

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу КОЗУБ Наталії Олександрівни «РІЗНОМАНІТНІСТЬ ТА ЕФЕКТИ КЛАСТЕРІВ ПРОЛАМІНОВИХ ГЕНІВ *TRITICUM AESTIVUM* L. ТА СПОРІДНЕНИХ ВИДІВ», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук із спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність теми. Запасні протеїни продовжують грати певну роль як генетичні маркери для дослідження різноманітності культивованих і дикорослих рослин, зокрема, видів Triticeae. Аналіз запасних протеїнів з використанням методу електрофореза в поліакриламідному гелі залишається найбільш ефективним методом аналізу різноманітності гліадинів та високомолекулярних субодиниць глютенінів. Дослідження колекцій різних видів гексаплоїдних і тетраплоїдних пшениць та тритикале, крім аналізу різноманітності алелів запасних протеїнів, дає можливість перевірки існування спільних алелів. Дослідження внутрішньолокусної рекомбінації дає змогу, крім отримання нових варіантів алелів, вивчати порядок розміщення генів у проламіновому кластері. Зручними генетичними маркерами для пошуку пшенично-житніх транслокацій з 1RS від інших сортів жита та рекомбінантних транслокацій як носіїв нових генів стійкості до збудників хвороб та їхніх нових поєднань можуть бути алелі проламінових локусів жита – секалінів у поєднанні з гліадиновими алелями для визначення положення транслокації. Також необхідним є збагачення генофонду пшениці новими генами, що впливають на якість зерна, шляхом інтрогресії алелів високомолекулярних субодиниць глютенінів від егілопсів. Одним з таких видів є тетраплоїдний вид *Aegilops biuncialis* Vis., поширений на Кримському півострові, поліморфізм проламінових локусів якого залишався не вивченим. Отже, **актуальність** теми наукових досліджень не викликає заперечень, так як дисертаційна робота присвячена дослідженню різноманітності кластерів проламінових генів (алелів) колекцій *Triticum aestivum* L. та її культивованих і дикорослих родичів, ефектів присутності певних алелів та ролі рекомбінації, мутацій і інтрогресій у збільшенні їхньої різноманітності. Сформовані здобувачем завдання також є безумовно актуальними. Мета та завдання роботи справляють цілісне враження та є детальним планом для проведення досліджень за темою дисертації.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано впродовж 2001–2020 рр. у відповідності з тематиками фундаментальних робіт Інституту агроєкології і біотехнології Української

академії аграрних наук (ІАБ), за проектами ІАБ з Міністерством освіти та науки України, у рамках бюджетних науково-дослідних робіт Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» та Інституту захисту рослин Національної академії аграрних наук України.

Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій.

Дисертація Козуб Н.О. являє собою завершену наукову роботу, яка має всі необхідні елементи: від обґрунтування актуальності та напрямів досліджень до детального аналізу отриманих результатів та висновків. Рукопис дисертації написаний з використанням фахової термінології.

Робота характеризується логічною послідовністю викладення експериментального матеріалу та його аналізу. Достовірність отриманих результатів підтверджується використанням статистичного аналізу даних. Результати проаналізовано автором та порівняно із результатами інших дослідників, описаними у науковій літературі.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності. Дисертація складається з таких частин: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини, висновків, списку використаних джерел, який включає 649 джерел, у тому числі 526 латиницею. Основний текст викладений логічно на 475 сторінках, проілюстрований 45 таблицями, 136 рисунками і 14 додатками.

У розділі «Проламіни пшениці і жита, їх характеристика, генетичний контроль, поліморфізм і пов'язаність з проявом ознак» виконаний аналітичний огляд сучасної наукової літератури, що дозволило автору обґрунтувати актуальність, мету та завдання дисертаційної роботи. Автором охарактеризовано запасні протеїни пшениці, особливості будови різних груп проламінових протеїнів (високомолекулярні проламіни, багаті на сірку проламіни та бідні на сірку проламіни), генетичний контроль проламінів пшениці та жита, результати досліджень структури проламінових локусів. Окремий підрозділ присвячено аналізу досліджень пшенично-житніх транслокацій з участю плеча 1RS та збільшення їх різноманітності.

