

ВІДГУК

офіційного опонента,

доктора біологічних наук, завідувача кафедри біології Національного університету «Києво-Могилянська академія» Антонюка Максима Зиновійовича на дисертаційну роботу МІЩЕНКА АНДРІЯ МИКОЛАЙОВИЧА «РОЗРОБКА І ВИКОРИСТАННЯ ДНК-МАРКЕРІВ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ СОРТІВ ЛІЩИНИ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ», висунутої на здобуття наукового ступня доктора філософії зі спеціальності – 091 «Біологія», галузь знань 09 «Біологія»

Актуальність обраної теми та зв'язок з науковими програмами.

Рослини є основним джерелом калорій для харчування людини, забезпечуючи широкий спектр отримуваних корисних речовин. Ліщина європейська (*Corylus avellana* L.), фундук, вирощується на великому ареалі, у тому числі і на території України. Низка інших видів з роду *Corylus* поширені на значних територіях Голарктики і теж мають господарське значення. Хоча ліщину і не відносять до лідерів з аграрного виробництва, вона має важливе господарське значення, її горіхи мають стабільний попит на світовому ринку. Оскільки промислове виробництво культивованого виду не відбувається від вивчення генетики виду, то тема, яку обрав собі за дисертаційну А. Міщенко, є актуальною. По-перше, селекція виду, яку проводять лише з використанням засобів гібридизації та добору за ознаками морфології і продуктивності має свої істотні обмеження. По-друге, рослини відомі нам неймовірною різноманітністю репродуктивних стратегій, без вивчення яких не можна створювати різноманітність рослин з новими сполученнями ознак. А це є, зрештою, метою всякого селекційного процесу. З суто прагматичного боку, має бути і контроль над такою різноманітністю культивованих рослин, яку називають сортом, для доведення його автентичності. Для цього важливим є розробка нових молекулярних засобів для генотипування рослин ліщини та виявлення нових

поліморфізмів, придатних, як для диференціації сортів так і для філогенетичних досліджень у межах групи близьких видів з роду *Corylus*.

Автор дисертації виконав молекулярно-генетичний аналіз серед наявних генотипів ліщини: це порівняльний аналіз SSR- та iPBS-маркерів, встановлював їхню роздільну спроможність серед наявних генотипів рослин. У дисертації постулюється адитивність у використанні двох типів молекулярних маркерів- iPBS-маркери для диференціювання зразків і встановлення поліморфізмів, а мікросателітні локуси (SSR) мають слугувати для створення генетичних карт і проведення етапів MAS для цього виду рослин та, у практичній сфері, для паспортизації сортів ліщини. Робота А. Міщенка є першим досвідом з надання генетичної характеристики, в ній зроблено кроки до паспортизації сортів ліщини вітчизняної селекції.

Дисертаційне дослідження виконувалось згідно плану науково-дослідних робіт відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалося в рамках бюджетних тем відділу: «Генетичні і фізіолого-біохімічні механізми адаптації рослин до екстремальних умов довкілля» (номер держреєстрації 0120U105249, 2021-2025 рр.), «Геномна мінливість і особливості накопичення специфічних біологічно активних сполук у культурі тканин лікарських рослин» (номер держреєстрації 0125U002734, 2026-2030 рр.), а також при співвиконанні НДР «Теоретичні основи селекції фондука з використанням молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації видової приналежності вихідних матеріалів і отримуваних гібридів» (номер держреєстрації 0120U103133, 2026-2030 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їхня достовірність

Положення і висновки, наведені у дисертаційній роботі А.М. Міщенка обґрунтовано адекватністю використаного рослинного матеріалу і використаних у роботі сучасних методів молекулярної генетики та геноміки. План експериментального дослідження, поставлені завдання дають змогу вирішити поставлену мету роботи. Автором проведено велику роботу над удосконаленням

наявних методів виділення ДНК зі специфічних за хімічним складом рослин ліщини. Достовірність отриманих результатів забезпечується відтворюваністю результатів у ході виконання дослідження. Отримані у роботі експериментальні дані належними чином статистично опрацьовано. Висновки відображують основні результати дослідження та узагальнюють виявлені закономірності.

