

## РЕЦЕНЗІЯ

на дисертацію ПОПОВИЧ Юлії Андріївни «Поліморфізм генів гліадинів в сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої» на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія

Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) – одна з трьох провідних продовольчих культур у світі, а Україна входить у десятку найбільших виробників цієї культури. Селекцією пшениці займаються багато країн та міжнародних селекційних центрів. Хлібопекарська якість борошна одна з найважливіших проблем в селекції пшениці, якій приділяється значна увага як у світі, так і у нашій країні. Дана ознака визначається співвідношенням і поліморфізмом запасних білків ендосперму – гліадинів та глютенінів у глютенівому комплексі. Тривалий час для дослідження цієї ознаки використовували підхід, оснований на дослідженні фенотипів, які, як і багато інших біохімічних ознак, були однозначно прив'язані для генів. У практичній площині це означає використання електрофорезу в кислому ПААГ. Даний метод є складним для використання, оскільки на одній доріжці гелю присутні пептиди, що кодуються усіма гліадин-кодуючими локусами, які можуть перекриватися. Це обумовлено як триплоїдною природою ендосперму, так і існуванням блоків генів, які кодують запасні білки. Тому існує потреба у молекулярних маркерах, які б дозволили визначати алельні варіанти гліадинів спираючись на знання складу генів, які їх детермінують, зокрема за допомогою ПЛР. Це стане черговим кроком по перетворенню селекції з ремесла та мистецтва у технологію. Все вище сказане і визначає актуальність представленої роботи.

Робота виконувалася на кафедрі генетики та молекулярної біології (2019-2022 рр.) та кафедрі молекулярної біології, біохімії та генетики (2022-2023 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).

Результати дисертаційної роботи в достатній мірі апробовані на 11 міжнародних і спеціальних наукових конференціях та опубліковані в 12 друкованих роботах, в тому числі 3 статті у журналах, включених до міжнародних наукометричних баз, 1 статті у фаховому виданні України (категорія Б). Зміст статей відображає основні положення дисертації і відповідає її суті.

Структура роботи загальноприйнята і відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів ...». Обсяг дисертації – 191 сторінка друкованого тексту, в т. ч. 28 таблиць, 29 рисунків. Вона складається з переліку умовних позначень, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи», трьох експериментальних розділів, розділу «Узагальнення результатів», висновків, списку використаної літератури. Список використаних джерел нараховує 164 найменування, у тому числі 150 латиницею.

В ґрунтовному огляді літератури наведено особливості організації геному пшениці м'якої, розглянуто структуру та функції запасних білків ендосперму пшениці, докладно описано структуру гліадинів а також сучасні погляди на кількість генів, які їх детермінують, та на особливості експресії зазначених генів. Спираючись на вищевикладене автор розглядає поширення серед сортів пшениці різноманітних алельних варіантів гліадинів та досліджує їх зв'язок з хлібопекарською якістю, а також наводить огляд стану сучасних молекулярно-генетичних досліджень гліадинів і перспективи їхнього розвитку.

У розділі 2 детально охарактеризовано матеріал, який було використано для проведення досліджень, а також наведено методики проведення дослідів та обліку і аналізу результатів. Наведені математичні моделі й формули розрахунків.

Розділ 3 присвячений молекулярно-генетичному аналізу поліморфізму локусу *Gli-B1* з використанням алель-специфічних праймерів та праймерів до мікросателіту *Taglgap*.

Розділ 4 присвячений молекулярно-генетичному аналізу поліморфізму локусу *Gli-A1* з використанням алель-специфічних праймерів та праймерів до мікросателіту *Taglgap*.

Розділ 5 присвячений молекулярно-генетичному аналізу поліморфізму локусу *Gli- D1* з використанням алель-специфічних праймерів та праймерів до мікросателіту *Taglgap*.

В узагальненні автором упорядковано дані попередніх розділів, підведені підсумки досліджень та співставлено результати досліджень з роботами інших авторів.

