

## ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію **Колесник Ольги Олександровни** «Молекулярно-генетичний поліморфізм сортів пшениці м'якої озимої та асоціації алелів мікросателітних локусів і господарсько цінних ознак» представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

**Актуальність теми дисертаційної роботи.** Створення сучасних сортів пшениці, які поєднують високу продуктивність, технологічні якості, а також стійкість до стресових чинників довкілля базується на поглибленні фундаментальних знань та використанні новітніх практичних розробок для покращення вихідних селекційних матеріалів даної культури. Інтерес до пшениці викликаний тим, що вона є однією з найважливіших продовольчих культур у світі і України зокрема, оскільки продукти переробки її зерна становлять основу харчового раціону населення нашої держави.

На сьогодні, вивчення й оцінка генетичного різноманіття пшениці є актуальним питанням, вирішення якого значно сприяє добору цінних генотипів та донорів господарсько-корисних ознак і, відповідно, прискоренню селекційного процесу. Це викликає необхідність пошуку та застосування в генетико-селекційні програми даної культури методів, які дозволяють проводити диференціацію, паспортизацію та ідентифікацію різних генотипів та сортів.

Одним із підходів до вирішення поставлених завдань є використання різних типів молекулярних маркерів, зокрема мікросателітного аналізу. Встановлення особливостей генетичної диференціації сортів пшениці української селекції за МС-маркерами сприяє визначенню рівня їх поліморфізму та окреслює подальше дослідження з ідентифікації маркерів, асоційованих із локусами кількох ознак, що дозволить оптимізувати схему складного селекційного процесу. Крім того, диференціація та ідентифікація сортів пшениці за МС-аналізом обумовлює новий рівень правового захисту інтелектуальної власності на сорти рослин, що сприяє виходу українського насіння на зарубіжні ринки, знижує ризики

недобросовісної конкуренції та «запозичень» створених у нас об'єктів інтелектуальної власності. Це особливо важливо після вступу України до Світової Організації Торгівлі (СОТ), де однією з умов реєстрації сортів є їх однорідність. Якраз генетична неоднорідність, яка суперечить міжнародним вимогам, є одним з головних факторів, що стримують або ж блокують реєстрацію українських сортів та гібридів за кордоном. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Колесник О.О., присвячена дослідженню молекулярно-генетичного поліморфізму сучасних сортів пшениці м'якої озимої та асоціації алелів мікросателітних локусів і господарсько-цінних ознак є безумовно актуальною і практично значимою, оскільки такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал як для подальшого розвитку спеціальної генетики даної культури, так і для практичного використання у селекції.

У дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів, чотирьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який налічує 182 найменування та додатків. Роботу викладено на 249 сторінках комп'ютерного тексту, вона ілюстрована 28 рисунками та містить 19 таблиць.

**У розділі «Огляд літератури»** узагальнено інформацію щодо сучасних напрямів молекулярно-генетичних досліджень та організації геному пшениці м'якої озимої. Систематизовано дані щодо основних типів молекулярних маркерів та галузі їх застосування, викладена інформація про використання МС-аналізу для досліджень геному пшениці, наведені дані щодо виявлення асоціацій алелів МС-локусів і господарсько-цінних ознак. Представлено морфологічний та молекулярно-генетичний методи диференціації для захисту нових сортів, проаналізовані проблеми диференціації сучасних сортів пшениці.

**У розділі «Матеріали і методи»** детально описано умови проведення експериментів: рослинний матеріал, представлений 48 сортами української селекції, схема польових досліджень та визначення господарсько-цінних ознак сортів пшениці, методики виділення сумарної ДНК та проведення полімеразної ланцюгової реакції з праймерами до 17 МС-локусів, а також методи статистичної обробки даних.

**У розділі «Аналіз генетичного різноманіття сучасних українських сортів пшениці м'якої озимої»** досліджено молекулярно-генетичний поліморфізм сортів пшениці м'якої озимої селекції Селекційно-генетичного інституту – національного центру насіннєзвавства та сортовивчення НААН України 2003 – 2013 років реєстрації. Загалом детектовано 114 алелів за 17 МС-локусами серед 48 сортів пшениці. Показано, що кількість алелів на локус варіювала в діапазоні від 4 до 10, із середнім значенням 6,71. Встановлено, що 41 проаналізований сорт виявився гетерогенным за 1 – 14 дослідженими МС-локусами з 17 протестованих. За результатами визначення генотипного складу виявлені сорти, що складаються з одного – п'яти генотипів. Загалом знайдено 172 генотипи на виборці протестованих за 17 МС-локусами українських сортів озимої пшениці та проаналізовано розподіл їх частот на загальній виборці сортів. Визначено статистично значимі відмінності розподілу частот алелів за дослідженими МС-локусами свідчать про селекційну та адаптивну цінність певних алелів цих локусів для умов Півдня України. Показано, що для більшості досліджених сортів модель кластеризації відповідала їх походженню. Проведена паспортизація сортів за даними мікросателітного аналізу та складені їх ідентифікаційні формули.

