

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **Козуб Наталії Олександрівни** «Різноманітність та ефекти кластерів проламінових генів *Triticum aestivum* L. та споріднених видів», представленої на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Широке поширення пшениці пов'язано не тільки з її високою врожайністю в різних кліматичних умовах, але, перш за все, з унікальними властивостями запасних білків насіння, які надають в'язко-еластичні властивості клейковині, що дозволяє отримувати з борошна пшениці хліб, хлібобулочні, кондитерські та макаронні вироби. Тому білки насіння злаків, і зокрема проламіни пшениці, інтенсивно вивчаються в останні десятиліття. Ці дослідження спрямовані на з'ясування структури і властивостей проламінів, регуляції їх біосинтезу і ролі в процесах, що відбуваються при переробці зерна. В останні роки особливого значення набуває дослідження структури проламінів, що викликають розвиток целіакії - захворювання, при якому тонкий кишечник генетично схильних індивідуумів необоротно пошкоджується при використанні в їжу хліба та інших продуктів, що містять проламіни.

Встановлено, що проламіни пшениці контролюються декількома локусами, що характеризуються множинним алелізмом, традиційним методом виявлення якого є електрофорез. Проведені останніми роками дослідження дозволили виявити зв'язок між окремими алельними варіантами генів, що кодують гліadini, високо- або низькомолекулярні субодиниці глютенінів і в'язко-еластичними властивостями клейковини. Крім структурних досліджень запасних білків, що мають фундаментальне значення, не меншу роль відіграють і дослідження їх генетично детермінованого поліморфізму, який широко використовується в філогенетичних і популяційних дослідженнях, а також у селекції для ідентифікації сортів, перевірки їх чистоти, виявлення гібридів та ін. Знання властивостей проламінів дозволяє вести цілеспрямовану селекцію на створення високоврожайних сортів, стійких до патогенів і абіотичних стресових факторів докільля з високими технологічними якостями.

Щорічно селекційними установами створюються і передаються для комерційного використання сотні нових сортів. Безперервний процес заміни існуючих сортів, застосування нових технологій обробки неминує веде до зміни внутрішньовидової різноманітності, перерозподілу внутрішньо- і міжпопуляційних компонент генетичної мінливості, в зв'язку з чим найважливішим завданням є вивчення генетичних процесів, що відбуваються в популяціях пшениці. На основі численних досліджень було показано, що групи сортів, створених у різних селекційних центрах або країнах, мають характерний набір проламінових алелів, що є результатом добору в специфічних ґрунтово-кліматичних умовах певного регіону. Актуальним завданням є дослідження появи нових невідповідних поєднань алелів цих

локусів та змін частот алелів у зв'язку з глобальним потеплінням. Недостатньо вивченими є ефекти присутності в геномі пшениці інтрогресованих житніх транслокацій та рекомбінантних транслокацій як носіїв нових генів стійкості до збудників хвороб та їх нових поєднань. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Козуб Н.О., присвячена характеристиці різноманітності кластерів проламінових генів (алелів) колекцій *Triticum aestivum* L. та її культивованих і дикорослих родичів, дослідженню ефектів присутності певних алелів та ролі рекомбінації, мутацій і інтрогресій у збільшенні їх різноманітності є безумовно актуальною і практично значимою, оскільки такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал як для подальшого розвитку спеціальної генетики даної культури, так і для практичного використання у селекції.

У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», 4 експериментальних розділів, а також переліку скорочень, розділу «Узагальнення» і висновків, списку використаних джерел та 14 додатків. Дисертаційна робота викладена на 716 сторінках машинописного тексту, обсяг основного тексту дисертації складає 475 сторінок. Робота ілюстрована 145 таблицями, 136 рисунками. Список використаних джерел містить 649 найменувань, з них 526 латиницею та 123 кирилицею.

