

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу соискателя Утебаева Марала Ураловича на тему: «Влияние аллелей глиадин- и глютеинкодирующих локусов на качество зерна яровой пшеницы *Triticum aestivum* L.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Актуальность темы исследования. Западная Сибирь и Северный Казахстан являются одними из ведущих регионов Российской Федерации и Республики Казахстан по производству высококачественного зерна мягкой пшеницы. Тем не менее, глобальное изменение климата приводит к тому, что усилия селекционеров не в полной мере могут обеспечить продовольственную безопасность. В этой связи необходимо внедрение в селекционную работу современных, информативных и в достаточной степени мало затратных методов. Одним из таких методов является электрофорез запасных белков пшеницы: глиадинов и глютеинов. Изучение генетических ресурсов пшеницы является первым этапом в селекционной работе, при котором отбираются генотипы, выделяющиеся комплексом ценных признаков в конкретных почвенно-климатических условиях. Комбинирование электрофореза запасных белков с биохимическими и технологическими методами оценки зерна мягкой пшеницы на качество может в достаточно полной мере представить и рекомендовать для использования в селекции генотипы с хозяйственно ценными признаками, что является для селекционеров весьма актуально.

Научная новизна исследований. Соискателем впервые исследован полиморфизм глиадин- и глютеин кодирующих локусов 201 сортов и линий яровой мягкой пшеницы Северного Казахстана и Западной Сибири на основе нативного и денатурирующего электрофореза глиадинов и глютеинов, составлены их генетические формулы. Идентифицированы аллели глиадина: *Gli-Alf*, *Gli-Ble*, *Gli-Dla*, *Gli-A2q*, *Gli-B2t*, *Gli-D2q*, которые характерны для пшеницы Северного Казахстана. Данные аллели присутствуют в генотипах, имеющих высокое качество зерна, муки и хлеба. Показано достоверное отличие Северо-Казахстанских от западносибирских сортов пшеницы по локусам глиадина: *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2* и локуса глютеина *Glu-B1*. Впервые в условиях Северного Казахстана выявлены связи аллелей глютеина *Glu-A1b* с содержанием клейковины и P/L (отношение упругости и растяжимости теста), *Glu-B1e* – с валориметрической оценкой. Впервые в результате экологического сортоиспытания в условиях Западной Сибири (Тюмень, подтаежная зона) и Северного Казахстана (Акмолинская, подзона засушливой степи) выявлены сорта яровой мягкой пшеницы с высокими

показателями качества зерна селекции НИИСХ Северного Зауралья (г. Тюмень, Россия) и НПЦЗХ имени А.И. Бараева (п. Шортанды, Казахстан). Доказана эффективность тестирования и отбора генотипов по биохимическим и технологическим показателям качества зерна. Выделенные сорта Тюменской селекции: Икар, СКЭНТ-3 и Аделина по физическим свойствам зерна хлебопекарной оценке в условиях Акмолинской области соответствовали категории «удовлетворительный улучшитель». Сорта Шортандинская 2014 и Шортандинская 95 улучшенная показали стабильность при формировании биохимических и технологических показателей качества зерна на уровне улучшителей в условиях Акмолинской и Тюменской областей.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Проведенные диссертантом исследования представляют три блока. Первый блок – это идентификация на основе метода электрофореза глиадинов и глютеина 201 сортов и селекционных линий из различных селекционных учреждений, из них 139 Северо-Казахстанской (Акмолинской, Северо-Казахстанской, Кустанайской и Павлодарской областей) и 62 западносибирской (Тюменской и Челябинской областей) селекции. После сопоставления электрофоретических спектров с каталогами глиадинов и глютеинов составлены генетические формулы изученных образцов пшеницы. Выявлены преобладающие аллели глиадинов и глютеинов для конкретных областей Западной Сибири и Северного Казахстана, по которым можно вести селекционную работу на хозяйственно-ценные признаки. На основе статистических расчетов доказано, что пшеница из Северного Казахстана и Западной Сибири достоверно отличаются друг от друга по локусам глиадинов *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2* и локусу глютеина *Glu-B1*. При идентификации генотипов пшеницы, кроме электрофореза запасных белков использован метод, основанный на ПЦР по генам глютеина. В результате ПЦР-анализа установлен полиморфизм некоторых сортов пшеницы, который не был выявлен электрофорезом запасного белка-глютеина.