Завершується робота шістьма добре обґрунтованими узагальнюючими висновками, які, без сумніву, будуть корисними як для подальших генетичних досліджень хлібопекарської якості пшениці і можуть бути запропоновані для виділення цільових маркерів для селекції за даною ознакою.

Тепер щодо зауважень (по ходу роботи).

На с. 15 (і далі повертається до цього на с. 47) авторка вказує як одну із задач селекції пшениці створення сортів із низьким вмістом чи відсутністю глютену. І до цієї тези повертається неодноразово по ходу роботи, наводячи навіть дані, які вказують на можливість досягнення цієї мети. Однак з огляду на те, що проблема глютену, обумовлена спадковою хворобою целиакією торкається не більше 3% населення, а селекція у теперішній час все більше стає технологією, то постає питання, а чи рентабельно вирішувати цю проблему саме селекційним шляхом, а після цього як забезпечувати виробництво і логістику такої продукції? В той же час набагато дешевше методами харчової промисловості можна створювати відповідні безглютенові продукти для цільових споживачів.

На с. 17, цитуючи роботу Коваля і Метаковськи, 2018 авторка пише, що у кожному регіоні, як правило, вирощуються сорти, що характеризуються певним набором алельних варіантів, типовим для даного регіону, що пов'язує їх з адаптацією до певних кліматичних умов, таких як морозостійкість, стійкість до стеблової іржі. Це дещо декларативно. Якщо такий зв'язок існує насправді, то треба розяснити суть цього зв'язку (зчеплення генів або опосередована дія). До того ж морозостійкість, стійкість до стеблової іржі – це властивості рослини, але ніяк не кліматичні умови.

Далі на с. 17: Секвенування гліадин-кодуєчих локусів та окремих генів гліадинів. Про що йде мова: кластери генів = локус, або локус = ген, але різні алелі? Потребує уточнення.

С. 18: робота присвячена дослідженням поліморфізму гліадинів за допомогою методу електрофорезу в кислому ПААГ та пошуку і аналізу поліморфізму *Gli-1* локусів з використанням молекулярних маркерів. ДНК-маркерів? А хіба белкові маркери не є молекулярними?

Далі на с. 18: Проаналізувати поліморфізм *Gli-A1*, *Gli-B1* та *Gli-D1* локусів ... у сучасних українських сортів та світової колекції сортів пшениці м'якої. Формулювання світова колекція зустрічається і далі у роботі. Навіть 50 зразків, наданих проф. Метаковськи не відображають всього різноманіття світового генофонду пшениці м'якої. Це число навіть менше, ніж кількість країн, які займаються селекцією пшениці. Хоча у відношенні досліджуваної ознаки проф. Метаковський, ймовірно, створив репрезентативну вибірку зі світової колекції, тому, на мій погляд, правильніше казати про колекцію Метаковського, а не про світову колекцію.

С. 21. Чому не включена доповідь на Гамовській конференції 2023 р.?

С. 23. Налічується приблизно 94–96 тисяч генів у геномі пшениці м'якої, з частотою генів від одного на 87000 п.н. до одного на 184000 п.н. Мабуть розмірами, а не частотою генів?

С. 24. Найбільш досліджуваними і важливими для селекції є гени, пов'язані з агрономічно цінними ознаками, такими як кількісні ознаки, стійкість до хвороб та абіотичних стресів, а також гени, що визначають адаптацію та урожайність. Потребує уточнення, адже і урожайність, і окремі ознаки адаптивності – це кількісні ознаки.

С. 25: У борошні гліадини, високо- і низькополімерні глютеніни містяться у наступній кількості – 40, 7,5 та 32,5 %. Потребує редагування, не зразу можна зрозуміти де кома перелічення, а де відділяє десяті.

