ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу
Созінової Оксани Ігорівни
«Аналіз генів пуроіндолінів у пшениці м'якої та споріднених видів злаків»,
подану на здобуття ступеня доктора філософії
в галузі знань 09 «Біологія»
за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертації. Зерно пшениці застосовується у світі дуже широко і є сировиною для створення різних продуктів харчування. Якість цих різних продуктів напряму залежить від текстури зерна, з якого їх виробляють. Головним видом злаків, що культивується, є пшениця м'яка, про яку прийнято думати, що те пляшкове горличко, крізь яке вони пройшла, формуючись як аллогексаплоїд, створило абсолютно природну умову для збіднення алельного складу її геному. Це стосується і тих генів, від продуктів експресії яких залежить якість зерна пшениці. Тому ідея залучення до генофонду пшениці бажаних алелів критичних генів є питання актуальним назавжди, адже пшениця має безліч дикорослих родичів. Щоб розширювати генофонд пшениці м'якої за рахунок інтрогресії, а це процес непростий, перш за все треба вивчити алельний склад за генами інтересу як самої пшениці, так і її родичів. Це зробить роботу з інтрогресії алелів аргументованою, цілеспрямованою та такою, що забезпечена молекулярно-генетичним інструментарієм. Ще більш необхідним для оптимізації генофонду пшениці м'якої на сьогодні здаються підходи з редагування геному. Все це так, проте перш, ніж щось редагувати, треба визначитися, що, де та як редагувати. Для цього слід вивчати природний алельний склад потенційних джерел змін. Саме через все згадане роботу Оксани Ігорівни слід віднести до актуальних, потрібних та таких, що її результати відкриватимуть шлях для подальшого розвитку окресленої тематики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційне дослідження було виконано у рамках бюджетних НДР Державної

установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»: «Оцінка сортів та ліній пшениці м'якої Лісостепу України за проламіновими локусами як донорів корисних ознак з використанням молекулярно–генетичних маркерів та науково–методичне забезпечення питань випробувань генетично модифікованих організмів» (№ ДР 0123U100962, 2022–2024 рр.), «Маркерний добір ліній пшениці м'якої для виробництва харчових продуктів стратегічного значення» (№ ДР 0125U001978, 2025–2026 рр.).

Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій. Метою роботи було з'ясувати наявність/відсутність поліморфізму за генами пуроіндолінів (секалоіндолінів) у представників Triticinae та окреслити потенціал його використання для генетичного аналізу та прикладних досліджень за ознакою якість зерна. Постановка ясної цілі і складення плану експерименту для досягнення саме цієї цілі, застосування сучасних методів біологічного дослідження і грамотна обробка результатів не залишає місця для жодного сумніву стосовно обґрунтованості представлених в робот наукових положень, висновків та рекомендацій.

Новизна представлених у дисертації теоретичних та експериментальних результатів.

Вперше ідентифіковано пуроіндолінові алелі у екстрам'якозерних сортів пшениці м'якої Оксана і Білява за допомогою секвенування і виявлено присутність генів *Pina* та *Pinb T. monococcum* разом з мутацією твердозерності *Pinb–D1b*.

Вперше встановлено істотні відмінності в частотах трапляння альтернативних нуклеотидів у певних позиціях генів *Pina* (81, 318, 322 і 384) та *Pinb* (135 і 359) у дикої і культивованої однозернянок.

Вперше виявлено поліморфізм за кількістю ампліконів у *Ae. biuncialis* з використанням ген–специфічних праймерів до гена пуроіндоліну b: один амплікон завдовжки біля 520 п.н. або два продукти ампліфікації завдовжки біля 520 і 50 0 п.н.

Вперше секвеновано гени секалоіндолінів *Sina* та *Sinb* дикого жита *S. sylvestre* і виявлено 5 унікальних несинонімічних замін у гені *Sina*.

Практична цінність отриманих результатів.

Виявлений в дослідженні поліморфізм за кількістю ампліконів гена *Pinb* у виду *Ae. biuncialis* може бути використано як маркер для дослідження різноманітності природних популяцій виду.

Визначено SNP, які можна використати для розробки праймерів для дослідження генів *Pina* у виду *Ae. biuncialis* (UUMM): 230T, 257A, 392A у виду *Ae. umbellulata* та 66C, 89C, 268C у виду *Ae. comosa*.