Второй блок исследований включает результаты по поиску связей глиадинов и глютеинов с некоторыми параметрами качества зерна, муки и хлеба. Для выявления таких связей аллелей глиадин- и глютеинкодирующих локусов с биохимическими и технологическими параметрами качества зерна было изучено 73 образца яровой мягкой пшеницы урожая 2016-2018 гг. с известными формулами глиадинов и глютеина. С использованием специальных математических формул были выявлены связи аллелей глютеина: *Glu-A1b* с содержанием клейковины и R/L (отношение упругости к растяжимости теста); *Glu-B1c* – с

валориметрической оценкой; *Glu-D1a* и *Glu-D1d* – с отношением P/L в условиях Северного Казахстана.

Третий блок – результаты экологического испытания на хлебопекарное качество 15 сортов НИИСХ Северного Зауралья (Тюмень, Россия) и 6 сортов НПЦЗХ им. А.И. Бараева (Шортанды, Казахстан) урожая 2019-2020 гг. Опыты были заложены в двух географических пунктах: полевые стационары НПЦЗХ им. А.И. Бараева, расположенные в подзоне засушливой степи и на экспериментальном участке биостанции «Озеро Кучак» ТюмГУ относящийся к подзоне южной тайги. Посевы и уборка сортов проведены согласно принятым для каждой зоны срокам, в двукратной повторности на площади 6 м². В результате были подобраны сорта яровой мягкой пшеницы с высокими показателями качества зерна селекции НИИСХ Северного Зауралья (г. Тюмень, Россия) и НПЦЗХ им. А.И. Бараева (п. Шортанды, Казахстан). Показана эффективность тестирования и отбора генотипов по биохимическим и технологическим признакам качества зерна. Выделенные сорта тюменской селекции Икар, СКЭНТ-3 и Аделина по показателям физических свойств зерна, теста и хлебопекарной оценке, в условиях Северного Казахстана соответствовали категории «удовлетворительный улучшитель». Сорта Шортандинская 2014 и Шортандинская 95 улучшенная отличались стабильностью при формировании биохимических и технологических показателей качества зерна на уровне улучшителей в условиях Акмолинской и Тюменской областей.

Практическая значимость работы. Следует признать ценными рекомендации, изложенные в диссертационной работе:

1. При изучении исходного материала генофонда яровой мягкой пшеницы и при подборе родительских пар для гибридизации учитывать в качестве маркеров качественных показателей зерна и теста аллельный состав глютена: *Glu-A1b*, *Glu-B1c*, *Glu-D1d*, *Glu-D1a* и аллелей глиадины: *Gli-A1f*, *Gli-B1e*, *Gli-D1a*, *Gli-A2q*.

2. Для установления генетической структуры, гетерогенности, подлинности и чистоты сорта анализ биотипного состава по спектрам глиадины и глютеина на основе методов ДНК диагностики и электрофореза запасных белков.

3. Использование в селекционных программах сорта Шортадинская 95, Асыл-Сапа, Икар, Аделина, выделившиеся по комплексу хозяйственно ценных признаков в двух контрастных почвенно-климатических условиях: Западной Сибири и Северном Казахстане.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 208 страницах, состоит из введения, основной части, содержит 34 рисунка, 47 таблиц, заключения, принятых сокращений, списка литературы из 264 источников, в том числе 183 – на иностранном языке и 12 приложений.

В первой главе (обзор литературы) проведен обзор и анализ научного материала, опубликованного в отечественных и зарубежных литературных источниках по теме исследований, в которых излагаются вопросы систематики рода *Triticum*, классификации белков зерна пшеницы, о запасных белках пшеницы и их роли в формировании качественного зерна, генетическом контроле проламинов пшеницы, рассматриваются классические и современные методы идентификации и регистрации сортов и линий пшеницы, основные характеристики зерна по которым ведется селекционный отбор пшеницы.

