

## ВІДЗИВ

офіційного опонента **Дробик Надії Михайлівни** про дисертаційну роботу **Рабокось Анастасії Миколаївни «Оцінка генетичного поліморфізму у рослин за допомогою довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну на внутрішньо- та міжвидовому рівнях»**, подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика 091– біологічні науки

**Актуальність теми.** Робота Рабокось А.М. присвячена важливій проблемі – дослідженню ефективності молекулярно-генетичного методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну для диференціації рослин на внутрішньо- та міжвидовому рівнях. Відомо, що із введенням молекулярних маркерів у практику біологічних досліджень з'явилися нові можливості вивчення генетичного різноманіття, визначення генетичної спорідненості рослин тощо. Використання ДНК-маркерів відкрило великі перспективи для маркування генів, ідентифікації сортів та культур, філогенетичного аналізу, оцінки геномної нестабільності, детального картування хромосом, ідентифікації генів, їх клонування, конструювання нових сортів рослин та їх паспортизації. Нині актуальним є розвиток таких маркерних систем, які передбачають визначення поліморфізму цільових послідовностей генів. У цьому контексті перспективним є використання інтронів, які безпосередньо пов'язані з конкретними функціональними генами, помірно еволюціонують, є варіабельними ділянками генів, але при цьому вони фланкуються достатньо консервативними екзонами. Зважаючи на такі властивості, інтрони можна розглядати як універсальні і зручні інструменти молекулярно-генетичних досліджень. Прикладом використання молекулярно-генетичних маркерів, створених завдяки розумінню екзон-інтронної структури цих генів є метод оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну (tubulin base polymorphism, TBP). Це достатньо новий метод, і, тому актуальним і доцільним є перевірка його ефективності з використанням різних видів та сортів рослин. Саме тому, представлена робота є актуальною.

Дисертаційне дослідження виконане в ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» у рамках бюджетних науково-дослідних робіт

«Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (2012–2016 рр.), «Популяційна біологія і генетика видів деревних рослин на антропогенно трансформованих ландшафтах» (2014–2017 рр.) та «Створення молекулярно-генетичних маркерів для диференціації різних генотипів рослин на основі вивчення поліморфізму інтронів генів їх цитоскелетних білків» (2015–2019 рр.).

**Достовірність і обґрунтованість результатів наукових положень і висновків.** Подані у дисертації узагальнення та висновки обґрунтовані великим масивом результатів проведених експериментальних досліджень, і тому носять об'єктивний характер. У дисертаційній роботі Рабоконт А.М. проводила дослідження з використанням великої вибірки рослин: представників однодольних з родини *Poaceae* та дводольних (з родин *Brassicaceae* та *Linaceae*), а саме природні генотипи рослин та сорти важливих сільськогосподарських культур. Для дослідження поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну у цих рослин використано адекватні молекулярно-генетичні методи (екстракція та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофорез продуктів ампліфікації). Аналіз отриманих результатів проведено з використанням сучасних методів і підходів. Залучення вітчизняних і зарубіжних наукових публікацій з досліджуваної тематики дозволило автору всебічно проаналізувати та обговорити отримані результати.

**Новизна отриманих результатів.** Автором *вперше*: обґрунтовано та розширено можливості застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну для молекулярно-генетичної диференціації та фінгерпринтингу рослин на між- та внутрішньовидовому рівнях; перевірено ефективність цього методу на однодольних та дводольних рослинах; диференційовано сорти вітчизняної селекції таких сільськогосподарських культур як пальчасте просо (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.), пшениця (*Triticum aestivum* L.), ячмінь (*Hordeum vulgare* L.), ріжій (*Camelina sativa* (L.) та льон (*Linum*); проведено молекулярно-генетичні дослідження природних популяцій егілопсу (*Aegilops biuncialis* Vis.) у Криму та щучника антарктичного

*Deschampsia antarctica* E. Desv. в Антарктиці, а також молекулярно-філогенетичний аналіз різних видів роду *Linum* L.

**Практичне значення отриманих результатів.** Автором показано високу ефективність використання ТВР-аналізу для диференціації різних генотипів рослин. Зважаючи на надійність і швидкість отримання вихідних даних завдяки використанню ТВР методу і простоту їх аналізу, цей метод може бути корисним як в молекулярній генетиці рослин при аналізі на всіх таксономічних рівнях, так і в селекційній роботі при створенні та перевірці нових сортів сільськогосподарських рослин. Цей метод може бути рекомендований для оцінки генетичної чистоти та однорідності сортів пшениці, ячменю, рижю та льону. Розроблений Рабокоть А.М. підхід може також бути використаний у дослідженнях генетичних відмінностей між популяціями дикорослих рослин.

