

ВІДГУК

на дисертаційну роботу ІВАНОВИЧА Ярослава Івановича «Генетичне профілювання для маркер-опосередкованого добору сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

В Україні черешня є важливою промисловою плодовою культурою. Наші селекціонери створили значну кількість сортів черешні, придатних для промислового вирощування та конкурентоздатних на світовому ринку. Важливим для подальших селекційних досліджень є вивчення генетичного різноманіття рослин сучасними методами, зокрема молекулярними. Проте, сорти черешні вітчизняної селекції майже не вивчені на молекулярно-генетичному рівні. Тому наразі вкрай необхідним є створення генетичних профілів сортів черешні української селекції для проведення, перш за все, сучасних селекційних досліджень.

Викладене дає можливість стверджувати, що роботу Я.І. Івановича «Генетичне профілювання для маркер-опосередкованого добору сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції», метою якої було вивчення генетичного різноманіття українських сортів та диких форм черешні сучасними молекулярно-генетичними методами для визначення перспектив використання та консервації генофонду цієї культури в Україні слід визнати важливою та актуальною як з практичного боку, так і для подальшої розробки генетичних основ сучасної селекції культурних рослин, зокрема черешні, а також для подальшого розвитку молекулярної генетики культурних рослин у цілому.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із анотації, списку умовних скорочень, вступу, п'яти розділів, висновків, списку літератури та додатків. Текст зі списком літератури (255 джерел), ілюстраціями (22 рисунки, 15 таблиць) та семи додатками викладено на 158 сторінках машинопису.

У вступі коротко обґрунтовується актуальність досліджень; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; наведено мету і завдання дослідження; дано коротке визначення використаних об'єкта, предмета та методів дослідження; викладено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дослідження та публікації, структуру та обсяг дисертації.

Розділ 1 «Огляд літератури» складається з чотирьох підрозділів, в яких проаналізовано результати досліджень та наявні у літературі відомості про особливості застосування і значення молекулярно-генетичних досліджень для покращення сортименту черешні. Тут розглянуто, зокрема, ботанічні та молекулярно-генетичні характеристики черешні. Далі (підрозділ 1.2), описано основні типи та особливості застосування молекулярних маркерів; проаналізовано використання маркер-опосередкованого добору в селекції сортів черешні та за управління генетичними ресурсами (підрозділ 1.3); проаналізовано результати досліджень локусів кількісних та якісних (менделівських) ознак черешні (підрозділ 1.4). У цілому огляд літератури є аналітичним, містить науково обґрунтовані узагальнення. У ньому достатньо висвітлено останні експериментальні дані з питань, що мають відношення до теми дисертації. Огляд свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в даній галузі досліджень, уміння чітко викласти стан та перспективи досліджень, а також коротко і зрозуміло обґрунтувати актуальність, роль та значення власного дослідження у контексті накопичених світовою наукою знань та сучасних викликів. Важливо, що основні положення літературного огляду дисертаційної роботи опубліковано у фаховому журналі у вигляді оглядової статті.

Розділ 2 «Матеріали і методи досліджень» складається з п'яти коротких підрозділів, у першому з яких коротко, чітко та ясно охарактеризовано використаний матеріал (понад 200 зразків ДНК, виділених зі 110 сортів та форм черешні, відібраних в колекційних насадженнях низки науково-

дослідних закладів, а також у приватних господарствах та природних популяціях дикої черешні). Далі наведено використані методи виділення загальної ДНК та проведення ПЛР за допомогою кількох методів генетичного профілювання, дещо модифікованих автором. Наведено також особливості обробки ДНК ендонуклеазами рестрикції; горизонтального, вертикального та капілярного електрофорезу нуклеїнових кислот, їх забарвлення, які також дещо модифіковані автором. Статистичний та біоінформатичний аналіз проведено із застосуванням загальноприйнятих та адекватних щодо вирішуваних завдань методів. У цілому було використано сучасні методи, за допомогою яких отримано коректні результати, адекватні стосовно поставлених задач дослідження.

