасних білків у пшениці характеризуються високою різноманітністю, а склад запасних білків безпосередньо визначає рівень хлібопекарської якості борошна. Якщо для високомолекулярних субодиниць глютенінів достатньо простою є ідентифікація алелів як методом електрофорезу білків зерна, так і молекулярними методами, то для ідентифікації алелів гліадинових локусів ситуація є набагато складнішою. Відомо велику кількість гліадинових алелів, ідентифікованих електрофорезом гліадинів, проте наведені в літературі молекулярні маркери досі не дозволяли виявити таку різноманітність. Розробка молекулярних маркерів для ідентифікації гліадинових алелів дозволить спростити процес їх ідентифікації, дасть змогу визначати їх на стадіях ще до отримання зерна, що збільшить ефективність селекції. Тому тема дисертаційної роботи Попович Ю.А. є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Дослідження проведено на кафедрі молекулярної біології, біохімії та генетики (до реорганізації кафедра генетики та молекулярної біології) у 2019-2023 рр. Біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова у межах наукової теми кафедри №308 «Еколого-генетичні аспекти адаптації та генетичний поліморфізм живих систем», Держ. реєстрація №0121U109169 (01.02.2021-31.12.2025)

Наукова новизна та практична цінність досліджень. Показано відповідність між алелями, що визначаються праймерами Zhang et al. (2003) для локусів *Gli-A1* та *Gli-B1*, праймерами до мікросателіту *Taglgap* та алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-A1* та *Gli-B1* локусами у пшениці м'якої. Секвеновано низку алелів, одержаних з праймерами до мікросателіту *Taglgap* локусу *Gli-B1*.

Розроблено нові праймери до кодуєчої ділянки гена  $\gamma$ -гліадину, що знаходиться в локусі *Gli-A1*, показано відповідність між виявленими алелями та алельними варіантами гліадинів, що кодуються *Gli-A1*.

Продемонстровано можливість використання алель-специфічних праймерів, праймерів до мікросателіту TagIgar, а також розроблених у даному дослідженні праймерів до локусу *Gli-A1*, для аналізу поліморфізму видів, споріднених з *Triticum aestivum* L.

**Ступінь обґрунтованості і достовірності наукових положень і висновків, аналіз структури та змісту дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 194 сторінках, включає 23 таблиці, та 28 рисунків. Дисертація складається із вступу, 5 розділів, узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел, який містить 160 найменувань.

У **Вступі** обґрунтовано актуальність теми і наведено загальну характеристику роботи.

У **розділі 1 «Огляд літератури»** на основі аналізу літературних джерел узагальнено інформацію про запасні білки зерна пшениці та їх генетичний контроль з детальним описом гліадинів та їх генетичного контролю, а саме, структури різних груп гліадинів, експресії гліадинових генів, структури гліадинових локусів, різноманітності алелів гліадинів, їх розповсюдженості, пов'язаності з рівнем хлібопекарської якості, наведено інформацію про розробку праймерів для аналізу гліадинових генів з використанням ПЛР.

У **розділі 2. «Матеріали і методи»** наведено перелік сортів і ліній пшениці, які було досліджено, методику електрофорезу гліадинів в кислому поліакриламідному гелі, методику виділення ДНК, послідовності праймерів, використаних у роботі, умови ПЛР, методику електрофорезу ампліконів у поліакриламідному гелі, підготовку зразків до секвенування, алгоритми біоінформаційного аналізу.

У **розділі 3 «Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму *Gli-B1* локусу пшениці м'якої»** наведено результати порівняння поліморфізму локусу *Gli-B1*, що виявляється методами ПЛР та електрофорезом гліадинів, у двох

колекціях пшениці – світовій колекції, підібраній за принципом максимальної різноманітності гліадинових алелів та у вибірці українських сортів з різних селекційних установ. Проведено детальний біоінформаційний аналіз зустрічання послідовностей, що фланкуються обраними праймерами у пшениці та споріднених видів, охарактеризовано їх поліморфізм. Для уточнення розміру ампліконів проведено секвенування ампліконів, одержаних з праймерами до мікросателіту *Taglgap*. У результаті роботи виявлено відповідність для низки алелів та, більше того, виявлено різноманітність за застосованими маркерами всередині деяких алелів, які було визначено електрофорезом гліадинів, наприклад, для *Gli-B1b*.