**Рекомендації щодо подальшого використання результатів роботи та доцільність продовження і розвитку відповідних досліджень.**

Оскільки ТВР метод поєднує в собі надійність і швидкість отримання вихідних даних, а також простоту їх аналізу, то запропонований Рабокоть А.М. підхід, в основі якого лежить саме цей метод та його модифікації, може бути використаний як в молекулярній генетиці рослин при аналізі на всіх таксономічних рівнях, так і в селекційній роботі при створенні та перевірці нових сортів. Саме це й обумовлює доцільність поглиблення і розвитку цих досліджень.

**Повнота використання в роботі наукової літератури у даній галузі.** Список використаних літературних джерел включає 162 найменування, із них більшість – в іноземних виданнях, що дозволяє повністю охарактеризувати сучасний стан розробки проблеми в світі.

**Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації та автореферату.** Дисертація Рабокоть Анастасії Миколаївни написана у традиційній формі, оформлена відповідно до вимог ДАК МОН України і викладена на 146 сторінках комп'ютерного тексту. Дисертація складається із анотації, списку опублікованих автором робіт, переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів дослідження та їх обговорення, узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота добре

ілюстрована – містить 35 рисунків і 15 таблиць, які допомагають кращому сприйняттю отриманих автором результатів.

У **вступі** дисертант обґрунтовує актуальність дослідження ефективності застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну для генотипування рослин як на міжвидовому, так і на внутрішньовидовому рівнях.

У **розділі 1** «Огляд літератури» Рабоконь А.М. розглянуто та проаналізовано літературні дані щодо основних типів молекулярно-генетичних маркерів; охарактеризовано молекулярно-генетичні маркери на основі поліморфізму довжини інтронів генів; значну увагу приділено питанню використання поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну як інструмента для молекулярно-генетичної диференціації рослин. Огляд літератури написаний ґрунтовно із залученням значної кількості сучасних вітчизняних та іноземних наукових джерел з досліджуваної тематики. Слід зазначити, що кожен із підрозділів огляду є теоретичною базою для експериментальних розділів дисертаційної роботи. Наприкінці «Огляду літератури» автором зроблено короткий підсумок і обґрунтовано необхідність проведення досліджень, яким присвячена дисертаційна робота. Це, з нашої точки зору, дозволяє краще зрозуміти хід експериментального дослідження та структуру рецензованої роботи.

У **розділі 2** «Матеріали і методи досліджень» автор наводить детальні характеристики вихідного рослинного матеріалу: для природних генотипів – місця та час збору рослинного матеріалу, для сортів сільськогосподарських культур – назви сортів та дані про їхнє походження. Автором наведено опис методів, що були використані при проведенні дослідження, а саме: біоінформаційних, молекулярно-генетичних (екстракція та очищення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофорез продуктів ампліфікації) і статистичних (визначення індексу поліморфності, побудова дендрограм, коефіцієнт подібності Нея та Лі, стандартна генетична дистанція Нея). Рациональний підбір методичних підходів дозволив автору успішно реалізувати основні завдання дисертаційної роботи.

Наведені у дисертаційній роботі результати дослідження та їх обговорення представлено у **розділі 3**, який включає шість підрозділів.

У межах **розділу 3** у *підрозділі 3.1.* автором наведено результати використання ТВР методу для диференціювання на молекулярно-генетичному рівні видів пальчастого проса та гусячої трави (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.), їх сортів та різних генотипів. На основі проведених досліджень автором зроблено висновки про можливість успішного застосування ТВР методу для молекулярно-генетичних досліджень рослин цього роду, у тому числі для маркування генотипів та оптимізації селекційного процесу.

У *підрозділі 3.2.* Рабокоть А.М. на основі аналізу 15 кримських популяцій *Ae. biuncialis* оцінено можливості використання поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну у генетичних дослідженнях цього виду. Автором також проведено порівняльний аналіз диференціюючої здатності ТВР методу та його модифікацій між собою з використанням цього об'єкта. Дисертантом підсумовано, що методи, засновані на оцінці довжини інтронів, є джерелом важливої інформації для генетичної характеристики внутрішньовидового поліморфізму злаків, зокрема *Ae. biuncialis*. Цей метод та його модифікації можуть бути використані у селекційних програмах, спрямованих на поліпшення агрономічних та біохімічних ознак злакових культур.