Во второй главе дано описание агроклиматических условий Акмолинской и Тюменской областей. Проанализированы погодные условия вегетационных периодов 2019-2020 гг. В качестве объекта для электрофореза глиадинов и глютеинов служили 201 образец яровой мягкой пшеницы, из них 139 Северо-Казахстанской (Акмолинской, Северо-Казахстанской, Кустанайской и Павлодарской областей) и 62 западносибирской (Тюменской и Челябинской областей) селекции. Для выявления связей аллелей глиадин- и глютеинкодирующих локусов с биохимическими и технологическими признаками качества зерна изучено 73 образца яровой мягкой пшеницы урожая 2016-2018 гг. с установленными формулами глиадина и глютеина. В экологическом испытании по хлебопекарным параметрам протестировано 15 сортов НИИСХ Северного Зауралья (Тюмень, Россия) и 6 сортов НПЦЗХ им. А.И. Бараева (Шортанды, Казахстан) урожая 2019-2020 гг. Полевое испытание сортов проводили в соответствии с методикой Государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур (1989). Опыты проведены в двух географических точках: 1) полевые стационары НПЦЗХ им. А.И. Бараева – подзона засушливой степи, почвы – южный карбонатный чернозем; 2) экспериментальный участок биостанции «Озеро Кучак» ТюмГУ – подзона южной тайги, почвы дерново-подзолистые. Посевы и уборка сортов проведены согласно принятым для каждой зоны срокам, в двукратной повторности на площади 6 м². Состав глиадинов изучался с помощью метода электрофореза в кислом алюминий-лактатном буфере (pH = 3) (Metakovsky and Novoselskaya, 1991), идентификация блоков глиадина по каталогу Метаковского (Metakovsky, 1991). Денатурирующий электрофорез глютеинов в присутствии додецилсульфата натрия в трис-глициновом буфере (Laemmli, 1979). Идентификация высокомолекулярных субъединиц глютеина по каталогу Пейна и Лоуренса (Payne and Lawrence, 1983).

Для статистических расчетов аллельного разнообразия применены показатели: внутривидовое разнообразие ($\mu \pm S\mu$), доля редких аллелей ($p \pm Sp$), показатель сходства ($r \pm Sr$) (Животовский, 1991), критерий идентичности (I) (Животовский, 1979). Степень генетического разнообразия (H) рассчитывали по формуле: $H = 1 - \sum p^2$ где p – частота аллелей (Nei, 1973).

Независимость или связь аллелей глютенина оценивали по критерию χ^2 (Седловский и др., 1982). Дополнительно использовались оценки связей по коэффициентам ассоциации Q и контингенции (сходства) V (Антамошкин и Бакаева, 2011). Корреляционный анализ, НСР₀₅ (Доспехов, 1985) и t-критерий Стьюдента (Статистический ..., 2018) в пакете программ Excel; построение дендрограммы в программе «Statistica 6.0».

В третьей главе приведены результаты идентификации сортов и линий яровой мягкой пшеницы Северного Казахстана и Западной Сибири по электрофоретическим спектрам глиаина. На основе каталога аллелей глиаинкодирующих локусов Е.В. Метаковского составлены генетические формулы глиаинов для 201 образца пшеницы. Установлено что в 139 образцах пшеницы Северного Казахстана, мономорфные по глиаиновому спектру оказались 77,7%, а остальные 22,3% полиморфные. У западносибирских сортов (62 образца) мономорфными были 63%, полиморфными – 37%. Выявлено, что при достаточно разнообразном материале для двух регионов преобладают одинаковые аллели *Gli-A1f*, *Gli-B1e*, *Gli-D1a* и *Gli-D2q* которые встречаются в различных комбинациях. Тем не менее, статистическими расчетами показано достоверное отличие казахстанской и российской пшеницы по локусам глиаина. Автор показал и сравнил генетическую изменчивость пшеницы на основе частоты аллелей по областям Северного Казахстана и Западной Сибири. На основе расчета генетического сходства (r) и критерия идентичности (I), сделан вывод о достоверном отличии Северо-Казахстанской от западносибирской пшеницы по локусам глиаина *A1*, *B1*, *A2*, *B2* и *D2*.

