

Голові спеціалізованої вченої ради при
Інституті молекулярної біології і
генетики НАН України
академіку НАН України, доктору біологічних
наук, професору, заступнику директора з
наукової роботи та інноваційної діяльності
Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України
Валерію ФІЛОНЕНКО

ВІДГУК

офіційного опонента, члена-кореспондента НАН України, доктора
біологічних наук, старшого дослідника, заступника директора з наукової
роботи Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Богдана МОРГУНА

на дисертацію Міщенка Андрія Миколайовича на тему «Розробка і
використання ДНК-маркерів для ідентифікації сортів ліщини української
селекції» подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 091 – «Біологія»

1. Актуальність обраної теми

Дисертаційна робота Андрія МІЩЕНКА є актуальною, оскільки культурна ліщина європейська (*Corylus avellana* L.), або фундук, є однією з найбільш економічно перспективних горіхоплідних культур у сучасному промисловому садівництві. Завдяки державним грантовим програмам підтримки садівництва, на фундук сьогодні припадає близько 95% усіх нових горіхових насаджень у країні. Загальний щорічний валовий збір в Україні наразі оцінюється в межах 2000–4000 тонн горіхів у шкаралупі. Проте галузь демонструє стрімке зростання. Згідно з профільними оцінками на наступні 5 років, площі під культурою досягнуть 8 000 га, а щорічний валовий збір зросте до 14–15 тисяч тонн у шкаралупі. Поточний річний попит в Україні значно перевищує наявний валовий збір, а споживання демонструє стабільне зростання. Попри активний розвиток вітчизняних садів, Україна поки що залишається імпортозалежною і завозить горіхи з Туреччини, Грузії та Італії.

Розвиток молодих українських садів передбачає задоволення внутрішнього попиту і перспективу експорту.

Ефективне закладання та ведення промислових плантацій критично залежить від жорсткого контролю сортового складу садивного матеріалу. Традиційні морфологічні методи ідентифікації за дескрипторами UPOV мають обмежену надійність через високу фенотипову мінливість ознак рослин під впливом умов середовища та вікових змін. Тому впровадження ДНК-маркерів (зокрема на основі мікросателітних локусів і ретротранспозонів) є передовим світовим стандартом вирішення цієї проблеми. Проте до початку цього дослідження комплексна генетична паспортизація сортів фундука саме вітчизняної селекції в Україні не проводилася, що і обумовлює високу актуальність, теоретичну та практичну значущість представленої дисертаційної роботи.

2. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота Андрія МІЩЕНКА є органічною частиною експериментальних досліджень, які виконуються у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України протягом 2023–2026 рр. у рамках планових досліджень за бюджетних тем: «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 фундука з використанням молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації видової приналежності вихідних матеріалів і отримуваних гібридів» (номер держреєстрації 0120U103133, 2020-2022 рр.).

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації

Основні положення, висновки та практичні рекомендації дисертації Андрія МІЩЕНКА витікають із отриманих ним результатів експериментальних досліджень і є добре обґрунтованими. Вони опрацьовані різними методами

статистичного аналізу та знайшли достатнє відображення у п'яти статтях, які опубліковані у провідних наукових журналах (Cytology and Genetics, Biopolymers and Cell, Фактори експериментальної еволюції організмів, Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів) та доповідалися на декількох наукових конференціях.

4. Достовірність основних наукових положень, висновків і практичних досліджень та одержаних результатів

Достовірність основних наукових положень, висновків, практичних рекомендацій та одержаних результатів не викликає сумнівів, оскільки проведений Андрієм МІЩЕНКО статистичний аналіз включав також кількісну й обґрунтовану оцінку інформативності маркерів у поєднанні з кластерним аналізом та дослідженням молекулярної структури SSR. Основні наукові положення та висновки, як і практичні рекомендації, були зроблені на основі статистично достовірних результатів. Добре опрацьована кількісна оцінка інформативності маркерів де використано не один показник поліморфізму, а комплекс характеристик — PIC, Rp, DL, ND, He та ін. (таблиця 3.7). Для iPBS, наприклад, наведено повний комплекс відповідних показників для шести праймерів. Це дозволяє зробити порівняння маркерів не лише якісно, а й кількісно. Експериментальна частина не є набором розрізнених дослідів, а формує єдину елегантну систему дослідження. Тут вдалося вдало поєднати фундаментальні основи і прикладні результати. З одного боку, показано генетичне різноманіття та молекулярна структура генотипів, а з іншого — пропонуються конкретні маркерні системи для практичної ідентифікації рослин. Це робить наукову працю більш цінною, ніж суто описове дослідження поліморфізму.

