ВІДГУК

офіційного рецензента на дисертаційну роботу
Блюма Ростислава Ярославовича
«Вплив алополіплоїдизації на дивергенцію генів тубуліну у Хрестоцвітих»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 – Біологія

Актуальність теми дослідження. Родина Хрестоцвіті, або Капустяні, (Brassicaceae) є однією з найбільших серед покритонасінних, і, одночасно, однією з найбільш вивчених, що об'єднує близько 350 родів і 4140 видів. Значний дослідницький інтерес до представників цієї родини зумовлений їх складним поліплоїдним походженням, що дозволяє відслідковувати процес функціоналізації окремих родин генів, що цікаво з точки зору еволюції. Дисертаційна робота Ростислава Ярославовича присвячена вивченню впливу процесів алополіплоїдії на різноманіття генів родини тубуліну на прикладі представників родів *Arabidopsis*, *Brassica* та *Camelina*. Попри фундаментальну роль тубулінів як складової цитоскелету (мікротрубочок), гени цих білків залишаються маловивченими, а функції окремих ізотипів невідомими. Недостатнє розуміння еволюційного походження генів тубуліну та їх ортології у квіткових рослин значною мірою ускладнює екстраполяцію і порівняння результатів цитоскелетних досліджень у різних таксонів. До того ж, доступність генетичних інструментів та геномних ресурсів для видів Brassicaceae роблять їх ідеальною модельною родиною для дослідження квіткових рослин. Виявлення варіацій та копійності генів тубуліну є важливим для ефективного використання існуючих маркерних систем, зокрема таких, що ґрунтуються на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів тубуліну. Тому дослідження впливу процесів алополіплоїдії на різноманіття генів родини тубуліну у представників Хрестоцвітих, зокрема на прикладі представників родів *Arabidopsis*, *Brassica* та *Camelina,* є актуальними і науково обґрунтованими.

Ступінь обґрунтованості та достовірності. Структура і зміст роботи Блюма Р. Я. відповідає поставленій меті та завданням, що були реалізовані на основі використання сучасних методичних підходів. Дослідження проводилося із використанням порівняльно-геномних та біоінформатичних методів, молекулярно-генетичних і статистичних методів. Широкий масив отриманих біоінформатичних, експериментальних даних та даних літератури супроводжувався їхнім ретельним аналізом та обговоренням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в рамках держбюджетних тематик та грантових програм Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» (м. Київ) (2022-2026 рр.). Частина роботи виконувалась в рамках проєкту «Horizon 2020» за грантовою угодою № 871072 (2024–2025 рр.).

Повнота викладу у фахових виданнях та апробація основних результатів. За матеріалами дисертаційної роботи Блюма Р. Я. опубліковано 16 робіт, зокрема 5 статей в періодичних виданнях вітчизняних та індексованих у міжнародній наукометричній базі даних Scopus (**Q1** – 2, **Q3** – 1, **Q4** – 1), 11 тез доповідей на наукових конференціях, що свідчить про повноту апробації роботи. Публікації повністю розкривають основні результати дослідження, підкреслюючи їхню наукову значущість.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше детально вивчено вплив алополіплоїдії на еволюцію родини генів α-, β- та γ-тубуліну у десяти видів Хрестоцвітих родин *Camelina і Brassica.* Вперше продемонстровано відмінності щодо впливу алополіплоїдизації на збереженість набору генів тубуліну у різних груп Хрестоцвітих. Показано, що ізотипове різноманіття α- та β-тубулінів у Brassicaceae походить внаслідок низки дуплікацій різного характеру та масштабу.

Вперше виявлено атипову екзон-інтронну структуру гена β-тубуліну у дводольних – ген β-тубуліну у А-геномі, ортологи якого характеризуються втратою першого інтрона; виявлено також, що γ-тубуліни А- та С-геномів

Brassica зазнали злиття 4-го та 5-го екзонів, через що мають дев'ять екзонів замість десяти. Вперше продемонстровано ефективність використання комбінації систем молекулярних маркерів, що ґрунтуються на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів β- та γ-тубуліну, для ДНК-баркодингу різних видів *Camelina*. В цілому, отримані дані поглиблюють розуміння процесів дивергенції гомологічних генів, зокрема родини генів тубулінів, після подій поліплоїдизації у рослин.

Практичне значення одержаних результатів. Показано ефективність комбінування даних порівняльно-геномних досліджень та методу оцінки поліморфізму довжини інтронів β-тубуліну для генотипування різних підвидів та ліній (*B. rapa)* гібридного походження, що відкриває перспективи використання запропонованих підходів у селекції олійних культур. Запропонований підхід може бути використаний разом із іншими молекулярними маркерами у селекції, екологічному моніторингу, таксономічній та гербарній ідентифікації, у інших сферах, де існує необхідність швидкого та надійного визначення видової приналежності рослинного матеріалу. Поєднання даних геномних досліджень з результатами генотипування на основі аналізу поліморфізму довжини інтронів генів β-тубуліну може бути потенційно використане і для підтвердження генотипової приналежності, аутентифікації сортоприналежності насіння тощо. Запропоновані підходи не потребують спеціалізованого обладнання, є економічно доступними та можуть бути адаптовані для застосування у лабораторіях з базовим молекулярно-генетичним оснащенням.