С. 25: Крім цього, у невеликій кількості борошно містить інші запасні білки – гліадин-подібні білки, тритицини, глобуліни, а також амілази, інгібітори протеаз,

які захищають від комах та грибів, різні ферменти. Потребує редагування, адже амілази – це ферменти.

С. 33: За іншими даними у гексаплоїдній пшениці міститься близько 50%  $\alpha$ -гліадинових генів, що є псевдогенами, а в її предкових диплоїдних видів – 87%. Викликає сумнів, що диплоїдні види несуть набагато більше псевдогенів, ніж гексаплоїдний вид. Якщо ж це справедливо, то має відбуватися цілеспрямований процес елімінації псевдогенів в процесі еволюції алополіплоїда. До речі, треба обережніше застосовувати термін «предкові види», адже в еволюційних дослідженнях сучасні види, в даному випадку, близькі до донорів субгеномів м'якої пшениці, є двоюрідними або троюрідними родичами пшениці і нащадками цих донорів. До речі, у егілопсів є інша проблема, пов'язана з генетичним «мусором» – наявність В-хромосом, де ізолюється так звана егоїстична ДНК. Вряд лі сюди можна віднести гени гліадинів.

С. 35: У генів *Gli- $\gamma$ 5* і *Gli- $\gamma$ 10* була одна додаткова цистеїнова основа. Гени *Gli- $\gamma$ 5* і *Gli- $\gamma$ 10* містили додатковий триплет, що кодує цистеїнову основу? Відредагувати.

С. 36: проте псевдоген  $\delta$ -D1 експресувався навіть краще, ніж ген  $\delta$ -B1. А чи є він тоді псевдогеном, якщо експресується?

С. 42: між лініями, що відрізнялися алельними варіантами, які кодуються хромосоною 1В. Мабуть все ж які локалізовані на хромосоммі 1В?

С. 42: На основі великого експериментального матеріалу Ф. А. Попереля [Созинов, Попереля, 1979] провів ранжування алельних варіантів гліадинів... Мабуть не зовсім коректно до іншого співавтора?

С. 43. Варто відзначити, що *Gli-1* локус зчеплений з різними генами стійкості R, Що це за гени? Зазвичай вони позначаються аббревіатурами за відповідними ознаками.

С. 43. блок GLD 1B3, який є маркером 1B/1R транслокацій, негативно впливає на якість борошна, проте він є несприйнятливим, для всіх рас стеблової іржі, Потребує редагування, адже несприятливість до хвороби є властивістю рослини а не блоку гліадинів.

С. 46. Найбільш токсичним (імунодомінантним) вважається 33-мерний пептид (LQLQPFQRPQLPYRQRPQLPYRQRPQLPYRQRPQPF), який присутній в  $\alpha 2$ -гліадину. Варто розшифрувати, або застосувати загальноприйняті позначення амінокислот.

С. 51. Метаковський к.б.н.?

С. 57: 5 зернівок для електрофорезу і 5 – для ПЛР. Це були загальні наважки з 5 зернівок або окремо по кожному зерну. Якщо останнє, то чи була варіація між рослинами?

С. 61. Що означають літери F і R в табл. 2.3?

С. 66, 103. Власна програма. Ви є автором програми?

Хто здійснював секвенування і яким методом?

С. 70. сорти із 1RS/1BL транслокацією. Про що йде мова: просто послідовність, характерна для ДНК жита або послідовність, яка пов'язана з алелями, що кодують секаліни?

С. 73: Таким чином *Gli-B1.2* алель з фрагментами ампліфікації 415 п.н. та *Gli-B1a* алельний варіант знайдений лише у сорту Chinese Spring та нулі-тетрасомних ліній, створених на його основі. Нічого дивного, адже Chinese Spring – ендемічний сорт у якого навіть зберіглися рецесивні алелі *kr*, завдяки яким сорт легко вступає у міжвидову гібридизацію.

С. 77-78. Треба чіткіше відокремити викладення результатів Поліщук із співавторами від власних результатів.