**У розділі «Моделювання системи мікросателітних маркерів для забезпечення однозначної диференціації та ідентифікації сортів пшениці»** представлено результати досліджень стосовно створення наборів мікросателітних маркерів для диференціації та ідентифікації сортів пшениці. Усього за матеріалами роботи сформовано три набори маркерів. Для створення компактної робочої колекції, яка складається із сортів,

адаптованих до умов Півдня України та містить у собі всі необхідні для однозначної ідентифікації алелі, із загального числа сортів виділено два набори, кожен з них містить усі алелі, які були знайдені за дослідженнями 17 МС-локусами. Перший (мінімальний) набір складається із 26 ліній, а другий (35 ліній) відрізняється від першого відносно вищою кількісною представленістю рідкісних алелів. Дослідження алельного складу МС-локусів у ліній, виділених із сортів пшениці м'якої озимої показало, що для їх однозначної диференціації та ідентифікації достатньо обрати шість – вісім найбільш інформативних МС-локусів. Також було відібрано 26-35 сортів, що могли б скласти колекцію сортів-еталонів, носіїв усіх алелів, виявлених за 17 МС-локусами, які притаманні сортам СГІ – НЦНС.

*У розділі «Виявлення зв'язку між поліморфізмом сортів за алельним складом мікросателітних локусів та низкою господарсько цінних ознак»* представлено дані щодо диференціації та ідентифікації ліній сортів пшениці за молекулярно-генетичною характеристикою алельного складу мікросателітних локусів. З метою розробки ефективних методів диференціації та ідентифікації генотипів, встановлення генетичної чистоти ліній, віднесення ліній до того або іншого сорту проведена диференціація та ідентифікація ліній сортів пшениці за алельним складом МС-локусів, а також їх кластеризація на основі генетичної схожості. Встановлено спроможність розробленої пошукачем системи відрізнати складові ліній одного сорту і, таким чином, відрізнати його від інших близькоспоріднених сортів, що були створені у тому ж селекційному центрі за близьких умов середовища вирощування та вихідного матеріалу. Сорти згруповано в два загальні кластери, субкластеризація яких подібна до субкластеризації окремих сортів пшениці. Показано, що застосування МС-аналізу для диференціації близькоспоріднених сортів надало можливість висвітлити внутрішню генетичну структуру сортів, розділити їх на сорти лінійного типу та гетерогенні, а також зафіксувати серед гетерогенних сортів такі генотипи окремих рослин, які значно відрізняються від решти досліджених генотипів

даного сорту.

Проведена диференціація та ідентифікація сортів пшениці за низкою господарсько-цінних ознак. Виявлено кореляція міжсортових дистанцій, оцінених за мікросателітними маркерами, та господарсько-цінними ознаками. Для визначення ступеню подібності дендрограм, побудованих за МС-маркерами та господарсько-цінними ознаками, порівнювали між собою відповідні матриці дистанцій (Мантель тест). Результати показали повну відсутність відповідності між двома методами диференціації сортів пшениці м'якої озимої.

**У розділі «Асоціації алелів мікросателітних локусів і господарсько-цінних ознак»** наведено результати виявлення асоціацій між наявністю у генотипі певних алелів конкретного МС-локусу та рівнем розвитку ознаки, що вивчалася. Визначення асоціацій полягало у виявленні статистично значимих різниць між групами, складеними із носіїв певних алелів, застосуванням підходів варіаційної статистики, основними критеріями якої є наявність достовірної різниці та стабільність її прояву протягом двох – чотирьох сільськогосподарських років. Знайдені асоціації є стабільними та значущими. Виявлено МС-маркер, який був статистично значимо пов'язаний з усіма аналізованими ознаками й характеризувався стабільністю протягом одного – чотирьох сільськогосподарських років для різних господарсько-цінних ознак пшениці, що може свідчити про селекційну та адаптивну цінність певних алелів цього МС-локусу для умов Півдня України. МС-маркери, які були стабільно та статистично значимо асоційовані з господарсько-цінними ознаками пшениці в різні сільськогосподарські роки, можуть бути використані при доборі генотипів з поліпшеними морфологічними та агрономічними ознаками з метою підвищення ефективності селекції.

**У розділі «Аналіз і узагальнення результатів досліджень»** стисло і чітко узагальнені результати експериментальної роботи, які підтверджують обґрунтованість робочої гіпотези автора.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження за темою дисертації виконувалися у відділі загальної та молекулярної генетики СГІ–НЦНС протягом 2009–2014 років у межах НТП УААН «Сільськогосподарська біотехнологія» 2006–2010 рр. за завданням 01.19. «ДНК-типування сортів пшениці за мікросателітними локусами» (№ державної реєстрації 0106U002664); у межах ПНД НААН «Сільськогосподарська біотехнологія» 2011–2015 рр., підпрограма 1. «Поліпшення генотипів рослин з використанням досягнень сучасної біотехнології» за завданням 23.01.01.03.Ф «ДНК-технології ідентифікації сортів, ліній, гібридів сільськогосподарських культур, розробка молекулярно-генетичних паспортів та поповнення бази даних ДНК-типування» (№ державної реєстрації 0111U006104).