Наукова новизна положень, результатів і висновків дисертаційної роботи

Автором роботи оптимізовано методи виділення та очищення ДНК з ЦТАБ для отримання придатних для ПЛР препаратів ДНК зі зразків висушеного листа ліщини. Вперше охарактеризовано генетичне різноманіття 25 українських сортів фундука за допомогою 9 SSR-локусів та описано алелі за цими локусами для кожного сорту. Визначено інформативність використаних маркерів та мінімальний набір маркерів, достатній для диференціації генотипів. Визначено структуру використаних мікросателітних локусів у представників роду *Corylus*, встановлено зв'язок між молекулярною структурою та розміром алелів, виявлено видоспецифічні варіанти деяких мікросателітних локусів. Вперше застосовано iPBS-маркери для диференціації сортів фундука. Показано, що одного з відібраних iPBS-праймерів (2402) достатньо, щоб розрізнити всі 25 досліджених сорти. Вперше побудовано дендрограми генетичної подібності на основі SSR та iPBS-маркерів для сортів фундука української селекції.

Практичне значення отриманих результатів.

Автором сформовано алельні спектри за 9 відібраними SSR-локусами для 25 сортів фундука української селекції, вони можуть бути використані як основа для генетичної паспортизації та доведення ідентичності садивного матеріалу для цих сортів. Оптимізовано протокол виділення ДНК з сухого листа ліщини, це дає змогу відокремити в часі етап збору матеріалу та його подальшого молекулярно-генетичного аналізу. Умови мультиплексної ПЛР, розроблені для мікросателітного аналізу, дає змогу аналізувати 3 SSR-локуси одночасно з використанням праймерів, мічених одним барвником, що скорочує час і витрати матеріалів на проведення аналізу. Підібрано інформативні iPBS-праймери для

аналізу поліморфізму наявних зразків ліщини. Автором запропоновано набори маркерів (5 SSR-локусів або 1–2 iPBS-праймери), що на основі оцінки інформативності можуть бути запроваджені для ідентифікації сортів фундука в селекційних установах та розплідниках. Це забезпечить значне скорочення часових та матеріальних витрат на проведення аналізу.

У дисертаційному дослідженні проведено підбір та визначення інформативності двох типів ДНК-маркерів для молекулярно-генетичної ідентифікації та диференціації сортів фундука української селекції. Зокрема було використано мікросателітні або SSR-маркери, які широко застосовують в практиці для типізації культурних рослин, а також iPBS-маркери, створені на основі консервативних послідовностей ретротранспозонів, для яких раніше було показано високу ефективність для молекулярно-генетичного аналізу на багатьох видах рослин, але не ліщини.

Повнота викладу результатів дисертаційної роботи та наукових положень в наукових публікаціях за темою дисертації, апробація роботи

За матеріалами дисертації опубліковано 9 наукових праць, з них 3 статей у фахових наукових виданнях України та 2 статті у науковому періодичному виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази Web of Science, опубліковано 4 тези доповідей на наукових конференціях.

Основні положення та результати дисертаційної роботи було обговорено на засіданнях відділу генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ. Дослідження оприлюднено на таких міжнародних і всеукраїнських науково-практичних конференціях: XVIII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м. Київ, 26.09.2023); Конференції молодих вчених в рамках XVIII Міжнародної конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», присвяченої 50-річчю заснування Інституту молекулярної біології та генетики НАНУ (м. Київ, 26.09.2023); XVIII Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, 21–22.05.2024); IV Конференції молодих вчених «Біологія рослин і біотехнологія» (м. Київ,

18.05.2024); XIX Всеукраїнській конференції молодих вчених Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ, 20–21.05.2025); круглому столі «Актуальні проблеми молекулярної біології» в рамках заходів «Дні науки в НаУКМА». (м. Київ, 05.03.2025); круглому столі «Актуальні питання сучасної молекулярної біології» в рамках заходів «Дні науки в НаУКМА» (м. Київ, 04.03.2026).

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація побудована за такою схемою: вступ, огляд літератури, розділ матеріалів та методів досліджень, розділ з результатами та обговоренням результатів досліджень, окремий розділ з обговоренням результатів досліджень, висновки, список використаних джерел, є два додатки.