Для розробки геном–специфічних праймерів до гена *Pinb* у виду *Ae. biuncialis* можуть бути використаними визначені в дисертаційній роботі поліморфізми, які присутні в послідовностях виду *Ae. umbellulata* з частотою трапляння більше 60 % (22C, 49G, 434C, 169T, 411A, 423A) та SNP 27G у виду *Ae. comosa.*

Розроблені маркери Pina1098 та Pinb393 можуть використовуватись для добору генотипів з алелями пуроіндолінових генів типу *T. monococcum* для створення екстрам'якозерних сортів. Лінії пшениці, відібрані за молекулярним маркером екстрам'якозерності Pinb393, передано до Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (ІР НААН) для використання в науково–селекційній роботі.

На погляд опонента, важливим практичним результатом стала подача отриманих автором нуклеотидних послідовностей генів до світових баз даних.

Рівень виконання поставлених наукових завдань та оволодіння здобувачем методологією наукової діяльності. Наведені у роботі наукові завдання відповідають поставленій цілі і виконані повністю. Отримані у ході виконання завдань результати наведені у відповідних розділах дисертації і ілюстровані достатньою кількість фактичного матеріалу, оформленого як таблиці і фотографії електрофореграм, хроматограм, результатів BLASTаналізу. Оксана Ігорівна продемонструвала сучасний рівень фахових умінь у використання методичних напрацювань біоінформатики, що дозволило їй використати існуючі у мережі бази даних для їхнього аналізу і формулювання висновків в межах цілі своєї роботи. Останнім кроком в її роботі було подача отриманих нею нуклеотидних послідовностей генів, отриманих через

секвенування генів пуро(секало)індоліну a та b пшениці м'якої, культурної однозернянки і жита *silvestris*. Надано також доступ до всіх вихідних (необроблених) даних, що особливо відзначає роботу як сучасну, виконану в дусі світових наукових тенденцій.

Повнота викладу результатів дисертації в наукових публікацій здобувача. Автором у співавторстві з керівником та колегами, що брали участь в деяких частинах експерименту, оприлюднено чотири наукових статті. Одна з них – у журналі, який входить до бази Scopus, три – у фахових виданнях України категорії Б. Крім цього у наявності глава у колективній монографії Gene Editing in Cereals: Approaches and Applications. Springer Nature Singapore. Матеріали дослідження були представлені на вітчизняних та міжнародній конференціях, автором (у співавторстві) оприлюднено п'ять тез доповідей. Матеріали дисертації оприлюднені повністю.

Структура та оформлення дисертації

Представлена дисертаційна робота характеризується єдністю змісту і засвідчує особистий внесок дисертанта до наукових знань у галузі знань 09 «Біологія».

Дисертацію побудовано за стандартною схемою з такими частинами: анотація українською мовою, список оприлюднених автором дисертації праць, summary, зміст, перелік умовних позначень, вступ, розділ 1 «Пуроіндоліни та їх роль у визначенні текстури зерна» (огляд літератури, 30 сторінок), розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» 11 сторінок, розділ 3 «Підбір геноспецифічних праймерів до пуроіндолінових генів» 11 сторінок, розділ 4 «Аналіз SNP у пуроіндолінових генах деяких диплоїдних представників роду *Aegilops*» 36 сторінки, розділ 5 «Аналіз послідовностей пуроіндолінових генів екстрам'якозерних сортів пшениці Оксана і Білява» 11 сторінок, розділ 6 «Аналіз SNP у пуроіндолінових генах *T. monococcum* та *T. urartu*» 15 сторінок, розділ 7 «Розробка праймерів для маркерного добору екстрам'якозерних генотипів пшениці м'якої з пуроіндоліновими алелями типу *T. monococcum* 9 сторінок, розділ 8 «Аналіз послідовностей генів секалоіндолінів *S. silvestris*» 5 стор. Містить 8 сторінок узагальнення результатів дослідження, шість висновків,

список використаних джерел (всього 238) та шість додатків. Загальний обсяг дисертації – 221 сторінок друкованого тексту, основний текст – 145 сторінок.

В огляді літератури надано не лише інформацію про роль пуроіндолінів у текстурі зерна, а і відомості про геномну структуру представників родини злакових, що є цілком доречним з огляду на зміст дисертації.

В другому розділі наведено вичерпний перелік вивченого матеріалу, вказано його походження, каталогові номери. Методи дослідження описані так, що їх можна відтворити за бажанням, проте лаконічно і чітко.

Розділи три–вісім містять результати власного експерименту. Побудова кожного розділу класична: коротке обґрунтування, тобто уведення до проблеми і пояснення, чому дане дослідження проведено. Далі наводяться результати з наведенням всього необхідного фактичного матеріалу у вигляді фотографій електрофореграм, хроматограм, BLAST-описів та таблиць. Кожен розділ закінчується висновком, що полегшує сприйняття тексту роботи.