Розділ 3 «Аналіз генетичного різноманіття сортів черешні української селекції» складається з трьох підрозділів. Тут наведено і обговорено наступні дані, отримані автором дисертаційного дослідження.

У підрозділі 3.1. «Оцінка генетичного різноманіття» автор спочатку навів дані про те, що рівень дискримінаційних можливостей досліджених автором IRAP- та REMAP-ПЛР маркерів виявився низьким. Автор робить висновок про те, що для рутинного генетичного профілювання сортів черешні ці маркерні системи інтересу не представляють. Проведення досліджень з використанням восьми праймерів для ISSR-ПЛР при вивченні 24 сортів черешні дозволило встановити, що за маркерним індексом (MI) та показником розділювальної здатності (Rp) кращими для оцінки поліморфізму генотипів черешні серед випробуваних виявились праймери UBC 835, 836 та 881. Генетичне профілювання із використанням мікросателітних маркерів, у якому було оцінено показники генетичного різноманіття та дискримінаційні можливості використаних маркерів, дозволило виявити низку найбільш інформативних локусів, що їх детально описано у тексті дисертації.

У підрозділі 3.2 «Підбір мінімально необхідних наборів мікросателітних маркерів» автор наводить результати вивчення імовірності ідентичності (PID), котра дозволяє оцінити середню імовірність того, що два незалежні

зразки будуть мати ідентичні генотипи. У даному дослідженні PID дозволяє оцінити, скільки локусів необхідно для достовірної генетичної ідентифікації дослідженої вибірки сортів черешні. У результаті ретельно спланованих і чітко проведених досліджень автор встановив, що лише використання всіх вибраних ним 18 MS локусів дозволило успішно розрізнити всі 94 досліджені сорти та форми. Водночас, застосування шести MS локусів, що входять до рекомендованого ECPGR переліку MS локусів та генотипів дозволило ідентифікувати лише 81 із 94 вивчених генотипів черешні. На основі отриманих даних автор підсумовує, що MS локуси з рекомендованого переліку мають обмежені дискримінаційні можливості та мало придатні для ідентифікації великої кількості генотипів черешні.

У підрозділі 3.3 «Генетична конституція та спорідненість сортів черешні» спочатку наведено дані, отримані за використання ISSR-ПЛП маркерів. Для з'ясування спорідненості сортів черешні автор використав програму STRUCTURE, в основі якої лежить кластеризація із використанням Баєсівського підходу, а також метод UPGMA-кластеризації. Отримані результати дозволили авторові розділити досліджені сорти на п'ять кластерів. За використання мікросателітних маркерів (SSR-ПЛП маркерів) автор застосував метод UPGMA-кластеризації. Отримані результати дозволили розділити досліджені сорти на чотири кластери. На загал, розподіл сортів по групах, отриманий на основі порівняння наборів SSR-ПЛП маркерів за своєю структурою переважно узгоджується із результатами дослідження автора, отриманими за використання ISSR-ПЛП маркерів. Автор підкреслює, що відмінності у кластеризації зумовлені різницею в наборі досліджених генотипів, використанні різних типів маркерів, їх кількості, характеру успадкування та алгоритмами кластеризації відповідних методів. У цілому, отримані автором результати підтверджують високу генетичну подібність та взаємне розміщення на дендрограмі в першу чергу близько споріднених сортів та їх відмінність від сортів західноєвропейської селекції. Потім автор за дослідження 19 MS локусів (151 маркер) оцінив 94 сорти та форми

черешні і показав їх приналежність до десяти генетичних пулів. Переважна більшість зразків (сортів та форм) виявились генетично гетерогенними, що автор пояснює наслідком направленої гібридизації та/або проявом системи гаметофітної самонесумісності. Потім генетичну спорідненість між вивченими зразками автор оцінив незваженим методом об'єднання найближчих сусідів (UWN-J). Отримані результати дозволили йому розділити досліджену вибірку на три кластери, які він у тексті детально описав.

