

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про дисертацію Бакуми Алли Олексіївни «ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ПО ЛОКУСАХ *Ppd* ТА ФОТОПЕРІОДИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ СУЧАСНИХ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ»

на здобуття наукового ступеню кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 — молекулярна генетика

Актуальність теми дисертації. Вивчення структури генів вищих рослин, є важливим як з точки зору фундаментальних досліджень, так і для виконання практично-значущих робіт. Пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L) має геном, у якому за результатами нещодавнього секвенування виявлено близько 50 тисяч генів у кожному із трьох субгеномів, ще певна кількість генів не має гомеолокусів. Проте доволі небагато ідентифікованих генів одержали досі хромосомну локалізацію. Це, переважно, гени стійкості до біотичних стресів, гени інших ознак фізіології, морфології, генів біохімічних ознак. Ще менше генів картовано, вивчено їхню алельну різноманітність, мало генних мереж охарактеризовано, а різноманітність їхніх генних продуктів ідентифіковано щодо виконуваних функцій. Ідентифікація і аналіз тонкої структури генів дає ще і інструмент для встановлення перебігу еволюційних змін у рослинних геномах. Гексаплоїдна пшениця має найбільший ареал серед культивованих злаків, її генофонд утворюють тисячі сортів, які культивуються зараз, чи культивувалися раніше. Весь цей генофонд походить від обмеженої кількості новостворених аллогексаплоїдних генотипів, що виникли всього близько 10 000 років тому. Тому не дивно, що пройшовши через вузьке пляшкове горлечко доборів, пшениця м'яка демонструє обмежені можливості для адаптації у надзвичайно різноманітних умовах довкілля. Ситуація ускладнюється іще і тим, що умови змінюються не лише як функція географічної широти і довготи, але є змінним і у часі. Таким чином, процес створення адаптованих до абіотичних умов довкілля генотипів пшениці є процесом перманентним. Серія гомеолокусів системи *Ppd* є важливим елементом геному, що забезпечує істотну компоненту адаптивності до абіотичних чинників довкілля у пшениця м'якої озимої. Різні алелі за цією системою генів-регуляторів визначають

чутливості до фотоперіоду, крім того процеси онтогенезу у озимої м'якої пшениці пов'язані з іншими генами-елементами складної генної мережі, найбільш відомими компонентами якої є гени, що визначають потребу у яровизації (*Vrn*). Маємо визнати, що у багатьох сортів української селекції, що культивуються чи культивувалися раніше не встановлено алелі гомеосерії, *Ppd-A1*, *Ppd-B1*, *Ppd-D*, відповідно адаптивний потенціал цих сортів зараз може бути охарактеризованим лише як результат оцінювання рослини, що належить до певного сорту у польовому експерименті, за різних довжин дня. Дисертація А.О. Бакуми має на меті дослідити поліморфізм за генами *Ppd-1* у сучасних сортів та ліній м'якої пшениці, оцінити ефекти алелів *Ppd-D1a/ Ppd-D1b* на темпи розвитку та агрономічні ознаки м'якої пшениці. Це робить тему аналізованої дисертації цілком актуальною. Від себе додам, що актуальність роботи у чисто фундаментальному сенсі полягає і у можливості аналізу молекулярної структури генів чутливості до фотоперіоду у гексаплоїдній пшениці, як модель змін у геномі пшеничної рослини, яка **існує лише як сукупність генотипів, що культивуються людиною.**

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, розділу з описом матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, розділу узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертацію викладено на 141 сторінці основного змісту, проілюстровано 23 рисунками та 17 таблицями. Робота має 10 додатків. Список використаних джерел складає 196 найменувань. Певна кількість цитованих джерел оприлюднена за останні 5 років. Загальний обсяг роботи 175 сторінок.

Зв'язок дослідження з науковими програмами Дисертаційну роботу Бакуми А.О. виконано на кафедрі генетики та молекулярної біології біологічного факультету Одеського національного університету імені І. І. Мечникова в рамках Науково-дослідної теми (№ ДР 0117U001114, 2017-2019 рр.) «Поліморфізм локусів фотоперіодичної чутливості сортів пшениці і сої та залежність їх продуктивності від алельного складу локусів за даними ПЛР-аналізу».