**У розділі «Огляд літератури»** розглянуто класифікацію запасних білків пшениці, особливості будови різних груп проламінових білків, генетичний контроль проламінів пшениці та жита, результати досліджень структури проламінових локусів. Проаналізовано інформацію про різноманітність проламінових алелів у пшениці м'якої та споріднених видів, каталоги проламінових алелів, механізми утворення нових алелів, пов'язаність алелів проламінових локусів запасних білків пшениці з технологічними властивостями зерна, зчеплення проламінових локусів з генами стійкості до збудників хвороб, морфологічних ознак, QTL агрономічно-важливих ознак. Зведено дані про вплив інтрогресованих алелів локусів запасних білків на хлібопекарну якість. Розглянуто результати дослідження різноманітності колекцій пшениці м'якої та споріднених видів за проламіновими локусами. Особлива увага приділена аналізу досліджень пшенично-житніх транслокацій з участю плеча 1RS та збільшенню їх різноманітності.

**У розділі «Матеріали та методи досліджень»** детально описано умови проведення експериментів: рослинний матеріал, представлений колекцією українських сортів пшениці м'якої озимої, зокрема сортами селекційних установ зони Правобережного Лісостепу України; зони Степу України; Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН, Національного наукового центру «Інститут землеробства» НААН, Полтавської державної аграрної академії та групою сортів, створених в інших селекційних установах Сходу та Півдня України. Представлено колекції зразків пшениці м'якої ярої: українські сорти з колекції Національного центру генетичних ресурсів рослин України, грецькі сорти та дигаплоїдні лінії. Описана колекція

грецьких сортів та місцевих популяцій пшениці твердої; колекція грецьких заміщених гексаплоїдних тритикале; колекція зразків спельти; колекція зразків *T. dicocum* різного походження; майже ізогенні лінії пшениці м'якої за гліадиновими локусами (МІЛ). Висвітлено досліджуваний гібридний матеріал пшениці м'якої, вибірки з природних популяцій *D. villosum* та *Ae. biuncialis* Кримського півострова, матеріал від гібридизації пшениці м'якої з *Ae. biuncialis*.

Основними методами досліджень були: молекулярно-генетичні (виділення білків, виділення ДНК, ПЛР-ампліфікація, електрофорез проламінів у поліакриламідному гелі (ПААГ) у кислому середовищі, електрофорез білків у ПААГ в присутності додецилсульфату натрію (SDS), електрофорез ДНК в агарозному гелі), гібридизація рослин, генетичний аналіз, маркерний добір, статистичний аналіз даних.

**У розділі «Ідентифікація нових алелів запасних білків та збільшення їх різноманітності у пшениці м'якої (рекомбінація, мутації, інтрогресія)»** представлено результати аналізу колекцій сортів та гібридного матеріалу *T. aestivum* L. за локусами мономерних гліадинів і полімерних глютенінів. При аналізі гліадинових спектрів сортів і ліній пшениці м'якої ідентифіковано нові алелі локусів *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-A3*. У низки сортів пшениці м'якої ідентифіковано алель, позначений *Gli-B1fg\**. У сортів Естет та Господиня миронівська ідентифіковано новий алель локусу *Gli-A1*, позначений *ag*, що міг виникнути в результаті рекомбінації. У біотипу сорту пшениці Одеська 267 ідентифіковано алель, позначений *Gli-B1b1\**, що виник у результаті мутації гена в складі алеля *Gli-B1b*, яка призвела до більшої рухомості мінорного  $\omega$ -гліадину. При аналізі сорту Славен виявлено біотипи з алелем *Gli-D1g* і з нуль-алелем за цим локусом. Новий для сортів *T. aestivum* алель *Gli-B1x* ідентифіковано у озимого сорту Миронівська 62 і біотипу сорту Миронівська сторічна. У сорту Миронівська сторічна ідентифіковано ще один новий алель – *Gli-A3e*, що кодує два омега-гліадини, який виявився поширеним серед ярих сортів пшениці м'якої. Алелі *Gli-B1x* та *Gli-A3e* також ідентифіковано у *T. dicocum*.