С. 80: Стійкий зв'язок «Алель за алель-специфічною ПЛР (SNP алель) – алель *Taglgap* – алельний варіант гліадинів» свідчить про консервативність та важливість даної ділянки геному, що належить  $\gamma$ -гліадиновому псевдогену. Імовірно, ця ділянка *Gli-B1* локусу має певні регуляторні функції. Чи варто тоді казати про псевдоген?

С. 82. Чи потрібний курсив у заголовку колонки в табл 3.2 «Алельний варіант *Gli-B1*»?

С. 82, 84, 90, 97, 105, 129, 144. Треба відредагувати виділений текст.

С. 85. А може помірні кліматичні умови не до чого? Справа у обмеженому ареалі, більш-менш однакових вимогах до сорту, традиціях та особистих вподобаннях селекціонерів, асоціації з іншими ознаками?

У багатьох таблицях наводяться частоти алелів, але у розділі 2 немає нічого про те, як їх розраховували.

С. 113 виникали деякі труднощі із специфічністю ПЛР з даними праймерами. Які саме труднощі? Мова йде саме про специфічність або про 3х ендосперм: два алелі 1.2 та один – 1.1?

Не варто в кожному розділі вказувати посаду Благодарової.

Яку мету переслідували, залучаючи до *in silico* ПЛР інші види злаків, адже головна мета дисертації – визначити частоти алелів різних генів в колекціях сортів та пов'язати це з селекційними моделями сортів у різних зонах.

С. 146. Використання HotStart ДНК-полімерази, у більшості випадків, дозволило лише значно знизити ефективність реакції з праймерами до одного з алелів. А навіщо знижувати ефективність реакції?

С. 149. Сорти із *Gli-D1b* алельним варіантом гліадинів характеризувалися як *Gli-D1.1* алелем, так і *Gli-D1.2* алелем. В чому причина? Гетерогенна суміш білків? Чи за рахунок виродженості коду не відбулося заміни амінокислоти?

С. 150. Те ж саме щодо 1g і 1j.

С. 160-161. Незважаючи на те, що ряд сортів пшениці м'якої в ході лабораторного експерименту демонстрував позитивний результат одразу для двох пар праймерів, в *in silico* ПЛР з праймерами до до *Gli-D1* локусу у великій послідовності MG560142.1 знайдено лише одну копію нуклеотидної послідовності, що може ампліфікуватися в ПЛР. Проте, присутність даної ділянки у послідовностях як генів, так і псевдогенів із досліджуваної вибірки може бути непрямим доказом, імовірної наявності декількох копій. Редакційна неточність? Змішані кількість праймерів та копій генів?

С. 165-166. Неспівпадіння з Поліщук та ін., 2010. З чим це пов'язане: розміри вибірки, мутаційні зміни, які відбувалися протягом 10 років?

Є ряд редакційних негарздів і друкарських помилок, на які вказано в тексті дисертації.

Наведені зауваження не впливають істотно на загальний позитивний висновок про представлену роботу. Вважаю, що дисертація на тему «Поліморфізм генів гліадинів в сучасних українських сортах та лініях пшениці м'якої» на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – біологія відповідає існуючим вимогам і може бути допущена до захисту.

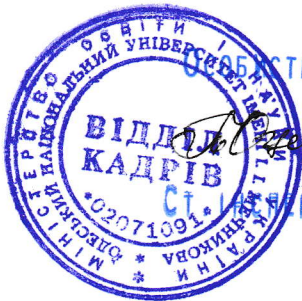
Доцент кафедри молекулярної біології,

біохімії та генетики,

кандидат біологічних наук,

старший науковий співробітник

О. Л. Січняк



СВОБОДНИЙ ПІДПИС *О. Січняк*

ЗАСВІДЧУЮ

ДИРЕКТОР ВІДДІЛУ КАДРІВ

*Гр. Ожесен*