Для выявления схожести/различия проведена кластеризация общих формул глиаина яровой пшеницы Северного Казахстана и Западной Сибири (тюменской и челябинской селекции) с глиаиновыми формулами пшеницы мировой коллекции (Metakovsky et al., 2018). Установлено что североказахстанская и тюменская пшеница близка к пшенице из Омска и Саратова. Пшеница челябинской селекции сформировали отдельный подкластер с пшеницей из Сербии, Англии и Испании. Таким образом, на основе метода электрофореза глиаина проведена идентификация сортов и линий, составлены генетические формулы, установлен биотипный состав.

Для выявления связей аллелей глиаина с качественными характеристиками, проведен биохимический и технологический анализ зерна 30 сортов яровой пшеницы урожая 2016-2018 гг. с установленными формулами глиаина. Приведены качественные характеристики зерна сортов пшеницы в зависимости от сочетания аллелей глиаинкодирующих локусов. Для группирования 30 сортов по схожим и близким значениям качества зерна проведена кластеризация, по методу Уорда, на основе результатов биохимической и технологической оценки. После кластеризации, результаты

биохимической и технологической оценки были объединены и получены средние значения. Как оказалось, сочетание аллелей *Gli-A1f*, *Gli-B1e*, *Gli-D1a*, *Gli-A2q* в условиях Северного Казахстана наиболее удачное для формирования качественных показателей зерна и хлеба.

В четвертой главе представлены результаты идентификации 201 образцов пшеницы методом денатурирующего электрофореза высокомолекулярных субъединиц глютеинов по Лэмбли (Laemmli, 1979). Установлено, что в пшенице обеих регионов, локус *Glu-A1* представлен тремя аллелями, по локусу *Glu-B1* в Северо-Казахстанской пшенице идентифицировано шесть, а в западносибирской четыре аллеля. По локусу *Glu-D1* в пшенице Западной Сибири идентифицировано два аллеля, а в североказахстанской четыре. На основе математических расчетов показаны типы и частота комбинаций глютеина у сортов и линий мягкой пшеницы Северного Казахстана: «2*, 7+9, 2+12» - 28,7%, «2*, 7+9, 5+10» - 16,5% и «Null, 7+9, 5+10» - 15,8%, а у западносибирской: «2*, 7+9, 5+10» - 35,5%, «2*, 7+9, 2+12» - 17,7%. При оценке вклада субъединиц глютеина в хлебопекарное качество, максимальные 10 баллов, присвоены сортам: Карабалыкская 9 (2*, 13+16, 5+10), Астана 2, Челябинская степная и Мильтурум 45 (2*, 7+8, 5+10). Остальные сорта оценивались от 7 до 9 баллов, что говорит о достаточно хорошем хлебопекарном качестве. Как и в предыдущей главе, автор провел сравнительный статистический анализ частоты встречаемости аллелей глютеина по областям Северного Казахстана и Западной Сибири. В итоге, расчет критерия идентичности и генетического сходства западносибирской и Северо-Казахстанской пшеницы показал достоверное отличие друг от друга по глютеинкодирующему локусу *Glu-B1*. Для подтверждения и уточнения аллельного состава генов глютеина, методом ДНК-анализа, были подобраны 14 пар праймеров к основным генам глютеина для 12 северо-казахстанских сортов. В результате ПЦР установлен полиморфизм некоторых сортов пшеницы, который не был выявлен электрофорезом запасного белка-глютеина. Таким образом, применение ДНК- и белковых маркеров позволило получить максимально объективную информацию об аллельном составе локусов *Glu-1* яровой мягкой пшеницы, а полученные сведения могут помочь в селекционной работе по отбору наиболее ценных генотипов.

Для установления связей компонентов глютеина с качественными характеристиками зерна и хлеба проведен биохимический и технологический анализ 73 образцов пшеницы (33 сорта и 40 селекционных линий) урожая 2016-2018 гг. с известными формулами глютеина.

Зависимость того или иного признака от наличия аллелей глютеина *Glu-A1b*, *Glu-B1c*, *Glu-D1a* и *Glu-D1d*, определена на основе таблицы сопряженности и расчета хи-квадрат по часто встречающимся аллелям.