У розділі 4 «Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму *Gli-A1* локусу пшениці м'якої» викладено результати дослідження різноманітності алелів із застосуванням електрофорезу гліадинів та алель-специфічних праймерів. При аналізі вибірки українських сортів показано, що двом ПЛР-алелям відповідали різні групи алелів, визначених електрофорезом гліадинів, і ця закономірність зберігалась і при аналізі світової колекції сортів. Проведено біоінформаційний аналіз послідовностей, що фланкуються обраними праймерами та, головне, розроблено праймери, що дозволяють виявляти поліморфізм за довжиною послідовності, що кодує поліглутамінову ділянку гамма-гліадина, причому як у пшениці, так і споріднених видів. Розроблена пара праймерів MsA1 дозволила виявити відповідність ПЛР-алелів до 8 алелів та груп алелів, що виявляються електрофорезом гліадинів. Окремо хочеться відмітити надійну диференціацію алеля *Gli-A1x* (відповідає блоку GLD1A9 за Поперелею) ПЛР-маркерами, оскільки його деяким дослідникам не вдається відрізнити від алеля *Gli-A1af* при аналізі електрофоретичних спектрів гліадинів. Перспективною є група з 10 нових розроблених праймерів для ідентифікації алелів *Gli-A1*.

У розділі 5 «Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму *Gli-D1* локусу пшениці м'якої» викладено результати дослідження різноманітності вибірок сортів за *Gli-D1* та за ПЛР з алель-специфічними праймерами. Для цього

локусу не вдалось знайти чіткої відповідності між ПЛР-алелями та алелями, визначеними електрофорезом гліадинів. Проведено біоінформаційний аналіз послідовностей, що фланкуються обраними праймерами, показано переважання алеля *Gli-D1.1* у пшениці м'якої та *Ae. tauschii*.

Матеріали дисертаційної роботи достатньо повно висвітлено у наукових працях, які опубліковано у виданнях, що входять до бази Scopus, у тому числі Q1, Q2, у фахових виданнях. Наукові положення, висновки є обґрунтованими.

### **Зауваження та побажання щодо змісту і оформлення.**

- Kasandra et al. на ст. 27 має бути Kasarda et al. У статті Wang et al. 2017 вказано, що до SRLL типу належить послідовність Gli- $\omega$ 3, а не Gli- $\omega$ 5, як наведено в абзаці 1 на ст. 36.
- При згадці про картування *Gli-A3* треба було б посилатись на статтю Собко, 1984.
- Щодо локусу *Gli-B3* (ст. 29) посилання Nieto-Taladriz et al., 1996; Anderson et al., 2009 є невідповідними. Посилання (Matsuo et al. 2005; Altenbach et al., 2007), у яких йдеться про омега-гліадини, є невідповідними для розгляду структури альфа і гама гліадинів (ст. 32). У посиланні 51. Hsia C. S., Anderson O. D. Isolation and characterization of wheat gliadin gene пропущено « $\omega$ » ( $\omega$ -gliadin). Це посилання є невідповідним для опису структури гамма-гліадинів (абзац 2 ст. 32), оскільки у ньому йдеться про омега-гліадини.
- Невдалою є фраза (ст. 32) «СІ домен С-термінальної ділянки складається з шести залишків цистеїну». У тексті зустрічаються вирази: амінокислотні основи, цистеїнові основи (ст. 32, 33, 35, 36). На ст. 34 – є «транзиція»
- У висновку 1 є невичитана фраза «у світовій вибірці описано 1 алелів, дванадцять найчастіше зустрічалися 216 п.н. та 270 п.н., відповідно.» У висновку 2 треба було б поміняти місцями кількості алелів для *Gli-A1*, *Gli-B1* світової колекції
- Щодо твердження, що « $\omega$ -гліадини *Gli-3* локусів тісно зчеплені з  $\gamma$ -гліадиновими генами» (ст 29), то насправді тільки *Gli-D3* є частиною *Gli-D1* (див. Raupе 1987). Локуси *Gli-A3* та *Gli-B3* знаходяться на відстані біля 20 сМ проксимально від відповідних локусів *Gli-1* і тому не є тісно зчепленими з ними і неправильним є твердження, що «Metakovsky et al. (2018) було висунуто припущення, що *Gli-3* є частиною *Gli-1* локусів» (ст. 29, абзац 3). Якраз Метаківський (Metakovsky et al. 2018; Metakovsky 2015) дивується тому, що деякі автори (зокрема в публікаціях Olin D. Anderson) виділяють гени омега-гліадинів в складі *Gli-1* в окремий локус *Gli-3*. Він пише (Metakovsky et al. 2018, Box3): “The use of the well-known symbol *Gli-3* to designate a region of *Gli-1* may mislead researchers and confound scientific results”. Те ж стосується твердження на ст. 42 : «Омега гліадини *Gli-3*

локусів також входять в дану класифікацію, і на думку авторів, даний локус є частиною *Gli-1* (Metakovsky et al, 2018)».