Новизна дослідження та одержаних результатів. Автором дисертації встановлено алелі локусів *Ppd-1* та виявлено гаплотипи за геном *Ppd-D1* у сучасних сортів пшениці м'якої озимої з різних селекційних установ України. Проаналізовано сорти за носійством певних алелів та гаплотипів гену *Ppd-D1* за різними агрокліматичними зонами України та створено базу даних досліджених сортів пшениці за алелями генів *Ppd-1*. З використанням майже-ізогенних ліній пшениці ВС₇ Кооператорка та Кооператорка рання та лініях-аналогах ВС₇ Степняк 1 та Степняк 1 ранній оцінено вплив алелів *Ppd-D1a* / *Ppd-D1b* на агрономічні ознаки та темпи розвитку пшениці, статистично доведено ефекти алелів на 11 агрономічно важливих ознак пшениці.

Практичне значення результатів дослідження. Автором дисертації створено базу даних сучасних сортів пшениці різних селекційних установ України за алелями генів фотоперіодичної чутливості *Ppd-1*. Ця інформація може бути корисною селекціонерам для планування схем схрещування при створенні сортів з прогнозованими темпами розвитку. Доведено ізогенність ліній Кооператорка та Кооператорка рання, які запропоновано використовувати в дослідженнях для оцінки впливу алелів гену *Ppd-D1* на стійкість пшениці до стресових умов зростання. Інформація, одержана у ході виконання дисертаційного дослідження використовується у підрозділах, що працюють над створенням селекційного матеріалу пшениці м'якої в Україні (Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла, Інститут зрошуваного землеробства НААН України). Крім цього, інформацію про структуру генів *Ppd*, їхнє алельне різноманіття потенційно можна використовувати у навчальних курсах, що викладаються у Одеського національного університеті імені І. І. Мечникова.

Структура роботи

Дисертація починається **вступом**, де авторка висвітлює своє розуміння актуальності теми, визначення якої закінчує словами: "...Інформація щодо алельного стану генотипів сортів м'якої пшениці за системою генів *Ppd-1* буде корисною для селекціонерів країни при постановці схрещувань для отримання нових сортів з прогнозованими темпами розвитку". Далі описано зв'язок

роботи з науковою програмою, сформульовано мету, завдання та методи дослідження, тут також описано новизну одержаних результатів, практичне значення, особистий внесок здобувачки та наведено дані про апробацію результатів дисертації.

Робота продовжується **оглядом літератури**, обсягом 31 сторінку, який містить 4 підрозділи. Загалом, зміст розділу віддзеркалює сучасний стан дослідження генів системи *Ppd*. Тут описано молекулярну структуру генів *Ppd-D1*, *Ppd-A1*, *Ppd-B1* з описом їхніх характерних поліморфізмів у молекулярній організації, наведено інформацію про зв'язок різноманітності за цими генами з проявом різного рівня чутливості до фотоперіоду та етапів онтогенезу у озимою пшениці м'якої. Тут проаналізовано джерела з інформацією про поширення алелів генів *Ppd-1в* сортах у різних географічних областях та проаналізовано вплив системи генів *Ppd-1* на адаптивний потенціал сортів пшениці. Представлений аналіз наукових літературних джерел доводить актуальність обраної теми, обґрунтовує можливості для експериментального виконання дослідження за вибраною темою.

У розділі «**Матеріали і методи досліджень**» перераховано рослинний матеріал, з яким працювала дослідниця, детально описано агрономічні показники ґрунту та погодні умови у різних агрокліматичних районах України. Тут описані методи роботи з ДНК, методи електрофоретичного розділення ДНК у агарозі та ПААГ, послідовності використаних для дослідження праймерів. Використані методи є адекватними до завдань, які вирішувалися у дисертаційній роботі. Є у цьому розділі і інформація про методи статистичного опрацювання даних, одержаних в експерименті.