У розділі «Матеріали ті методи досліджень» детально охарактеризовано рослинний матеріал – колекції сортів, гібридів, зразків, вибірки з природних популяцій. Представлено достатньо широкий спектр застосованих методичних підходів. Автор застосовує сучасні методи молекулярно-генетичного аналізу.

У розділах 3-6 дисертантом наведено результати експериментальних робіт та їх первинний аналіз. Кожен з етапів роботи автор завершує обговоренням

отриманих результатів та проміжними висновками. За результатами досліджень ідентифіковано низку нових алелів проламінових локусів *Gli-B1*, *Gli-D1*, *Gli-A1*, *Gli-A3*, *Gli-A2*, *Sec-N*, *Sec-1 (Gli-R1)*, *Glu-B1* рекомбінантного, мутантного, інтрогресивного та рекомбінантно-інтрогресивного походження. Встановлено генетичну відстань $0,65 \pm 0,18$ сМ між групами генів локусу *Gli-D1* *T. aestivum*. Визначено відстань $0,27 \pm 0,14\%$ сМ між групами генів алеля локусу *Gli-D1* *Ae. cylindrica* та їх розміщення відносно гена кольору колоскових лусок. 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 чотири алелі локусу *Sec-N*. Ідентифіковано носіїв транслокації 1AL.1RS типу Amigo серед сортів *T. aestivum* української і російської селекції. За допомогою маркерного добору створено лінії пшениці м'якої озимої з транслокацією 1BL.1RS, зчепленою зі алелем *Glu-B1al*. У групі українських сортів озимої пшениці м'якої виявлено не випадкові асоціації алелів локусів запасних протеїнів *Gli-B1*, *Gli-A3*, *Gli-D1* та ДНК-маркерів генів стійкості проти збудників деяких хвороб. Відмічено зміни в популяційній структурі за проламіновими локусами для групи сортів Селекційно-генетичного інститут (СГІ), створених після 2010 р., порівняно з групами сортів СГІ, створених у попередні періоди, на відміну від однотипної популяційної структури сортів Миронівського інститут пшениці у три періоди селекції.

Загальні висновки відображають наукову та практичну значимість дисертації, логічно завершують узагальнення отриманих результатів.

Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях.

Дисертаційна робота Козуб Н.О. є самостійним оригінальним дослідженням. Роботу апробовано на конференціях міжнародного та національного рівнів. За темою дисертації опубліковано 86 наукових праць, у тому числі розділи у двох монографіях, 42 статті – у наукових фахових виданнях, 19 статей – у наукових збірниках і журналах, 23 тези доповідей – у матеріалах наукових конференцій.

Основні результати дисертації повно викладені в наукових фахових виданнях.

Відповідність змісту автореферату та основних положень дисертації.

Зміст та структура автореферату відповідає структурі, основним положенням та висновкам, наведеним в дисертації.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором одержані нові для науки дані та узагальнення. Вперше ідентифіковано низку нових алелів проламінових локусів, а саме у пшениці м'якої - нові алелі локусів запасних протеїнів *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* у сорту 'Ластівка одеська'; індуковані і спонтанні мутації алеля *Gli-B1b*, пов'язані з втратою одного або двох компонентів гліадинового блоку, кодованого цим алелем; індукована мутація алеля *Gli-B1l* (у 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, його картовано дистально від локусу *Sec-1* на відстані, в середньому, 15 см та визначено його алелі.

Виявлено для груп українських сортів пшениці м'якої зон Степу і Правобережного Лісостепу поступові зміни з часом частот деяких алелів локусів запасних протеїнів, 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 сортів озимої пшениці м'якої. Вперше показано наявність спільних алелів локусу *Gli-B1* у *T. aestivum*, *T. spelta*, *T. dicoccum*, *T. durum*.

Ідентифіковано алелі запасних протеїнів *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1*, *Gli-M^b1* *Ae. biuncialis*; визначено генетичну різноманітність і популяційну структуру *Ae. biuncialis* 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 протеїнів.

Вперше встановлено генетичну відстань між групами генів локусу *Gli-D1* *Ae. 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 центромєрі у гібридів пшениці м'якої, моносомних за хромосомою 1U *Ae. biuncialis* (9%), та виявлено більшу частоту втрати пліч 1US, ніж 1UL.