5. Новизна основних наукових положень, висновків і практичних рекомендацій, а також проведених наукових досліджень та одержаних результатів

Наукова новизна наукових досліджень Андрія МІЩЕНКА й одержаних ним результатів, а також основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій полягає в:

- оптимізації ізолювання ДНК з гербарного листа ліщини, що містить високу концентрацію вторинних метаболітів, модифікованим ЦТАБ-методом;
- генетичному картуванні вітчизняного фонду з 25 українських сортів фундука за допомогою 9 SSR-локусів і сформуванні індивідуальних еталонних алельних профілів для кожного з них;
- філогенетичному та структурному аналізу мікросателітних локусів у п'яти видів роду *Corylus*;
- інноваційному застосуванні iPBS-маркерів для диференціації сортів фундука і виявленні унікального праймера 2402, здатного самотійно розрізнити всі 25 досліджуваних генотипів;
- побудові дендрограм генетичної подібності українських сортів, що дозволило розмежувати споріднені групи різного селекційного походження.

6. *Практичне значення одержаних результатів*

Практичне значення одержаних Андрієм МІЩЕНКО результатів має пряме прикладне впровадження в аграрний та селекційний сектори і полягає у:

- складеній базі мікросателітних профілів 25 сортів, що є готовим інструментом для генетичної паспортизації, сертифікації садивного матеріалу та захисту авторських прав селекціонерів;
- розробленому протоколі мультиплексної ПЛР (одночасний аналіз трьох SSR-локусів з одним флуоресцентним барвником), що знижує собівартість та час проведення рутинного аналізу;
- запропонованій альтернативній маркерній системі iPBS, що дозволяє проводити надійну сортову верифікацію навіть в умовах регіональних лабораторій з базовим інструментальним оснащенням.

7. *Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях*

Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації у повній мірі відображені у п'яти наукових статтях, опублікованих Андрієм МІЩЕНКО у провідних профільних періодичних наукових виданнях, затверджених Міністерством освіти і науки України, в яких можуть публікуватися результати

дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів; і у чотирьох тезах доповідей, зроблених на престижних наукових конференціях.

8. Структура дисертації

Дисертація викладена на 147 сторінках друкованого тексту і містить 12 рисунків, 13 таблиць та 3 додатки. Вона має всі необхідні для дисертаційної роботи розділи – анотацію, вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати експериментальних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновки і список використаних джерел літератури. У вступі досить чітко відображена актуальність обраної теми досліджень, мета і завдання досліджень, методи досліджень, наукова новизна отриманих результатів і їх практичне значення, особистий внесок здобувача, а також зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами, апробація отриманих результатів та публікації по темі виконаної дисертаційної роботи.

В огляді літератури детально проаналізовані сучасні наукові досягнення за темою дисертації на основі 112 джерел, у тому числі й успіхи у створенні й застосуванні ДНК-маркерів для ідентифікації різних сортів рослин. Крім того, обґрунтована актуальність теми та необхідність проведення подальших досліджень. У розділі «Результати досліджень» представлені результати власних дослідження. Варто відзначити, що отримані результати обговоренні, ретельно проаналізовані й узагальнені у вигляді наглядних діаграм. Висновки сформульовані чітко. Вони є конкретними і повністю віддзеркалюють основні результати всіх основних досліджень.

9. Недоліки дисертації щодо їх змісту та оформлення

Дисертаційна робота Андрія МІЩЕНКА містить всю необхідну для дисертації інформацію, написана й оформлена дуже добре. Вона вичитана і не містить критичних помилок, хоча і не завадило б краще ілюструвати огляд літератури рисунками, діаграмами чи таблицями.