- У табл. 2.2 у сорту Панна має бути рік реєстрації 2003, а не 2014.
- Треба було б навести в дисертації електрофореграми з новими блоками гліадинів, що згадуються в розділах 3-5, а наведення рисунків зі статті Поліщук та інш. 2010 у розділах з експериментальними даними є надмірним.
- У тексті розділу 3.1 є різні варіанти довжини амплікона з ген-специфічними праймерами до *Gli-B1* сортів Безоста 1 і Миронівська 808. На рис.1 Безоста 1 (3) має фрагмент 372 п.н., що видно з фото, тут же підписано 372 для Миронівської 808, а в таблиці 3.1 для обох сортів наведено 369 п.н. Для сорту Альбатрос одеський в тексті на ст. 79 також наведено 372 п.н., а в табл. 3.1 – 369 п.н. Аналогічно, на ст. 87 написано «Переважає більшість сортів української колекції відносилися до підгрупи 2 характеризувалися *Gli-B1.1* алелем з розміром фрагментів ампліфікації 372 п.н.», а в табл. 3.3 для цих сортів наведено 369 п.н.
- Потребує корекції фраза на ст. 72 (останній абзац) «Електрофореграми перелічених алельних варіантів гліадинів, мають однаковий  $\gamma$ -гліадин що, імовірно, і є причиною виявлення однакових алелів у ПЛР, і розрізняються набором  $\omega$ -гліадинів». Серед перерахованих на ст. 72 (останній абзац) алелів *Gli-B1* – *i, j, k, m, o, p, r*, алель *j* кодує гамма-гліадин з більшою рухливістю ніж решта перелічених алелів. Можливо, зернівка, з половини якої виділяли ДНК мала інший алель, але це можна було б перевірити електрофорезом гліадинів з іншої половинки зерна.
- На рис. 3.14 на дендрограмі варто було б вказати назви сортів (як на рис. 3.13). На рис. 4.9 треба було б вказати, які послідовності відносяться до геному А, які до В, які до D.
- У розділі 4.1 у частини сортів ідентифіковано алель *Gli-A1x*. Ці сорти дійсно мають алель «х», але згідно з позначенням цього алеля, запропонованим в статті Kozub et al. 2009 р. У цій же статті вказано, що *Gli-A1x* позначено алель, що кодує блок гліадинів, який раніше Попереля позначив GLD 1A9. Про це також зазначалось у всіх наступних публікаціях, де наводили генотипи з *Gli-A1x*. У пізнішій публікації 2018 р. Метаковський дав позначення «х» зовсім іншому алелю що є комбінацією *Gli-A1a* та *Gli-A6b*. Тому це треба було б врахувати при обговоренні, але на цінність одержаних результатів це не впливає. Носії алеля *Gli-A1x* (блоку GLD 1A9) за Kozub et al. 2009 мають алель *Gli-A6a*, тому потребує корекції фраза першого абзацу на ст. 126.

Відмічені недоліки не впливають негативно на зміст дисертації, не принижують її актуальності, наукової новизни і практичного значення роботи.

#### **Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Дисертація Попович Ю.А. є закінченою науковою працею. Наведена в ній

інформація про відповідність алелів, одержаних ПЛР-аналізом, алелям, визначеним електрофорезом гліадинів, розробку нових праймерів та аналіз різноманітності алелів, одержаних з обраними праймерами в базах даних нуклеотидних послідовностей сприятиме подальшому дослідженню таких складних локусів як локуси запасних білків, вивченню різноманітності пшениці та інших видів з використанням ПЛР-праймерів до гліадинових генів та застосуванню таких ДНК маркерів в селекції.

Вважаю, що дисертаційна робота Ю.А. Попович «Поліморфізм генів гліадинів у сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої», представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», є закінченим науковим дослідженням та повністю відповідає вимогам до постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» прийнятій 12.01.2022р №44, містить нові науково обґрунтовані експериментальні результати проведених здобувачем досліджень, має наукову новизну і практичну цінність, а її автор Попович Юлія Андріївна заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент  
завідувач лабораторії екологічної  
генетики рослин і біотехнології  
Інституту захисту рослин НААН  
доктор біологічних наук

  
Н.О. Козуб