У **двох наступних розділах** дисертантом наведено експериментальні дані і виконано їхній аналіз. **Третій** розділ має чотири підрозділи і дає алельну характеристику рослинного матеріалу за генами фотоперіодичної чутливості *Ppd-1* і гаплотипів за геном *Ppd-D1* серед сортів пшениці м'якої озимої, створених для поширення у різних агрокліматичних районах України. Показано, що всі досліджені сорти є носіями рецесивних алелів *Ppd-A1b* та *Ppd-B1b*, які визначаються відсутністю делеції 1085нп і інсерції 308нп в

промоторних регіонах, відповідно. Виялено, що за локусом *Ppd-D1* досліджені сорти є поліморфними: співвідношення генотипів з домінантним, рецесивним алелями і гетерогенних за локусом *Ppd-D1* склало 90%, 8% і 2%, відповідно. Сорти Лісостепової зони, створені Найбільш поліморфними за гаплотипним складом гену *Ppd-D1*, у них детектовано VII (91 %), III (5 %), IV (3 %) та II (1 %) гаплотипи. Виконання трирічного експерименту зі встановлення фотоперіодичної чутливості аналізованих сортів пшениці м'якої за різної довжини дня та поєднання цих даних із аналізом тих же сортів за допомогою реакції ампліфікації зі специфічними до гену *Ppd-D1* праймерами, показало, що сорти з домінантним алелем *Ppd-D1a* в генотипі виявляли слабку та середню чутливість до фотоперіоду, а сорти з рецесивним алелем *b* мали сильну реакцію на скорочення довжини дня. У останньому підрозділі автором проаналізовано досліджені сорти м'якої пшениці щодо географічного розподілу алелів гену *Ppd-D1* в Україні.

Розділ **четвертий** присвячено аналізу впливу алеля *Ppd-D1a* на темпи розвитку та агрономічні ознаки пшениці, які було визначено із застосуванням майже-ізогенних ліній та ліній-аналогів, розділ складається з п'яти підрозділів, А.О. Бакумою на спеціально створеному генетичному матеріалі – майже-ізогенних лініях Кооператорка та Кооператорка рання і лініях-аналогах Степняк 1 та Степняк 1 ранній –вивчався вплив алелів *Ppd-D1a/ Ppd-D1b* на тривалість періоду «сходи – колосіння» та на деякі господарсько-важливі ознаки рослин пшениці. Важливим результатом роботи стала перевірка наявних ліній на ізогенність. У ліній визначено алелі генів *Ppd-1*. Лінії було промарковано за допомогою низки молекулярно-генетичних маркерів різної природи (RAPD, IPBS, SSR) і показано, що ізогенні лінії Кооператорка –Кооператорка рання є майже-ізогенними і відрізняються алелями *Ppd-D1b* та *Ppd-D1a*, а лінії Степняк 1 –Степняк 1 ранній є лініями-аналогами і відрізняються алелями *Ppd-D1b/ Ppd-D1a* та *Rht8a / Rht8c*.

На майже-ізогенних лініях Кооператорка - Кооператорка рання та лініях-аналогах Степняк1 та Степняк1 ранній показано, що в умовах Півдня України алель *Ppd-D1a*, незалежно від генотипу рекурентної батьківської рослини,

достовірно прискорює дату колосіння на 5,8 діб, скорочує висоту рослин на 17,6 см, зменшує довжину колоса на 1 см, збільшує кількість зерен у колосі на 3,7 шт., масу зерен з рослини на 2,5 г.

Експериментальна частина закінчується розділом з узагальненням результатів дослідження, який написаний з достатньою логікою і необхідним рівнем деталізації отриманих результатів.