У *підрозділі 3.3.* автором представлено результати дослідження за допомогою ТВР методу міжпопуляційних молекулярно-генетичних відмінностей щучника антарктичного в Антарктиці. Встановлено відсутність відмінностей між вивченими острівними популяціями щучника антарктичного за довжиною ПЛР-продуктів. Жоден із застосованих варіантів методу аналізу поліморфізму інтронів генів  $\beta$ -тубуліну (ТВР, сТВР, сТВР із специфічними праймерами та hТВР) не виявив поліморфізму в дослідженій вибірці рослин, що свідчить про низький рівень генетичного різноманіття досліджених популяцій *D. antarctica*.

*Підрозділ 3.4.* присвячений дослідженню ефективності методу оцінки поліморфізму довжини I-го інтрону генів  $\beta$ -тубуліну для виявлення молекулярно-генетичних відмінностей у сортів пшениці і ячменю. За допомогою ТВР методу вперше вдалося доволі чітко виявити поліморфізм довжини інтронів у злаків. Дисертантом також доведено високий рівень диференційної спроможності цього методу при дослідженні міжсортового

поліморфізму у *T. aestivum* та *H. vulgare*, що може бути використано при розробці селекційних програм для цих видів.

У підрозділі 3.5. наведено результати аналізу поліморфізму довжини I-го та II-го інтронів генів  $\beta$ -тубуліну нових українських сортів і сортозразків *C. sativa*. Використавши обидва варіанти методу поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну, які доповнили один одного, автору вдалося диференціювати досліджені сорти та сортозразки рижю. На основі отриманих результатів Рабокоть А.М. зроблено висновок, що до генетичного аналізу дводольних рослин може бути залучений поліморфізм довжини I-го та II-го інтронів гена  $\beta$ -тубуліну, які можна розглядати як важливі інструменти при подальшій роботі селекціонерів з дослідженими сортозразками рижю.

Найбільшим за обсягом та масивом отриманих експериментальних даних є підрозділ 3.6, у якому подано результати дослідження поліморфізму довжини інтронів гена  $\beta$ -тубуліну у видів льону. За допомогою ТВР та сТВР (combinatorial ТВР, комбінований поліморфізм довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну) методів автору вдалося однозначно розділити п'ять досліджених видів льону. Показано, що ці методи можуть бути успішно застосовані у молекулярно-філогенетичному аналізі видів роду *Linum* L.

Автором проведено ТВР-аналіз 7-ми сортів *L. usitatissimum*, що походять з різних країн і тому є представниками різних селекційних програм, а саме, Китаю, Нідерландів, України та Росії. У результаті всі зразки розподілилися таким чином, що сорти однієї селекції знаходяться поряд один з одним. Отже, за допомогою ТВР методу Рабокоть А.М. вдалося ідентифікувати та диференціювати сорти льону різного селекційного походження.

Дисертантом проведено аналіз ефективності застосування методу ТВР для генотипування льону на прикладі вибірки сортів льону-довгунця української селекції. Встановлено, що більшість сортів льону української селекції є генетично неоднорідними. Показана висока ефективність використання ТВР-аналізу для диференціації генотипів льону в порівнянні з SSR-маркерами (simple sequence repeat).

За допомогою ТВР-аналізу Рабокоть А.М. було досліджено 32 білоруські ландраси *L. usitatissimum*. Це дозволило диференціювати вивчені ландраси, що також підтверджується досить високими значеннями генетичних дистанцій між

ними. Встановлено значну генетичну гетерогенність стародавніх сортів. Отже, за допомогою ТВР вдалося диференціювати ландраси льону, а також дослідити їх внутрішньосортову різноманітність.

Позитивним, на наш погляд, є те, що після подачі результатів дослідження автор проводить їхнє узагальнення. Наведений у роботі підсумок сприяє кращому розумінню структури представленої роботи, дозволяє виокремити найважливіші теоретичні та практичні результати дисертаційної роботи та визначити перспективи подальших досліджень.

**Висновки**, які зроблені здобувачем, відповідають меті і завданням дисертації та обґрунтовані експериментальним матеріалом.

**Автореферат** у цілому відповідає змісту дисертації.

**Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових виданнях, затверджених ДАК МОН України.** Основні положення дисертаційної роботи відображені у 13 наукових робіт, з них 8 статей у наукових журналах та 4 тез у збірниках матеріалів міжнародних і всеукраїнських конференцій, отримано 1 патент на корисну модель.