Виявлено алелі локусу *Gli-D1*, що є результатом рекомбінації у гібридів  $F_1$ , та встановлено генетичну відстань між геном, що кодує  $\omega$ -гліадин  $j_5$  блоку "j", і генами, що кодують решту  $\omega$ -гліадинів цього алеля. Ідентифіковано два рекомбінантні алелі локусу *Gli-D1* з участю генів *T. aestivum* і *Ae. cylindrica*. Визначено відстань між групами генів алеля *cl* локусу *Gli-D1* *Ae. cylindrica* та їх розміщення відносно гена кольору колоскових лусок. Ідентифіковано алель *Gli-B1bLast*, що має рекомбінантно-інтрогресивне походження. Виявлено випадки рекомбінації в локусі *Glu-B1* (між алелями *e* та *al*) з формуванням рекомбінантного алеля *Glu-B1er* та спонтанні мутанти з нуль-алелями за локусами *Gli-B1* та *Gli-D1*; маркерним доббором створено лінії з такими алелями.

Визначено, що частота індукованих мутацій гліадинових локусів становила 7,4%, а частота спонтанних не перевищувала 0,5%. Автором ідентифіковано індуковані та спонтанні мутації алелів *Gli-B1b* та *Gli-B1l* (*Gli-*

*R1 (Sec-1)* у складі транслокації 1BL.1RS) та створено лінії з мутантними алелями. Дві мутації виявились пов'язаними зі зменшенням твердозерності. Вперше ідентифіковано носіїв транслокації 1AL.1RS типу Amigo серед сортів *T. aestivum* української та російської селекції.

На житньому плечі 1RS ідентифіковано новий секаліновий локус *Sec-N*, його картовано дистально від локусу *Sec-1 (Gli-R1)* на відстані 10–20 сМ та зроблено припущення, що *Sec-N* є гомеологічним локусам *Gli-1* пшениці. Ідентифіковано 4 алелі локусу *Sec-N*.

Показано, що секалінові локуси *Gli-R1* і *Sec-N* фланкують ділянку, де знаходяться гени стійкості проти різних збудників іржі, борошнистої роси та ген стійкості проти кліща *Stm3* і тому можуть слугувати маркерами для первинного скринінгу ліній з новими поєднаннями генів стійкості до хвороб і шкідників на рекомбінантних транслокаціях. Новий алель високомолекулярних субодиниць глютенінів було інтрогресовано у *T. aestivum* від *Ae. biuncialis* через пряму гібридизацію і маркерний добір з використанням проламінів як генетичних маркерів.

Визначено, що присутність інтрогресованого алеля *Glu-U1b* від *Ae. biuncialis* у геномі *T. aestivum* пов'язана з високим значенням показника седиментації SDS30, а ефект цього алеля є близьким до ефекту алеля *Glu-B1a1*.

У розділі «Ефекти присутності пшенично-житніх транслокацій з участю плеча 1RS у геномі пшениці м'якої» викладено результати власних експериментальних досліджень автора стосовно виявлення нових ефектів наявності транслокацій у геномі пшениці м'якої. Аналіз колекцій сортів показав, що частота транслокацій з участю плеча 1RS серед українських озимих сортів *T. aestivum* складає 23% і є істотно вищою, ніж серед ярих сортів – 8,8%. У ярого сорту Вишиванка з новою транслокацією 1BL.1RS можна очікувати, що його плече 1RS несе нові гени стійкості до хвороб, оскільки вони фланкуються новими секаліновими алелями. Автором виявлено залежність показників перезапилення від дози житнього плеча 1RS у складі транслокації 1BL.1RS та запропоновано нові показники оцінки перезапилення: частота рослин, на яких відбулося перезапилення та інтенсивність перезапилення. Показано, що частота перезапилення у пшениці залежить, в першу чергу від умов року, і відмінності між генотипами реалізуються тільки в сприятливих для цього умовах під час цвітіння.

Автором вперше показано що, для транслокації 1AL.1RS типу Amigo не є характерною знижена частота передачі через гамети у гетерозигот на відміну від транслокації 1BL.1RS типу Кавказ. Виявлено позитивний ефект присутності транслокації 1AL.1RS типу Amigo на прояв ознак продуктивності та підвищення адаптивності генотипів в умовах більшого вологозабезпечення.