У ході ознайомлення з дисертацією у опонента виникли низка зауважень та запитань, на які варто почути відповіді:

1. На сторінці 4 дисертації написано: «У попередніх опублікованих роботах використовували рекомбінантно-інбредні лінії, які значною мірою поступаються майже ізогенним лініям, тому що в рекомбінантно-інбредних лініях значний вплив на агрономічні ознаки можуть надавати інші гени, або гени зчеплені з цільовими. Тому матеріал (зокрема майже-ізогенні лінії) є значно більш досконалим...» Чому ж тоді продовжують створювати рекомбінантно-інбредні лінії? 2. Чим лінії-аналоги відрізняються від майже-ізогенних ліній? 3. У підрозділі 2.2.3 написано: «У кожену пробірку поверх реакційної суміші додавали 20 мкл мінеральної олії» Хіба ваш ампліфікатор не має підігріву кришки? 4. Дисертація не містить інформації, як (індивідуальні паростки, кілька паростків одного сорту) виділяли ДНК, скільки зразків брали, як джерело ДНК, зі скількох зразків (сортів, ліній). 5. У підрозділі 2.2.6. методика забарвлення гелів солями срібла не відповідає методиці Bassam, на яку є посилання у тексті. 6. У підрозділі 2.2.7. не вказано походження формули. 7. У підрозділі 2.2.8, при описі встановлення фотоперіодичної чутливості сортів та ліній пшениці не вказано, у яку пору доби скорочували світловий день: зранку чи увечері. Спектральний склад сонячного світла не однаковий у різні години доби, так само, як і реакція рослин на цей спектр. 8. У підрозділах 2.2.9-2.2.12 Занадто розлого, як для роботи з молекулярної генетики, описано кліматичні умови та склад ґрунтів, на яких вирощували рослини. 9. У роботі не міститься відомостей про кількості аналізованих рослин, наприклад при встановлення фотоперіодичної реакції, як от і в таблицях 3.1, та 3.3, 3.4, де різниці між сортами пораховані за t-критерієм. Цей критерій має чіткі

обмеження, щодо можливостей. 10. На сторінці 112 написано: « Ступінь відновлення генофону рекурентної батьківської форми у лінії Степняк 1 ранній за даними молекулярно-генетичного аналізу становить 98,5 %», яким чином це встановили? 11. Як аналізували ознаку «Маса тисячі зерен у колосі», табл. 4.3? 12. Чому у роботі постулюється наявність двох алелів у генах *Ppd*? Адже у роботах інших авторів фіксується більша їхня кількість, наприклад: Cane et al, 2013? 13. Авторка по всьому тексту роботи вживає словосполучення «алельні варіанти і алельний стан», алель і є станом та варіантом гена, тож такі словосполучення є, по суті, тавтологією. Те саме стосується і терміну «генофон»- він не є загальноживаним. 14. Пункт 29 списку цитованих джерел: це автореферат Федорової, очевидно його не написано англійською мовою, як це наведено у дисертації.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дослідження виконано з застосуванням сучасних методів молекулярної біології, що використовувалися адекватно до вирішуваних завдань роботи. Використання майже-ізогенних ліній є важливою перевагою роботи, адже такий рослинний матеріал є генетичним, і його створено під певні завдання, а не селекційним, яким є сорти пшениці. Висновки обґрунтовані за результатами експериментальної частини дисертації, сформульовано коректно.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Результати дослідження, що містяться у дисертаційній роботі, повністю представлено у 21 публікації, 7 статтях фахових видань та 14 тезах доповідей на міжнародних та вітчизняних форумах спеціалістів. Зміст автореферату достатньо відбиває основний зміст дисертації та одержані експериментальні дані.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук. Дисертацію написано за результатами завершеного експериментального дослідження, націленого на вирішення конкретної наукової проблеми: аналіз генетичного поліморфізму та визначення алелів за генами *Ppd-1* у сучасних

сортів та ліній м'якої пшениці, оцінка ефектів алелів *Ppd-D1a* / *Ppd-D1b* на темпи розвитку та агрономічні ознаки м'якої пшениці.

Робота відповідає спеціальності 03.00.22 — молекулярна генетика та оцінюється позитивно щодо вимог п.11 «Порядку присудження наукових ступенів ...», затверджених постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07. 2013 р., а її автор—Бакума Алла Олексіївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.22— молекулярна генетика.

Професор кафедри біології Національного університету
«Києво-Могилянська академія»

д.б.н



Особистий підпис
ЗАСВІДЧУЮ
Начальник ВК

Антонюк М.З.