Автором были дополнительно использованы такие критерии связей как коэффициенты ассоциации и контингенции. В результате была установлена зависимость наличия аллеля глютеина с определенным качественным, технологическим признаком.

В пятой главе представлены результаты биохимического, технологического анализа тюменских и шортандинских сортов в различных агроклиматических условиях. Зерно оценено по таким признакам как масса 1000 зерен, содержание протеина, количество и качество клейковины, натура зерна, стекловидность, седиментационный осадок. На альвеографе Шопена и фаринографе Брабендера тесто из муки тюменских и шортандинских сортов тестировалось по таким признакам как упругость и растяжимость теста, энергия деформации теста, отношение упругости к растяжимости теста, водопоглотительная способность, валориметрическая оценка. После пробной лабораторной выпечки, готовый хлеб (формовой и подовый) оценивался по объему, формоустойчивости, пористости и в конце ставилась общая хлебопекарная оценка.

Замечания и пожелания по содержанию и оформлению диссертационной работы. В целом, полученные автором в ходе проведенных исследований материалы обобщены, оформлены и изложены в диссертации в соответствии с требованиями ВАК РФ. Структура диссертации и автореферата идентичны, заключение и рекомендации по использованию результатов исследований полностью вытекают из результатов проведенных экспериментов. Однако к оппонируемой работе имеются замечания:

1. Не имеются ссылки на работы казахстанских ученых в данном направлении. Или исследования в данном направлении не проводились.

2. Дан подробный анализ агроклиматических условий двух разных географических пунктах, не указаны содержание гумуса в почвенно-климатических условий двух географических пунктов: НИИСХ Северного Зауралья (Тюмень, Россия) и НПЦЗХ имени А.И. Бараева (Шортанды, Казахстан), однако было бы целесообразно указать и содержание гумуса в разных типах почв.

Общее заключение по оппонируемой работе. Диссертационная работа соискателя Утебаева Марала Ураловича на тему: «Влияние аллелей глиадин- и глютеинкодирующих локусов на качество зерна яровой пшеницы *Triticum aestivum* L.» является завершенным научно-исследовательским трудом по актуальным аспектам современной селекции яровой пшеницы, выполненным на высоком методическом уровне с использованием новых методических подходов и оборудования. Полученные автором данные достоверны, выводы и предложения научным подразделением и использования практической селекции обоснованы. Установленные связи глютеина и глиадин с биохимическими и технологическими показателями позволяют выявить из

генофонда генотипы яровой мягкой пшеницы для практической селекции, а также служить критерием для отбора на качество зерна. Составленные генетические формулы глиадины и глютелина могут быть использованы в идентификации сортов и определении их сортовой чистоты. Отмечена важность оценки аллельного состава глиадин- и глютеинкодирующих локусов, связанных с показателями качества зерна, при использовании сортов в различных агроклиматических условиях. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, из них 3 – в изданиях из перечня ВАК РФ, 5 – в международных изданиях (Web of Science и Scopus), 8 статей – в других изданиях. Результаты исследований прошли апробацию на Международных научно-практических конференциях. Соискатель Утебаев М.У. является соавтором двух сортов яровой пшеницы Таймас и Аль-Фараби, они внесены в Госреестр Республики Казахстан. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Считаю, что диссертационная работа соответствует требованиям Положения ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней, а ее автор Утебаев Марал Уралович – присуждению ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Доктор биологических наук, профессор,
зав. лабораторией селекции на устойчивость
к абиотическим и биотическим стрессовым факторам
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
фитопатологии»

Тел: +7-916-224-96-18
E-mail: sul20@yandex.ru

Темирбекова Сулухан
Кудайбердиевна

Заверяю подпись д.б.н., профессора
С.К. Темирбековой, помощник директора по кадровым вопросам
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
фитопатологии»



Кузина Д.В.

«7» июня 2023 г.

Адрес: 143050, РФ, Московская область, Одинцовский район,
р.п. Большие Вяземы, ул. Институт, владение 5.
Тел.: (495) 597-42-28, E-mail: vniif@vniif.ru