Встановлено, що гамма-опромінення сухих зерен  $F_1$  *T. aestivum* дозою 200 Гр приводило до відносного підвищення частоти пилкових зерен з транслокацією 1BL.1RS, які взяли участь у формуванні зернівок  $F_2$ , порівняно з контролем. Показано, що одночасна присутність двох

транслокацій 1AL.1RS типу Amigo і 1BL.1RS типу Кавказ у гібридів приводить до зниження озерненості, причому сорт Миронівська 67 несе фактори, які підсилюють зниження озерненості у гібридів з двома різними транслокаціями. Показано можливість гетерозису у гібридів з двома транслокаціями 1AL.1RS і 1BL.1RS, незважаючи на зниження озерненості. За допомогою маркерного добору створено лінії пшениці м'якої озимої з транслокацією 1BL.1RS, зчепленою з алелем *Glu-B1a1*, пов'язаним із високою силою борошна.

**У розділі «Різноманітність колекцій *T. aestivum*, *T. spelta*, *T. durum*, *T. dicoccum* та тритикале за проламіновими локусами»** узагальнено результати вивчення колекцій сортів пшениці, створених у певних країнах або селекційних установах та їх культивованих і диких родичів за проламіновими локусами. Аналіз алелів цих локусів дозволив диференціювати групи українських озимих сортів пшениці у відповідності до агрокліматичної зони створення. У групах даних сортів виявлено не випадкові асоціації алелів локусів *Gli-B1*, *Gli-A3*, *Gli-D1* та ДНК-маркерів генів стійкості проти збудників хвороб. Відмічено формування не випадкових асоціацій алелів локусів запасних білків у групах сортів, створених після 1996 р.: особливістю групи сортів Правобережного Лісостепу України є поєднання алелів *Gli-A1w* та *Glu-B1d*, для групи сортів зони Степу України – це поєднання алелів *Gli-A1g* та *Glu-B1a1*.

Для груп сортів Селекційно-генетичного інституту та Миронівського інституту пшениць різних періодів створення показано поступові зміни частот деяких алелів локусів запасних білків, які корелюють з підвищенням температури. Автор припускає, що алелі локусів запасних білків, частота яких істотно зросла за останні 20 років, зчеплені з адаптивно важливими хромосомними ділянками, зокрема, пов'язаними з реакцією на підвищену температуру.

Пошукачем вперше визначено алельний склад локусів запасних білків грецьких сортів та ліній *T. aestivum* та ідентифіковано носіїв транслокації 1BL.1RS типу Кавказ. Виявлено достатньо високий рівень різноманітності та диференціацію сортів на дві групи – з алелями, характерними для європейських і мексиканських сортів. У колекції грецьких зразків твердої пшениці виявлено більшу генетичну різноманітність за локусами запасних білків у місцевих популяціях, ніж у комерційних сортів. Показано, що більшість комерційних грецьких сортів *T. durum* мають фіксовану асоціацію алелів *Gli-A1r*, *Gli-B1h*, *Glu-A1c*, *Glu-B1u*. У двох колекціях тритикале визначено середній рівень генетичної різноманітності та відмінності між ними за переважними алелями проламінових локусів. Виявлено, що у колекції *T. spelta* з Національного центру генетичних ресурсів рослин України за локусом *Gli-B1* переважав алель *hs*. У зразка *T. spelta* var. *duhamelianum* ідентифіковано новий алель *Gli-B1ps*\*. Гібридологічним аналізом визначено, що у *T. spelta* var. *caeruleum* темний колір колоса визначається геном на хромосомі 1A, зчепленим з алелем *Gli-A1j*.

Аналіз алелів проламінових локусів зразків колекції *T. dicocum* показав, що переважні алелі локусу *Gli-B1* пов'язані з належністю до певного підвиду: алель *Gli-B1h* і споріднені алелі (*ha\**, *hb\**, *hs\**) є характерними для європейських полб, *Gli-B1x* – для східних полб, *Gli-B1g* – для ефіопських полб. У результаті дослідження колекцій злакових культур виявлено спільні алелі за локусами запасних білків у різних видів пшениці і тритикале, зокрема, вперше ідентифіковано спільні алелі *g*, *h*, *x* локусу *Gli-B1* у гексаплоїдних і тетраплоїдних пшениць та показано, що алель *Gli-A3e* є спільним для *T. dicocum* і *T. aestivum*.