Розділ 4 «Маркер-опосередкований добір сортів черешні української селекції» - це виклад результатів досліджень, перш за все, варіації алельних станів гена *PavCNR12* (підрозділ 4.1) та самонесумісності у сортів черешні (підрозділ 4.2). З метою розробки альтернативного методу ідентифікації алельних варіантів гена *PavCNR12* (гена, задіяного у формуванні ознаки «маса плодів») автор провів *in silico* їх ампліфікацію із праймерами CNR12-C2-F та -R з наступним розщепленням ампліфікатів рестриктазами. У результаті було підібрано оптимальну рестриктазу, *TaiI* (ACGT↓) (ізошизомер MaeII - A↓CGT), використання якої дозволило диференціювати всі три відомі алелі. Отримані дані підтверджено методом прямого сиквенування ПЛР-ампліфікатів промоторної ділянки гена. Проведене автором порівняння отриманих послідовностей із уже відомими алельними варіантами гена підтвердило результати щодо стану *PavCNR12*-алелей, отримані із використанням нових CAPS-маркерів. Автор справедливо стверджує, що розроблений ним метод дозволяє швидко та надійно проводити ідентифікацію алельних варіантів *PavCNR12-1*, -2 та -3 без використання затратної та трудомісткої процедури сиквенування. Отримані CAPS-маркери є кодомінантними та дійсно дозволяють чітко відрізнити гомо- та гетерозиготні форми за вивченою ознакою.

Далі наведено результати вивчення варіації алельних станів гена *PavCNR12* з використанням розробленого методу генотипування. Показано, що 67 із 70 досліджених сортів черешні є носіями алеля *PavCNR12-1*. При

цьому 36 сортів (51% від загальної кількості) є гомозиготними за цією алеллю, 16 сортів мають генотип *CNR12-1/2*, а 4 - генотип *CNR12-1/3*. Автор підкреслює, що у вивченій ним вибірці частота зустрічальності бажаної алелі *PavCNR12-1* є вищою, а інших небажаних алелей нижчою, ніж повідомлялось закордонними дослідниками. Автор вважає, що цю різницю можна розглядати як приклад високого рівня ефективності селекції черешні в Україні.

Цікаво, що проведений аналіз нових та порівняння із відомими алельними варіантами гена *PavCNR12* виявив у восьми сортів черешні наявність раніше не відомих алелей цього гена.

Проведене також вивчення асоціації маркерів МС локусів CPST038 та BPPST034 із CAPS-маркерами та алелями гена *PavCNR12*, що їх пов'язують з ознакою «маса плодів». Серед 70 досліджених генотипів 37 виявились гомозиготами за *PavCNR12-1*, причому у 25 з них гомозиготний стан за цією алеллю корелював із С38/В34 гаплотипом 190/255. Другу алель *PavCNR12-2* було виявлено у 17 сортів, при цьому зчеплення із С38/В34 гаплотипом 204/235 виявлено у 13 сортів. Алель *PavCNR12-3* виявлена у семи сортів; зчеплення із С38/В34 гаплотипами 192/223 та 192/225 виявлено у п'яти з них. Виявлено також інші алелі, що є, вірогідно, різновидом алелі *PavCNR12-3* із різними одонуклеотидними замінами, які змінили кількість сайтів рестрикції для *TaiI*. На основі отриманих даних автор розробив нову модель асоціації функціональних гаплотипів МС локусів С38/В34 із розмірами плодів у черешні, за основу якої він узяв раніше ідентифіковані алельні варіанти гена *PavCNR12*, для яких показано зв'язок із масою плодів, та доповнив відомостями про зв'язок С38/В34 гаплотипів із масою плодів та розробленими CAPS-маркерами.

У підрозділі 4.2 «Самонесумісність у сортів черешні» спочатку наведено результати ідентифікації алелей самонесумісності (*S*). За аналізу 120 зразків черешні за допомогою трьох пар консенсусних (вироджених) праймерів ідентифіковано 17 *S*-алелей та 243 *S*-гаплотипи. Окрім відомих раніше, автор

знайшов три імовірно нові *S*-алелі, що характеризуються специфічними продуктами ампліфікації першого та другого інтрону гена *S*-РНКази та/або інтрону гена *SFB* і які було названо згідно до існуючої номенклатури *S*-алелей S_{X1} , S_{X2} та S_{X3} . Проаналізовані сорти черешні було віднесено до 17 відомих груп перехресної несумісності за винятком сорту Єдина із генотипом S_6S_{17} , який віднесено до групи О (універсальні запилювачі).