Водночас, до дисертаційної роботи можна висловити низку *побажань і зауважень*.

1) У змісті роботи недоцільним є використання аббревіатури, адже перелік умовних скорочень подається після змісту. У змісті розділу 3 «Результати дослідження та їхнє обговорення» дублюється назва підрозділів і пунктів, практично кожен підрозділ та пункт звучить як поліморфізм інтронів генів  $\beta$ -тубуліну, у назвах пунктів дублюються назви рослин, які уже зазначені у підрозділах. Для уникнення повторів назви деяких пунктів у змісті роботи можна було б подати лаконічніше.

2) Для кращого сприйняття структури роботи і великого масиву отриманих автором результатів, особливо зважаючи на велику вибірку досліджуваного рослинного матеріалу та застосування дисертантом у кожному конкретному випадку ТВР методу або ТВР методу та його модифікацій, у роботі потрібно було б подати схему досліджень. При цьому слід зазначити, що у текстовій частині роботи автор достатньо добре обґрунтовує доцільність використання саме цих рослин (дикорослих, сільськогосподарських рослин та їх сортів, ландрас льону тощо) для перевірки ефективності застосування методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну.

3) Наведені у роботі результати, крім теоретичного, фундаментального значення, без сумніву мають важливе практичне значення. Автором *вперше* проаналізовано можливість використання ТВР методу та його модифікацій для диференціації та генотипування великої вибірки дикорослих та сільськогосподарських рослин, що важливо, оскільки відкриває подальші перспективи застосування цього підходу. Залишається незрозумілим, чому нові, отримані вперше результати не захищені патентом. При цьому, слід зазначити, що автор дисертації є співвинахідником патенту, однак цей патент стосується отримання приладу для вертикального гель-електрофорезу, який хоч і використовується у рецензованій роботі, але не характеризує отримані автором цікаві та оригінальні результати дослідження.

4) Є зауваження щодо оформлення рисунків. Зокрема, зважаючи на мову написання дисертації, текст на рисунках 1.1 – 1.4 доцільно було б навести українською мовою, хоч автор і дає посилання на джерела, звідки ці рисунки взяті. Підписи та позначення на деяких рисунках (наприклад, рис. 3.10, 3.12, 3.13 та ін.) нечитабельні, і тому важко сприймаються. Підписи, де зображені електрофореграми, типу «Електрофореграма з ампліконами інтронів..», на наш погляд, доречніше було б подати наступним чином «Електрофореграма продуктів ампліфікації, отриманих з використанням праймерів....». На рис. 3.1 відсутнє позначення контролю.

5) Стосовно оформлення роботи, то: повні латинські назви видів доцільно подавати з зазначенням автора, який запропонував назву цього таксона, лише при першій згадці у тексті і далі використовувати лише скорочену родову та видову назви, за тими винятками, коли в одному і тому ж тексті мова йдеться про види різних родів і скорочення родової назви викликає утруднення сприйняття матеріалу.

б) У дисертації є невдалі вирази, складно сформульовані речення, повтори, русизми, невірно вживаються терміни і словосполучення: наприклад, в силу поліморфізму довжини інтронів – замість у зв'язку з наявністю поліморфізму, задачі – замість завдання, спираються на один і той же метод – замість в основі лежить один і той же метод; велике дослідження, проведені дослідження по виявленню і дослідженню, широко поширена, коштовна кормова рослина, разом з тим тощо.



Однак, зазначені зауваження і побажання не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.**

Даючи оцінку дисертаційної роботи Рабоконе А.М. у цілому, слід зазначити, що вона є завершеним науковим дослідженням, яке містить вирішення завдання – з'ясування ефективності молекулярно-генетичного методу оцінки поліморфізму довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну для молекулярно-генетичної диференціації рослин на внутрішньо- та міжвидовому рівнях.

Вважаю, що робота «Оцінка генетичного поліморфізму у рослин за допомогою довжини інтронів генів  $\beta$ -тубуліну на внутрішньо- та міжвидовому рівнях» за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, їхнім теоретичним і практичним значенням, відповідає паспорту спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика, а також вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Рабоконе Анастасія Миколаївна, заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент,

доктор біологічних наук, професор,

декан хіміко-біологічного факультету,

завідувач лабораторії екології та біотехнології

Тернопільського національного педагогічного

університету імені Володимира Гнатюка



*[Handwritten signature]*

Н. М. Дробик