У розділі «Аналіз різноманітності природних популяцій дикорослих родичів пшениці» представлено результати вивчення *Ae. biuncialis* та пшенички волохатої, які є важливим джерелом інтрогресій для розширення генофонду *T. aestivum*, зокрема, генів харчової цінності зерна. Автором запропоновано аналіз омега-гліадинів на SDS-електрофореграмі як маркер локусу *Gli-V1* для дослідження популяцій пшенички волохатої, який можливо застосовувати одночасно з аналізом високомолекулярних субодиниць глютенінів. Показано, що популяції *Dasyphyrum villosum* Берегового і Херсонеса істотно відрізняються за частотами алелів локусів *Glu-V1* та *Gli-V1*. Відмічено вищу частоту нуль-алеля за локусом *Glu-V1* в кримських популяціях, ніж в італійських та балканських.

У *Ae. biuncialis* вперше ідентифіковано алелі локусів високомолекулярних субодиниць глютенінів *Glu-U1*, *Glu-M<sup>b</sup>1* і локусів гліадинів *Gli-U1*, *Gli-M<sup>b</sup>1*: 11 алелів локусу *Glu-U1*, 19 алелів *Glu-M<sup>b</sup>1*, 21 алель *Gli-U1*, 12 *Gli-M<sup>b</sup>1*. За результатами мультилокусного аналізу виявлено, що кримські популяції *Ae. biuncialis* діляться на два кластери, один з яких включає популяції Західного регіону, інший – популяції з Південного і Східного регіонів Кримського півострова. Найбільшу генетичну різноманітність виявлено в популяціях західного регіону та в популяції південного заходу із заповідника Херсонес Таврійський. У популяціях *Ae. biuncialis* ідентифіковано підвищену частоту 18 поєднань алелів за 4 маркерними локусами, що може свідчити про адаптивне значення таких поєднань. Показано, що генетичні відмінності популяцій *Ae. biuncialis* лінійно збільшуються з географічними відстанями, генетична різноманітність структурована в географічному просторі, і 52% генетичної дивергенції пояснюються географічними відстанями. У популяції Херсонеса одночасно присутні основні переважні алелі популяцій східної та західної частин ареалу *Ae. biuncialis* на Кримському півострові.

З'ясовано, що частота переzapилення в кримських популяціях цього егілопсу у середньому становить  $4,10 \pm 0,12\%$ . Водночас, виявлено географічну диференціацію за швидкістю виколошування-цвітіння – найбільш ранньостиглими є зразки із східної частини ареалу виду на Кримському півострові. Такі зразки є найбільш зручними в міжвидовій гібридизації з культурними пшеницями. Створено генетичну колекцію *Ae. biuncialis* «Колекція зразків *Aegilops biuncialis* Vis. за алелями локусів запасних білків *Glu-U1*, *Glu-M<sup>b</sup>1*, *Gli-U1*, *Gli-M<sup>b</sup>1*», яку зареєстровано в

НЦГРРУ. Колекція включає 24 зразки, з яких 23 походять з Кримського півострова.