Академічна доброчесність. Порушень академічної доброчесності в представленому тексті дисертації і наукових публікаціях, які висвітлюють основні результати дослідження, не виявлено.

Зауваження та побажання. Концептуальних зауважень або зауважень до застосованих методів дослідження опонент не має і це ще раз підкреслює добру продуманість роботи.

1. Найбільш помітне зауваження викликає розділ 1 – огляд літератури. Причому опонент розуміє, що Оксана Ігорівна як така не винна в тому, що створений огляд не можна використовувати як інформацію щодо певного наукового напрямку. Вона просто намагалась виконувати сучасні, сформульовані людьми, далекими від експериментальної науки, зокрема біології, вимогами: не можна посилатися на «старі» джерела, а відсоток джерел за останні чи то 5 чи то 10 років має бути певним. Ось автор і намагається цитувати не першоджерела, а сучасні перекази фактів.

2. Здавалось би зроблене зауваження є дрібницею. Для чого цитувати старе, коли все вже переписано в сучасних статтях. Однак, по-перше, забуття того що було, що вже кимось зроблено, це такий своєрідний манкуртизм. І наслідки

виглядають як неповне розуміння певних речей, про які пише автор дисертації. Наприклад, читаємо: «Хоча рід *Secale* генетично відрізняється від роду *Triticum*, створення продуктивних гібридів між цими двома родами є можливим, наприклад, штучно створена культура тритикале (*xTriticosecale Wittmack*) є гібридом між *T. durum* або *T. aestivum* та *S. cereale* (Boehm & Cai, 2024; Camerlengo & Kiszonas, 2023; Gaviley et al., 2024; Melnyk et al., 2024)» стор. 30. Штучно створена культура тритикале це не гібрид, це амфідипллоїд. Можливо, цього не знають автори статей 2024 року, структурну цитогенетику вони не розуміють. Однак тиражувати це незнання не можна. І не в 20-ті роки 21 сторіччя ці амфідиплоїди отримано, а майже 100 років тому. Далі: «Усі види *Secale* є диплоїдними (геном RR) (Boehm & Cai, 2024)». Коли ми даємо посилання на статтю 2024 року, ми приховуємо інформацію про те, як давно цей факт, диплоїдна природа представників роду Secale, було встановлено. І це деформує наші знання, які ми хочемо здобути, читаючи літогляд. Надати надійну інформацію про факти в їхній історичній послідовності – завдання літогляду. Як описано походження пшениці м'якої (стор. 33) краще не читати взагалі. На моє переконання це – результат читання сучасних неякісних статей, автори яких також давно не звертаються до першоджерел інформації. А це все наслідок вимоги цитувати як можна більш сучасну літературу. Так що тут Оксану Ігорівну можна цілком зрозуміти і пробачити. Але виникає побажання: якщо Оксана Ігорівна хоче, щоб той, хто читає її тексти з інформацією, їм довіряв, для формування тексту слід залучати першоджерела, а не якісь огляди чи Introductions до експериментальних статей.

3. Маю питання щодо варіанту з полімофізмами Pina2, який на 100% співпадає з послідовностями *T. monococcum* з алелем *Pina–A^{m}1b*. І майже те саме для Pinb2, тобто алель також від *T. monococcum*. Ми знаємо, що пшениця м'яка має гени пуроіндолілу лише у геномі D. Як автор уявляє собі реалізацію відкритого нею феномена на цитологічному рівні? В 2007-08 роках було отримано транслокацію *Pina* and *Pinb* у складі невеликого сегмента хромосоми 5A^m на хромосому пшениці м'якої. Щось відомо в цьому плані про сорти Білява та Оксана?

Загальний висновок

Дисертація Созінової Оксани Ігорівни «Аналіз генів пуроіндолінів у пшениці м'якої та споріднених видів злаків» є самостійною і завершеною науковою працею, виконаною в актуальному напрямку генетики злакових культур на високому науковому і методичному рівнях з застосуванням сучасних молекулярно-генетичних та біоінформатичних методів отримання та аналізу, яка за актуальністю теми, а також з огляду на її новизну та обґрунтованість наукових результатів, що мають теоретичне та практичне значення і повноцінно відображені в наукових публікаціях, відповідає вимогам до наукової кваліфікації ступеня доктора філософії, що встановлені Постановою КМУ «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12.01.2022 р. № 44 – із змінами, Созінова Оксана Ігорівна заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент
доктор біологічних наук професор,
професор кафедри біології Національного університету
«Києво-Могилянська академія» Тамара ТЕРНОВСЬКА