**Новизна дослідження та одержаних результатів.** Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором вперше досліджено алельне різноманіття за МС-локусами на виборці сучасних сортів Півдня України. Визначені молекулярно-генетичні характеристики, диференційовані та ідентифіковані сучасні сорти пшениці селекції СГІ – НЦНС 2003 – 2013 років реєстрації за алельним складом МС-локусів. Досліжена внутрішньосортова гетерогенність та розподіл частот алелів МС-локусів, проведена паспортизація сучасних сортів пшениці м'якої озимої за даними алельного складу МС-локусів. Виявлені асоціації алельного складу МС-локусів і господарсько-цінних ознак у генотипів сортів, адаптованих до умов вирощування Півдня України. Здійснене моделювання мінімально необхідної системи МС-маркерів для забезпечення однозначної диференціації та ідентифікації сортів пшениці із спільним походженням з одного селекційного центру.

**Теоретичне значення результатів досліджень.** Дослідження, проведені автором, вносять суттєвий вклад у розвиток генетики рослин, зокрема популяційну та молекулярну генетику пшениці м'якої озимої, надають нові перспективи для вирішення фундаментальних питань дослідження

генетичного різноманіття виду *Triticum aestivum* L. Результати, наведені у дисертації, поглинюють та розширяють уявлення про структурно-функціональну мінливість геномів рослин та генетичну дивергенцію виду.

**Практичне значення результатів досліджень** полягає у встановленні асоціацій алельного стану МС-локусів і господарсько-цінних ознак пшениці, що надає можливість рекомендувати певні МС-маркери для використання в селекції. Створені мінімально необхідні робочі набори МС-маркерів, що близькі за диференційною здатністю та складаються з шести – восьми МС-локусів, рекомендовано використовувати для проведення однозначної диференціації та ідентифікації сортів із спільним походженням з одного селекційного центру.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Дисертант проаналізував значний масив даних літератури з молекулярно-генетичних досліджень та поліморфізму різних типів ДНК-маркерів пшениці м'якої озимої. Автором доведена важливість вивчення молекулярно-генетичних маркерів для їх практичного застосування в генетико-селекційних дослідженнях.

Понад 80 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати значний обсяг експериментального матеріалу. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: молекулярно-генетичні методи (екстракція та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофорез продуктів ампліфікації ДНК; морфометричні та колориметричні методи; статистичні методи.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу чималого фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням методів досліджень. Достовірність результатів підтверджується

відповідною статистичною обробкою. Тому, вважаю, що наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

**Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті.** Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на міжнародних наукових форумах. Зокрема, за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 24 наукові праці, у тому числі шість статей, які включено до переліку фахових (з них одна – у зарубіжному виданні), а також 18 тезах за матеріалами міжнародних та національних наукових конференцій. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на 18 наукових конференціях.

#### **Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.**

Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Проте слід зазначити деякі слабкі місця представленої роботи:

1. Текст дисертації містить певну кількість пропущених слів, орфографічних та стилістичних помилок, зокрема «мікросателіти – особливий послідовностей» (с.2); «рібосомальні» (с.17) замість «рибосомні»; «одного від одного» (с.18) замість «один від одного»; «фертильний пагон» (с.43); «данні» (с.59) замісь дані; «слідують» (с.69); «значно асоційований» (с.82); «алелей» замість «алелів» (с.143), «у дисертаційному дослідженні виявлена гетерогенність» (с.147) і т.і.
2. Рівень вірогідності Р велике означає вірогідність на рівні 0,95 % , а р – мале якраз 0,05, проте автор всюди застосовує Р- велике.
3. Не зовсім коректні підписи до рисунків 3.1, 3.2, 3.3, бо це не «електрофорограма в денатуруючому ПААГ», а електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК з праймерами до певних мікросателітних локусів. Крім того необхідно було вказати калібривку маркера у п.н., а не тільки його назву.
4. Підписи до рисунків і таблиць краще було б вмістити на одній сторінці, а не

переносити на іншу.

Проте вказані зауваження не носять принципового характеру і не знижують наукової цінності дисертації.

**Рекомендації щодо використання результатів дисертаційних досліджень в практиці.** Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів молекулярної генетики рослин. Результати роботи Колесник О.О. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках інститутів, що займаються питаннями генетики та селекції сільськогосподарських культур, а також курсах лекцій з молекулярної генетики рослин Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.** Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, рецензована дисертаційна робота «Молекулярно-генетичний поліморфізм сортів пшениці м'якої озимої та асоціації алелів мікросателітних локусів і господарсько цінних ознак» є завершеною науковою роботою, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Колесник Ольга Олександрівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,  
ст. н. сп. відділу генетичної інженерії  
Інституту фізіології рослин і генетики

НАН України, доктор біол. наук

Підпис тов.

О. В. Дубровна

ПОСВІДЧИК

Учений секретар інституту фізіології рослин і генетики АН України

Укрінстітут фізіології рослин і генетики АН України

Підпис

Марк

« 9 » жовтня 2015

О.В. Дубровна