У розділі «Узагальнення результатів досліджень» стисло і чітко узагальнені результати експериментальної роботи, які підтверджують обґрунтованість робочої гіпотези автора.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Роботу виконано у відповідності з тематиками фундаментальних робіт Інституту агроєкології і біотехнології Української академії аграрних наук (ІАБ) у рамках Проблеми «Теоретично обґрунтувати і застосувати на практиці засоби та методи генетики, екології та біотехнології для цілеспрямованого формування генетичної компоненти та біорізноманітності сталих агроєкосистем» (№ ДР 0101U003297, 2001-2004 рр.), за проектами ІАБ з МОНУ «Популяційно-генетична структура диких і культурних видів рослин СНД» (№ ДР 0198U003634, 1998-2003 рр.), «Отримання дигаплоїдних ліній м'якої пшениці методикою схрещування з кукурудзою та дослідження грецьких дигаплоїдних ліній за допомогою молекулярних маркерів» (№ ДР 0101U007233, 2001-2004 рр.), у рамках бюджетних НДР Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» «Вивчення біорізноманітності егілопсів та пшениць за допомогою молекулярно-генетичних маркерів», № ДР 0107U003582, 2007-2011 рр.), «Дослідження впливу гама-опромінення на генетичну структуру гібридних популяцій пшениці з використанням молекулярно-генетичних маркерів» (№ ДР 0110U000249, 2010-2012 рр.), «Дослідження генетичних ресурсів дикого родича пшениці *Aegilops biuncialis* та створення генетичної колекції, що репрезентує його різноманіття за молекулярно-генетичними маркерами» (№ ДР 0112U001598, 2012-2017 рр.), «Ефекти гама-опромінення гібридного матеріалу пшениці на ознаки продуктивності та частоту мутацій за маркерними локусами» (№ ДР 0113U004048, 2013-2015 рр.), «Ідентифікація та дослідження матеріалу *Triticum aestivum* L. з інтрогресіями від *Aegilops biuncialis* Vis.» (№ ДР 0117U000910, 2017-2020 рр.), «Дослідження мутацій в гліадинкодуючих локусах та їх ефектів на прояв господарчо-важливих ознак пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.)» (№ ДР 0119U101720, 2019–2020 рр.), Інституту захисту рослин Національної академії аграрних наук України «Визначення впливу на фенотип інтрогресій в геномі м'якої пшениці та дослідження за маркерними локусами диких родичів пшениці як потенційного джерела генів стійкості» (№ ДР 0106U002708, 2006-2010), «Ідентифікувати генофонд м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), тритикале (x *Triticosecale* Wittmack.) та видів роду *Aegilops* L. за допомогою генетичних маркерів» (№ ДР 0106U004932, 2006-2010 рр.), «Ефекти присутності інтрогресій в геномі пшениці та її різноманіття за маркерними локусами та генами стійкості» (№ ДР 0111U004582, 2010-2015 рр.), «Ідентифікація нових алелів локусів запасних білків в генофонді м'якої пшениці та її родичів» (№ ДР 0111U004591, 2010-2015 рр.), «Дослідження генів стійкості до хвороб та шкідників у пшениці та інших сільськогосподарських культур з

використанням молекулярно-генетичних маркерів» (№ ДР 0116U003523, 2016–2020 рр.).

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором вперше ідентифіковано низку нових алелів проламінових локусів злаків. У пшениці м'якої ідентифіковано нові алелі локусів запасних білків: *Gli-B1fg\**, *Gli-A1ag*, *Glu-B1er* (рекомбінантного походження); *Gli-B1b1\** (мутантного походження); *Gli-B1x* та *Gli-A3e*; два рекомбінантні алелі локусу *Gli-D1* з участю генів *T. aestivum* і *Ae. cylindrica*; алель *Gli-B1bLast* (рекомбінантно-інтрогресивне походження); індуковані і спонтанні мутації алеля *Gli-B1b*, пов'язані з втратою одного або двох компонентів гліадинового блоку; індукована мутація алеля *Gli-B1l* (в складі транслокації 1BL.1RS), пов'язана зі зміною рухливості секалінового компонента, спонтанна мутація алеля *Gli-B1l*, пов'язана з підсиленням синтезом секалінового компонента. Вперше ідентифіковано новий секаліновий локус *Sec-N* на житньому плечі 1RS, картовано його дистально від локусу *Sec-1* на відстані, в середньому, 15 см та визначено його алелі.

Для груп українських сортів пшениці м'якої зони Степу і Правобережного Лісостепу вперше виявлено поступові зміни з часом частот деяких алелів локусів запасних білків, які корелюють з підвищенням середньорічної температури повітря. Вперше виявлено не випадкові асоціації певних алелів гліадинових локусів та ДНК-маркерів генів стійкості проти збудників хвороб у групі українських озимих сортів пшениці м'якої. Вперше показано наявність спільних алелів локусу *Gli-B1* у *T. aestivum*, *T. spelta*, *T. dicoccum*, *T. durum*. Вперше виявлено, що переважні алелі локусу *Gli-B1* пов'язані з приналежністю *T. dicoccum* до певного підвиду.