Далі наведено результати вивчення нерівномірності розповсюдження *S*-алелей. Виявлено, що у дослідженій вибірці із 80 зразків (українських сортів та форм черешні) домінують алелі S_9 (21,4%), S_5 (18,5%), S_3 (14,9%), S_6 (13,1%), S_1 (12,5%) та S_4 (8,3%). Встановлений алельний профіль узгоджується із описаною раніше картиною розповсюдження алелей серед європейських сортів черешні. Проте значна поширеність алелей S_5 та S_9 в українських сортах відрізняє їх від сортів з інших регіонів Європи. Встановлено й деякі інші відмінності за поширенням різних *S*-алелей між українськими сортами і культивованими формами дикої черешні та сортами зарубіжної селекції.

У короткому за об'ємом, але насиченому за змістом заключному розділі 5 «Аналіз та узагальнення результатів» проведено чітке та коректне обговорення найважливіших результатів дослідження. Тут особливу увагу приділено значенню генетичного профілювання сортів черешні та аналізу генетичного різноманіття, а також аналізу господарськоцінних ознак у черешні та перспектив впровадження маркер-опосередкованого добору у селекційні програми.

Таким чином, автором дисертаційної роботи дійсно, як він пише в узагальнюючому висновку, «використовуючи молекулярні маркери, було оцінено генетичне різноманіття сортів черешні української селекції та форм дикої черешні. Також проведено оцінку дискримінаційних можливостей кількох типів маркерів при генетичному профілюванні. Висвітлено рівень генетичної спорідненості та з'ясовано генетичну конституцію сортів та форм черешні за молекулярними маркерами. Ідентифіковано алельні варіанти гена

PavCNR12, алелі самонесумісності *S*-локусу та групи перехресної несумісності. Запропоновано більш актуальну модель асоціації маркерів МС локусів із CAPS-маркерами та алелями гена *PavCNR12*. Проаналізовано нерівномірність розповсюдження *S*-алелів у Сх. Європі».

У цілому експериментальний матеріал викладено доступною мовою, чітко, лаконічно і логічно, основні результати достатньо підтверджено оригінальними та якісними ілюстраціями, зокрема, чіткими фотографіями та схемами. У процесі викладу автор ретельно і критично аналізує власні результати, робить у процесі опису коректні заключення та підсумки. Обговорення та узагальнення проведено чітко, на високому професійному рівні, із залученням літературних даних по всьому тексту дисертації, воно свідчить про те, що автор своїм дослідженням зробив істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі молекулярної генетики рослин.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно випливають з експериментальних даних. Вони викладені у цілому достатньо чітко, лаконічно та ясно.

Зауважень щодо наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. У дисертації є деякі граматичні, орфографічні і стилістичні помилки, які, хоч і не часто, проте трапляються у тексті рецензованої дисертаційної роботи. Проте вони не викривляють науковий зміст рецензованої роботи.

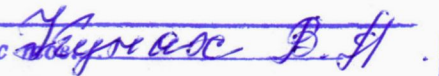
Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота **«Генетичне профілювання для маркер-опосередкованого добору сортів черешні (*Prunus avium* L.) української селекції»** заслуговує позитивної оцінки. Вона

відповідає сучасному рівню біологічних, зокрема – молекулярно-генетичних, досліджень і вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №657 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор — **Іванович Ярослав Іванович** заслуговує на присудження йому пошукового наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді 15 наукових праць, з них - 6 статей у фахових виданнях, розділ у монографії, науковий звіт, 7 тез доповідей на наукових конференціях.

Зав. відділом генетики клітинних популяцій
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор біол. наук, професор

В.А. Кунах

Підпис 
посвідчується