Список використаних джерел налічує 111 найменувань. Дисертацію викладено на 140 сторінках стандартного машинописного тексту, робота містить 12 рисунків, 12 таблиць. Більшість цитованих джерел оприлюднено за останні 5 років.

Відсутність чи наявність порушення академічної доброчесності

У роботі ми не виявили ознак академічного плагіату, фабрикивання, фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві зазначено особистий внесок дисертанта. Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи.

Загальна характеристика роботи

У огляді літератури автор дисертації коротко характеризує поширення ліщини у різних частинах світу, історію її культивування. Ця частина доволі лаконічна, але, що важливо містить тези, у яких автор наводить напрямки селекції для видів ліщин, коротко інформує читача про перспективу покращення рослин цього роду для потреби людини, як стосовно ознак продуктивності і якості горіхів, так і стійкості до хвороб і шкідників.

Підсумовуючи своє враження від прочитання підрозділу 1.1. можу сказати, що мені бракувало узагальненої інформації про особливості біології ліщини: виду з перехресним запиленням та з наявним геном самонесумісності. Ці дві особливості біології роблять внесок у формування структури популяцій ліщини у природі. Наступний підрозділ стосується опису низки молекулярних маркерів, які, як відомо, базуються як на феномені гібридизації, так виявляються через ПЛР. Цей розділ дає читачеві роботи необхідний рівень розуміння проблематики і можливість оцінювати перспективи використання тієї чи іншої техніки для різних завдань, від виявлення поліморфізмів для маркерів з домінантним спадкуванням і до використання кодомінантних маркерів для створення карт хромосом високої щільності. Окремий підрозділ цієї частини літературного огляду стосується опису технік з використанням послідовностей ретротранспозонів, зокрема і **iPBS** маркерів, які автор роботи вперше апробував для диференціації генотипів ліщини. Цей останній підрозділ написано найбільш деталізовано. Наостанок, у останньому підрозділі огляду літератури, А. Міщенко наводить приклади використання молекулярно-генетичних маркерів для досліджень з генетики і селекції у роді *Corylus*. Показано, що найбільше значення, наразі мають мікросателітні локуси, як для вивчення генетики ліщини, так і для потреб її селекції.

У розділі 2 дисертації автор наводить перелік сортів та видів, що їх аналізував, далі, з максимально можливою повнотою, описує методи, якими було отримано обговорювані у роботі результати. Протоколи відтворено точно. На думку опонента, ця частина роботи заслуговує на найвищу оцінку. А створених у ході виконання дисертації доволі простий протокол виділення ДНК з сухого листа ліщини дає змогу проводити і ретроспективний аналіз генетичної різноманітності ліщини з гербарного матеріалу.

У розділі 3 описуються результати та обговорення результатів, отримані у ході дослідження. Текст описано лаконічно, з необхідним рівнем деталізацію. Важливу інформацію зведено у таблиці. Результати сиквенування, отримані за результатами роботи депоновані у базах даних послідовностей.

Розділ 4 з узагальненням результатів є дуже доречним, у ньому коротко підсумовуються основні результати, їх автор порівнює з даними з літератури.

Далі є висновки та список використаних джерел.

Закінчуючи цю частину, маю зазначити, що огляд написаний доступною мовою, читається легко. Логіка автора чітка і зрозуміла.

Дослідження є самостійною роботою, яка базується на реальних даних і демонструє самостійність у аналізі отриманих даних. Текст дисертації містить малу кількість одруків.

Проте, у опонента у ході прочитання роботи виникла низка зауважень і запитань, на які автору дисертації варто зреагувати, дати відповіді або пояснити, що саме опонент не зрозумів у тексті дисертації.