Вперше запропоновано аналіз ω -гліадинів на SDS-електрофореграмі як маркер *Gli-V1* для дослідження популяцій *Dasyphyrum villosum*, та визначено

показники різноманітності за локусами *Glu-V1* та *Gli-V1* кримських популяцій *D. villosum*.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення дисертаційної роботи витікає із зроблених автором теоретичних узагальнень. Колекція зразків *Ae. biuncialis* Vis. за алелями локусів запасних протеїнів *Glu-U1*, *Glu-M^b1*, *Gli-U1*, *Gli-M^b1* передана та зареєстрована в Національному центрі генетичних ресурсів рослин України. Лінії озимої пшениці м'якої з транслокацією 1BL.1RS типу Кавказ, зчепленою з алелем *Glu-B1a1*, використовують в селекційній роботі наукових установ України.

Висловлення ряду побажань і зауважень. Принципових зауважень до дисертаційної роботи немає. Але робота не позбавлена деяких недоліків. Під час аналізу виникли певні запитання до здобувача.

Щодо назв сортів. Згідно з Міжнародним кодексом номенклатури для культурних рослин назви сортів відокремлюють у тексті одинарними лапками.

В огляді літератури надано результати власних досліджень, які будуть представлені далі в розділах з експериментальної роботи. Призначення огляду саме в тому, щоб надати досягнення інших науковців, показати ще невивчене. В руслі цього також не вистачає тексту з визначенням того, що ще не досліджено, чому і присвячено дисертаційне дослідження.

При використанні комп'ютерних програм необхідно навести ліцензії.

Зайві подробиці при описі електрофорезу (стор. 132, 133 – «...тефлонові прокладки товщиною 0,5 мм, для формування лунок – гребінець з такого ж матеріалу»).

Чому маса наважки вказана «біля 50 мг» (розділ 2.6, стор. 137)?

При описі умов ПЛР (розділ 2.7) не вказано концентрації використаних праймерів, кількості ДНК. Немає опису, як оцінювали кількість і якість екстрагованої ДНК. Скільки повторів екстрагування та ПЛР кожного зразка проводили?

Не вказано, як визначали розміри фрагментів ампліфікації. На стор. 140 вказано тільки, що гелі фотографували.

На рисунках з дендрограмами немає шкали, або вона не позначена «Генетичні дистанції, у.о.».

Немає розшифровок абревіатур при першому використанні. Наприклад, на стор. 66 «RFLP», на стор. 90 «QTL» (є тільки в Переліку умовних позначень).

Абревіатура англійською мовою Міжнародного центру покращення кукурудзи і пшениці в Переліку умовних позначень надана правильно СІММУТ, далі в тексті дисертації СІММІТ.

Зустрічаються невдалі вирази або неузгоджені твердження. Наприклад, на стор. 59 «Вміст білку, крім фактору генотипу і кількості внесених азотних добрив, залежить температури під час цвітіння добрив».

Сформовані зауваження не зменшують наукової та практичної цінності роботи, а наведені запитання мають, в тому числі, й дискусійний характер.

Загальний висновок. Таким чином, дисертаційна робота Козуб Наталії Олександрівни «Різноманітність та ефекти кластерів проламінових генів *Triticum aestivum* L. та споріднених видів» являє собою закінчену науково-дослідну роботу, в якій за результатами аналізу колекцій генотипів *T. aestivum* та споріднених видів, проведення гібридологічного аналізу, мутагенезу, створення та вивчення гібридного матеріалу з інтрогресіями, ідентифіковано низку нових алелів (варіантів кластерів генів) проламінових локусів, зокрема тих, що є результатом внутрішньолокусної рекомбінації, мутацій, інтрогресії та доповнено інформацію про генетичний контроль проламінових компонентів та ефекти певних алелів. Результати можуть мати широке застосування в генетиці та селекції важливішої сільськогосподарської культури – пшениці.

На підставі проведеного аналізу вважаю, що за своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, новизною, достовірністю отриманих результатів, обґрунтованістю висновків дисертаційна робота «Різноманітність та ефекти кластерів проламінових генів *Triticum aestivum* L. та споріднених видів» відповідає вимогам до докторських дисертацій, а її автор Козуб Наталія Олександрівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
заступник керівника відділу
молекулярної генетики та фітосанітарної експертизи
ТОВ «Україна Котекна Лімітед»



Н.Е. Волкова

23.03.2021 р.

Підпис Волкової Н.Е. засвідчую.