Академічна доброчесність. Дисертаційне дослідження виконано з дотриманням принципів академічної доброчесності. Дисертаційна робота засвідчує наукову етику та відповідальність автора що виражається у належному оформленні посилань на першоджерела.

Оцінка структури, змісту. стилю викладу матеріалу та оформлення дисертації. Дисертаційна робота викладена на 272 сторінках і складається зі вступу, 5 розділів, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку

використаних джерел та 15 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 173 сторінок друкованого тексту. Робота містить 8 таблиць та 47 рисунків. Список використаних джерел містить 276 найменувань, з яких 274 латиницею.

Вступ дисертації містить усі обов'язкові структурні елементи. Зокрема, визначено актуальність обраної теми, мету, завдання, об'єкт і предмет дослідження, методи, наведено інформацію про наукову новизну, практичне значення, особистий внесок здобувача, апробацію роботи та ін.

У Розділі 1 «Особливості еволюції родини Хрестоцвітих та її вплив на родину генів тубулінів» представлено ґрунтовний аналітичний огляд наукової літератури, в якому висвітлено сучасні уявлення про походження генів тубуліну, їхнє різноманіття і еволюцію, надається опис еволюції родини Хрестоцвітих. У підсумку дисертант формулює питання, вирішення яких дозволило б краще зрозуміти не лише особливості субфункціоналізації генів різних ізотипів тубуліну у рослин, а й пролити світло на ключові відмінності організації родини генів тубуліну у таких зручних модельних організмів, як *Arabidopsis*, *Brassica*, *Camelina* та споріднених видів Хрестоцвітих.

У Розділі 2. «Матеріали та методи дослідження» обгрунтовано методи, які були застосовані для досягнення поставлених завдань, здійснено повногеномний пошук та ідентифікація генів тубуліну, реконструйована філогенія генів тубуліну, проведено порівняльний геномний аналіз та дослідження синтенії генів тубуліну, наведено опис рослинного матеріалу та його генотипування за допомогою tbp-маркерів. Все програмне забезпечення, використане в дослідженні, є безкоштовним та наявним у відкритому доступі.

Розділ 3. «Дивергенція генів тубуліну *Arabidopsis thaliana* в ході ранньої еволюції хрестоцвітих» містить аналіз дуплікаційного походження генів α- та β-тубулінів, а також походження різних ізотипів висококонсервативного γ-тубуліну у *A. thaliana*. Отримані результати свідчать про те, що значна частина різноманітності ізотипів тубуліну, що спостерігається в межах філогенетичних класів, виникла не лише внаслідок WGD, а й шляхом транспозиційних дуплікацій генів, специфічних для *A. thaliana*. Різноманіття ізотипів тубуліну у

цього виду може бути специфічною рисою саме цього конкретного виду або родини Brassicaceae. Продемонстровано, що лише невелика частина генів різних ізотипів тубуліну *A. thaliana* виникла у результаті древніх повногеномних дуплікацій. Більше того, було встановлено, що переважна частина генів α-тубуліну, а також деякі гени β-тубуліну виникли в результаті транспозиційних дуплікацій, специфічних лише для *A. thaliana* чи окремої групи Хрестоцвітих. У сукупності отримані дані значною мірою прояснюють еволюційні шляхи виникнення тубулінів у такого модельного виду як *A. thaliana.*

У Розділі 4 «Дивергенція генів тубуліну у представників роду *Camelina*» дисертант наводить дані з повногеномної ідентифікації генів тубуліну у алогексаплоїдного виду *Camelina sativa* та його диплоїдних предкових видів, аналізує особливості їх консервації та вплив алополіплоїдії на дивергенцію тубулінів, наводить результати ДНК-баркодингу у видів *Camelina* з різною плоїдністю, використовуючи метод поліморфізму довжини інтронів генів β- та γ-тубуліну. Спираючись на отримані дані повногеномних досліджень автор запропоновав систему молекулярних маркерів (ТВР, сТВР та γТВР), яка дозволяє ефективно диференціювати види *Camelina*, а також розрізняти внутрішньовидові групи (цитотипи) з різною геномною організацією. Отримані дані дозволили охарактеризувати особливості консервації генів тубуліну та їх дивергенції і субфункціоналізації після алополіплоїдизації. Зокрема, було показано, що у геномі *C. sativa* більшість генів тубуліну представлені триплетами гомеологічних генів. Ефективне використання даних геномного дослідження у купі із ТВР-маркерними системами створює потужний дослідницький інструмент для ДНК-баркодингу представників роду *Camelina* та вивчення їх генетичного різноманіття.