Вперше ідентифіковано алелі запасних білків *Glu-U1*, *Glu-M<sup>p</sup>1*, *Gli-U1*, *Gli-M<sup>p</sup>1* *Ae. biuncialis*; визначено генетичну різноманітність і популяційну структуру виду Кримського півострова за цими локусами; виявлено географічну диференціацію за швидкістю виколошування-цвітіння у *Ae. biuncialis*; створено колекцію кримських зразків *Ae. biuncialis* за різноманітністю алелів локусів запасних білків.

Вперше ідентифіковано носіїв пшенично-житньої транслокації 1AL.1RS від жита *Insave* типу *Amigo* серед сортів пшениці м'якої української і російської селекції, транслокацію 1BL.1RS з секаліновими алелями локусів *Sec-1* та *Sec-N* типу *Amigo* у угорського сорту *MV Táltos*, створено лінію *CWX* з 1BL.1RS з секаліновими алелями від жита *Воронезьке СГІ*, ідентифіковано транслокацію 1BL.1RS з новими секаліновими алелями у сорту *Вишиванка*, створено популяцію рекомбінантно-інбредних ліній пшениці з рекомбінантними плечима 1RS у складі транслокацій 1AL.1RS типу *Amigo* та 1BL.1RS типу *Кавказ*, промаркованими секаліновими локусами.

Вперше виявлено ефекти наявності транслокації 1BL.1RS від жита *Petkus* типу *Кавказ*. Вперше показано, що для транслокації 1AL.1RS типу *Amigo* пшениці м'якої не є характерною знижена частота передачі через



гамети у гетерозигот за її присутністю. Вперше визначено частоту рекомбінації між 1RS у складі транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS (7 % за *Sec-1*) у гібридів пшениці м'якої.

Вперше встановлено генетичну відстань між групами генів локусу *Gli-D1* *Aegilops cylindrica* та зчеплення окремих груп генів цього локусу з кольором колоса. Вперше створено лінії пшениці м'якої з алелями локусів *Glu-U1* і *Gli-U1* від кримських зразків *Ae. biuncialis* і показано позитивний вплив алеля *Glu-U1b* на показник якості. Вперше визначено частоту розщеплення по центромері у гібридів пшениці м'якої, моносомних за хромосомою 1U *Ae. biuncialis* (9%), та виявлено більшу частоту втрати пліч 1US, ніж 1UL. Вперше запропоновано аналіз  $\omega$ -гліадинів на SDS-електрофореграмі як маркер *Gli-V1* для дослідження популяцій *D. villosum*, та визначено показники різноманітності за локусами *Glu-V1* та *Gli-V1* кримських популяцій *D. villosum*.

**Теоретичне значення результатів досліджень.** Дослідження, проведені автором, вносять суттєвий вклад у розвиток генетики рослин, зокрема спеціальну, молекулярну та трансмісійну генетику злакових культур, надають нові перспективи для вирішення фундаментальних питань досліджень генетичного різноманіття *Triticum aestivum* L. та споріднених видів. Результати, наведені у дисертації, поглиблюють та розширюють уявлення про структурно-функціональну мінливість геномів злакових рослин, зокрема внутрішньовидовий поліморфізм пшениці м'якої та її диких родичів; генетичну структуру популяцій; механізми дивергенції генів; проливають світло на можливі молекулярні механізми цих процесів. Отримані результати поглиблюють уявлення про генетичні та молекулярні основи детермінованості процесів мутагенезу та інтрогресії; екзогенні та ендегенні чинники, які впливають на ці процеси та можливі шляхи підвищення їх ефективності.

**Практичне значення отриманих результатів** перш за все полягає у доборі ліній з нуль-алелями за локусом *Gli-B1* або *Gli-D1*, які можуть бути використані при створенні сортів пшениці зі зниженою алергенністю – без синтезу певних омега-гліадинів. У випадку неалельності генів стійкості проти збудника стеблової іржі на транслокаціях 1BL.1RS типу Кавказ і 1AL.1RS типу Amigo, існує потенційна можливість поєднання генів *Sr31* і *Sr1RS<sup>Amigo</sup>* в одній транслокації для забезпечення стійкості до практично всіх рас стеблової іржі. Маркерним доббором створено лінії *T. aestivum*, у яких 1BL.1RS зчеплена з алелем надвисокої якості *Glu-B1a1*. Для збереження різноманітності кримських популяцій *Ae. biuncialis ex situ*, з використанням алелів проламінових локусів як генетичних маркерів створено і зареєстровано в НЦГРРУ генетичну колекцію *Ae. biuncialis*.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Дисертант проаналізував значний масив даних літератури з вивчення запасних білків злаків, їх генетичного контролю, механізмів утворення нових алелів, їх пов'язаності з технологічними властивостями зерна, зчеплення з генами стійкості до