Водночас окремі положення практичного характеру й оцінки потенційної дискримінаційної спроможності маркерних систем мають дещо ширший характер, ніж безпосередня експериментальна база дослідження. Зокрема, твердження щодо потенційної диференціації до 1000 зразків має розглядатися

як теоретична оцінка, оскільки експериментальна перевірка проведена на 25 українських сортах. Аналогічно, можливість використання розроблених маркерних систем для сертифікації й охорони прав на сорти доцільно розглядати як перспективний напрям практичного застосування, що потребує подальшої валідації на розширеній вибірці та стандартизації процедур. Додаткові набори зразків фундука можна було б спробувати залучити з ТОВ «Агропром-Закарпаття», ТОВ «Хмельницька універсальна компанія», ТОВ «Хейзелстар», ТОВ «Світанок Старі Маяки» чи Приватного орендного племінного підприємства «Еліта», які безпосередньо працюють з цим горіхом.

По роботі виникають питань дискусійного характеру:

1. У роботі зазначено, що метод iPBS-аналізу характеризується нижчою міжлабораторною відтворюваністю результатів порівняно з SSR-маркерами. Які конкретні технічні параметри проведення ПЛР (наприклад, концентрація магнію, профіль температур чи якість ферментів) є найбільш критичними для отримання ідентичних iPBS-профілів в умовах різних лабораторій?

2. Чим, на Вашу думку, зумовлені суттєві відмінності в архітектурі дендрограм генетичної подібності сортів, отриманих на основі кодомінантних SSR-маркерів та домінантних iPBS-маркерів? Чи відображає структура iPBS-дендрограми реальні родовідні зв'язки українських сортів, чи вона більшою мірою вказує на особливості еволюційної динаміки ретротранспозонів у геномі ліщини?

3. Ви запропонували протокол мультиплексної ПЛР, який дозволяє одночасно аналізувати три SSR-локуси за допомогою праймерів, мічених лише одним флуоресцентним барвником. Яким чином вдалося уникнути перекриття сигналів від різних локусів під час капілярного фрагментного аналізу і наскільки така оптимізація знижує собівартість паспортизації одного сорту?

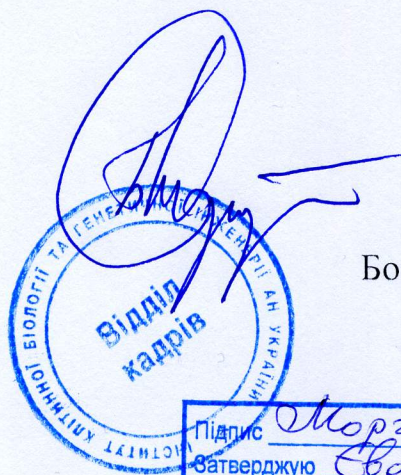
4. Вами оптимізовано метод виділення ДНК із висушеного (гербарного) листа ліщини з попередньою високосольовою відмивкою. Протягом якого максимального терміну зберігання сухого листа виділена ДНК залишається придатною для фрагментного аналізу SSR-локусів і чи впливає тривале зберігання сировини на появу артефактних смуг при iPBS-ампліфікації?

5. Чи вбачаєте Ви можливість розширення створеної Вами маркерної системи? Для селекційної практики значний інтерес становило б поєднання маркерів сортової паспортизації з маркерами, асоційованими з господарсько цінними ознаками фундука (урожайністю, якістю ядра, стійкістю до хвороб та ін.). Така маркерна система була б особливо цінною для комплексного супроводу селекційного процесу.

Висновок

Дисертаційна робота МІЩЕНКА Андрія Миколайовича «Розробка і використання ДНК-маркерів для ідентифікації сортів ліщини української селекції» є завершеною кваліфікаційною науковою працею, яка за своєю актуальністю, науково-теоретичним рівнем, науковою новизною, обсягом виконаних досліджень і практичним значенням відповідає всім вимогам Постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 р., № 44, а здобувач заслуговує на присудження йому ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія».

Член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук,
старший дослідник,
заступник директора з наукової роботи
Інституту клітинної біології та
генетичної інженерії НАН України



Богдан МОРГУН

Підпис	Моргун Б.В.
Затверджую	Скочко І.В.
Відділ кадрів	