У роботі є фрази, які важко зрозуміти, наприклад, с.33: «Верифікація сортності на основі фенотипового аналізу наразі є методологічно складною через явище епістазу, а також значну частку некодуючих послідовностей у структурі ДНК. Крім того, морфологічні маркери суттєво залежать від стадії розвитку особини та комплексу екологічних факторів, що знижує точність ідентифікації [2]», або с.35 «Оскільки такі сайти не асоційовані з конкретним типом генів і розподілені по всьому геному випадковим чином, розщеплення ДНК рестриктазами призводить до утворення набору фрагментів різної довжини [4,22]». Є така фраза, с.78: «Виключення становили локуси GB949 та BR270, для яких виявлено більшу кількість алелів порівняно з даними американських дослідників [91], що може вказувати на більшу гетерогенність вибірки за цими ознаками». Тут, як я розумію, ідеться про поліморфізм, а не про гетерогенність.

У роботі пункти посилань на цитовані джерела літератури №№ 14,16,83 неповні.

У дисертації я не знайшов інформації про кількість рослин ліщини певного виду, чи сорту, що слугували джерелом листя, з якого виділяли ДНК. Якщо аналізовані перехреснозапильні рослини є полігетерозиготою, то зразки для виділення ДНК мають братися з багатьох рослин популяції. Якщо ж рослини сорту є результатами котроїсь з форм вегетативного розмноження, то так слід і написати у роботі. Тут слід мати ясність.

Автор слушно пише, що більшість використаних у роботі мікросателітних локусів є тринуклеотидними повторам. Така кількість нуклеотидів у мотиві не є звичною для мікросателітних локусів у більшості з видів росли, які мені приходять на пам'ять. Чи має дисертант вичерпні відомості, що дані локуси розташовані у міжгенних районах, чи вони можуть бути складовими генів? Якщо повтори генні, тоді, очевидно, вони матимуть інший рівень темпів молекулярної еволюції, ніж локуси з міжгенних районів.

На думку автора, чи мають маркери на основі *iPBS* ділянок ретротранспозонів належний рівень стабільності у прояві поліморфізму. Для інших маркерів, створених на основі ретротранспозонів (IRAP та REMAP) показано зміну спектрів у залежності від мікрогеографічних умов. Чи не варто, у майбутньому, вивчити спектри з одного генотипу у різних локаціях?

У роботі наводяться літературні дані з результатами міжвидових схрещувань у роді *Corylus*. Цікаво дізнатися, чи є у інших видів ліщини гени автофертильності, чи всі види мають гени саможерильності, подібні до тих, що їх має вид *avellana*. Зрозуміло, це вноситиме певні зміни у формування нащадків від таких схрещувань.

Вказані запитання і зауваження **не применшують значення** роботи як дослідження зі скринінгу сортів ліщини української селекції. Робота А.М. Міщенко є першою в Україні, яка виконана за такою схемою, її значення більше, ніж просто потреби паспортизації сортів фундука.

Опонент вважає, що без розробки нових молекулярних маркерів, вивчення наявних поліморфізмів серед аналізованого рослинного матеріалу, сиквенування шуканих локусів, та, зрештою, без створення карт зчеплення високої щільності нема поступу у розвитку спеціальної генетики виду рослини. Робота Андрія Миколайовича Міщенко є важливим кроком у молекулярно-генетичному дослідженні генотипів ліщини, вона має певні перспективи для продовження.

Дисертаційна робота Міщенко А. М. «Розробка і використання ДНК-маркерів для ідентифікації сортів ліщини української селекції». є завершеним науковим дослідженням з актуального напрямку молекулярної генетики та геноміки рослин. Робота містить оригінальні результати, що мають як теоретичне так і практичне значення. Дисертацію присвячено розробці і використанню низки молекулярних маркерів, придатних для диференціації генотипів (сортів) ліщини (*Corylus avellana* L.). Робота відповідає «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 від 12 січня 2022 року № 44, та Вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12.01.2017 року № 40, які висуваються до дисертаційних робіт на здобуття ступеня доктора філософії. За своєю актуальністю, новизною отриманих результатів, обсягом виконаних досліджень, за повнотою оприлюднення результатів дослідження у науковій періодиці робота Міщенко А.М. відповідає вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії, зі спеціальності 091 «біологія».

Офіційний опонент :

Завідувач кафедри біології

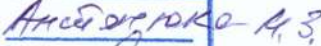
Національного університету «Києво-

Могилянська академія», доктор біологічних

наук, с.н.с.

 Антонюк М.З.



Особистий підпис  А.З.
ЗАСВІДЧУЮ
Підпис