У розділі 5. «Дивергенція генів тубуліну у представників роду *Brassica*» проаналізовано еволюційну варіативність набору генів тубуліну у представників *Brassica.* За результатами повногеномного дослідження родини генів тубуліну у *B. Rapa* показано, що більшість локусів його генів зберігають консервативне розташування в межах підгеномів після алополіплоїдизації.

Виявлено, що всі проаналізовані представники *Brassica* не мають ізотипів α-тубуліну 1, 4 та 6, а також β-тубуліну 5, тоді як ізотип TUB10 (TUBX) є присутнім у всіх видів. Продемонстровано, що представники *Brassica*, попри свою мезогексаплоїдну природу, зберігають лише одну копію β-тубуліну на диплоїдний геном та належать виключно до ізотипу TUG1; γ-тубуліни A- та C-геномів *Brassica* характеризуються зменшеним числом екзонів через злиття 4-го та 5-го екзонів. Вперше для β-тубулінів дводольних було виявлено відхилення від висококонсервативної екзон-інтронної структури для ортологічних генів *BraA.TUB2.b-BnaA01.TUB2-BjunA01.TUB2* з A-геномів *Brassica*. Аналіз поліморфізму інтронів генів β-тубуліну у збірках різних підвидів *B. rapa* підтвердив виявлені особливості структури цих генів та дозволив окреслити межі варіації довжини інтронних ділянок, а також продемонстрував можливість здійснення успішного генотипування та диференціації підвидів і гібридних форм *B. rapa*. Отримані результати не лише описують еволюційну варіативність набору генів тубуліну у представників *Brassica*, а й демонструють можливість використання таких даних при проведенні молекулярно-генетичного аналізу, спрямованого на вивчення генетичного різноманіття селекційних форм олійних культур.

У розділі «Узагальнення результатів дослідження» обговорюються і узагальнюються отримані результати, формулюється оновлений погляд на еволюцію та різноманіття тубулінів у Хрестоцвітих, підсумовується ефективність застосуванням методів порівняльної геноміки та молекулярної генетики для аналізу закономірностей еволюції генів тубуліну. Автор показує, що родина висококонсервативних генів білків цитоскелету може бути використана не лише як модель для вивчення процесів субфункціоналізації генів у складних поліплоїдних видів, а й застосована як молекулярні маркери для вивчення між- та внутрішньовидового різноманіття не лише Хрестоцвітих, а й інших квіткових рослин. На основі цього розділу і змісту дисертації можна об’єктивно оцінити не тільки високий рівень наукової новизни і значущості роботи, але й компетентності і фахової підготовки дисертанта. Висновки в

роботі чітко сформульовані і відповідають поставленим меті й завданням. Вони узагальнюють отримані експериментальні результати та демонструють високий рівень опрацювання матеріалу.

У додатках наведено список публікацій здобувача, перелік послідовностей використаних для реконструкції філогенії тубулінів Хрестоцвітих, перелік генів α-тубуліну, β-тубуліну та γ-тубуліну, ідентифікованих у геномі досліджених видів *Camelina* та *Brassica,* а також дані щодо ортології та локалізації генів тубуліну на геномних блоках АСК у *C. sativa* та представників *Arabidopsis*.

Запитання щодо змісту дисертаційної роботи. Звичайно, як до всякого цікавого і складного дослідження, є ряд запитань.

1. У Розділі 1. «Особливості еволюції родини Хрестоцвітих та її вплив на родину генів тубулінів (огляд літератури)» спочатку розглядається походження генів тубуліну, а потім надається короткий опис еволюції родини Хрестоцвітих (підрозділ 1.2.1); - логічніше було б навпаки.
2. На мою думку, назві роботи більш відповідає фраза, яка передує висновкам: застосуванням методів порівняльної геноміки та молекулярної генетики для аналізу закономірностей еволюції генів тубуліну у представників родини Хрестоцвіті.
3. У вітчизняній сучасній систематиці частіше застосовується назва родини Капустяні (Brassicaceae).
4. Бажано було б систематизувати перелік ключових слів в анотації до дисертації, наприклад, від загального до більш конкретного.

Але наведені зауваження не мають принципового характеру і не знижують наукової цінності і значущості роботи.

Загальний висновок рецензента. Дисертаційна робота Блюма Ростислава Ярославовича «Вплив алополіплоїдизації на дивергенцію генів тубуліну у хрестоцвітих» є завершеним дослідженням, що вирізняється актуальністю теми, сучасною методологією, науковою новизною, теоретичною та практичною значущістю. Робота відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 44 від

12.01.2022 із змінами, та наказу Міністерства освіти і науки України від 12.01.2017 № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор, Блюм Ростислав Ярославович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії (PhD) у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензент:
головний науковий співробітник
ДУ «ІХБГ НАН України»,
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник Олена КРАВЕЦЬ