збудників хвороб, QTL агрономічно-важливих ознак. Автором доведена важливість вивчення структури проламінових локусів колекцій *Triticum aestivum* L. та її культивованих і дикорослих родичів, ефектів присутності певних алелів та ролі рекомбінації, мутацій і інтрогресій у збільшенні їх різноманітності.

Понад 90 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 значний обсяг експериментального матеріалу. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: виділення білків та ДНК, ПЛР-ампліфікацію, електрофорез проламінів у поліакриламідному гелі (ПААГ) у кислому середовищі, електрофорез білків у ПААГ в присутності додецилсульфату натрію (SDS), електрофорез ДНК в агарозному гелі, гібридизацію рослин, генетичний аналіз, маркерний добір, статистичний аналіз даних.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу величезного 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 86 наукових праць, з них 42 статті у фахових і міжнародних виданнях, 19 статей у наукових збірниках і журналах, 2 розділи у монографіях, 23 тези у матеріалах всеукраїнських та міжнародних конференцій і з'їздів.

**Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.** Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Автореферат адекватно відображує зміст дисертації. Суттєвих зауважень до роботи немає, в основному вони носять технічний характер.

1. Текст дисертації містить певну кількість орфографічних та стилістичних помилок, зокрема пропущені слова і коми, внаслідок чого з'являються некоректні вирази, зокрема «залежить температури під час цвітіння добрив» (с.59); «бу» замість було (с.107); автор пише то «гама», то «гамма»-опромінення, наприклад с.121; пшениці твердої спельти (с.136), хоча спельта це гексаплоїдна пшениця, а не тетраплоїдна; чутливий алельний стан, замість нестійкий (с.140); світлий колос луски (с.167) замість світлі колоскові луски; міжвидових схрещувань пшениці м'якої озимої з блоком гліадинів (с.168); «орти» замість сорти с.336 і т.ін.

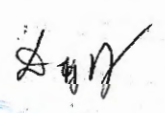
2. У таблицях не завжди наведені одиниці виміру, наприклад кількість зерен з рослини (табл.3.7), кількість продуктивних стебел (табл. 3.6); виповненість (табл.3.13), виживання рослин (табл.4.16).
3. Автор використовує такий показник як «сила тіста» (с.344), хоча «сила» застосовується лише до борошна (сила борошна W), а для тіста використовують такі показники як розтяжність (L) і пружність (P) і відношення пружності тіста до його розтяжності (P / L).
4. Нумерація таблиць і рисунків не завжди вірна. Наприклад табл. 45.41; рис.4.23 та 4.24 замість 5.23 та 5.24. У підписах до рис. наводиться Б а на рис. В.

Бажано було б запатентувати розроблені способи оцінки рослин, зокрема власну методику електрофорезу та на основі унікальних отриманих результатів видати каталоги запасних білків пшениці і споріднених видів, характерних для України.

**Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці.** Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів молекулярної генетики рослин. Результати роботи Козуб Н.О. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках закладів, що займаються проблемами генетичного поліпшення рослин, а також в курсах лекцій з генетики, молекулярної біології Київського національного університету ім. Т. Шевченка, Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня доктора біологічних наук.** Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, рецензована дисертаційна робота «Різноманітність та ефекти кластерів проламінових генів *Triticum aestivum* L. та споріднених видів», є завершеною науковою роботою, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор Козуб Наталія Олександрівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,  
 провідний науковий співробітник  
 відділу генетичного поліпшення рослин  
 Інституту фізіології рослин і генетики  
 НАН України, доктор біол. наук

 О.В. Дубровна

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

**ПІДПИС ПОСВІДЧУЮ**

Ученний секретар Май / Майор

« 18 » березня 20 21 р.

