

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Міщенка Андрія Миколайовича «Розробка і використання ДНК-маркерів для ідентифікації сортів ліщини української селекції», подану до захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційної роботи. Ліщина є важливою горіхоплідною культурою, що широко застосовується в кондитерській промисловості. Дослідження сортів ліщини за допомогою молекулярних маркерів активно проводяться у світі, в першу чергу, в країнах де вона промислово культивується. Такі дослідження є важливими для паспортизації сортів, захисту прав селекціонерів, а пошук маркерів, пов'язаних з проявом господарчо-цінних ознак сприяє підвищенню ефективності селекції. В Україні проводиться селекція ліщини і створено низку сортів, однак аналіз їх різноманітності за молекулярними маркерами досі не проводився. Тому дисертаційна робота Міщенка Андрія Миколайовича, присвячена розробці та використанню ДНК-маркерів для ідентифікації сортів ліщини української селекції є, безумовно, актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами. Дослідження проведено в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України в рамках 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.), та НДР «Теоретичні основи селекції фундука з використанням молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації видової приналежності вихідних матеріалів і отримуваних гібридів» (номер держреєстрації 0120U103133, 2026-2030 рр.).

Наукова новизна одержаних результатів.

Оптимізовано методику виділення та очищення ДНК з ЦТАБ для отримання придатних для ПЛР препаратів ДНК зі зразків висушеного листа ліщини. Вперше охарактеризовано генетичне різноманіття українських сортів фундука за допомогою 9 SSR-локусів та складено алельні профілі для кожного сорту. Визначено інформативність використаних маркерів та мінімальний набір маркерів, достатній для диференціації генотипів у вибірках до 1000 зразків. 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 та оцінено показники їх інформативності. Показано, що одного з відібраних iPBS-праймерів (2402) достатньо, щоб розрізнити 25 досліджених сортів. Вперше побудовано дендрограми генетичної подібності на основі SSR та iPBS-маркерів для сортів фундука української селекції і продемонстровано їх значну генетичну різноманітність.

Практичне значення досліджень Визначені алельні профілі сортів ліщини української селекції за 9 SSR-локусами можуть бути використані для генетичної паспортизації та верифікації садивного матеріалу цих сортів. Розроблено оригінальний підхід до аналізу зразків ліщини, який включає збір молодого листа, його висушування та оптимізований протокол виділення ДНК з сухого листа ліщини. Підібрано умови мультиплексної ПЛР з мікросателітними праймерами, що дозволяють аналізувати три SSR-локуси одночасно з використанням праймерів, мічених одним барвником, що дозволяє скоротити час і витрати матеріалів на проведення аналізу. Підібрано інформативні iPBS-праймери для рутинного генетичного аналізу зразків ліщини. Запропоновані на основі оцінки інформативності набори маркерів (5 SSR-локусів або 1–2 iPBS-праймери) можуть бути безпосередньо впроваджені в практику ідентифікації сортів ліщини в селекційних господарствах та розплідниках.

Ступінь обґрунтованості і достовірності наукових положень і висновків, аналіз структури та змісту дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 147 сторінках, вона містить 12 рисунків, 12 таблиць та 3 додатки. Робота складається зі вступу, розділів «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати експериментальних досліджень», «Узагальнення результатів дослідження», висновків, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел налічує 112 найменувань.

У **Вступі** обґрунтовано актуальність теми і наведено загальну характеристику роботи.

У **розділі 1 «Огляд літератури»** на основі аналізу літературних джерел узагальнено інформацію про напрямки селекції ліщини в світі та в Україні, ДНК-маркери в молекулярно-генетичному аналізі, застосування молекулярних маркерів в селекції фундука, зокрема SSR-маркерів.

У **розділі 2. «Матеріали та методи досліджень»** наведено перелік зразків ліщини, які було досліджено, описано методики виділення ДНК, ПЛР-аналізу, клонування фрагментів ДНК і їх секвенування, біоінформатичного аналізу та аналізу даних, зокрема, показників інформативності маркерів.

Розділ 3. «Результати експериментальних досліджень» містить 4 підрозділи, у яких висвітлено результати досліджень та їх обговорення.

У **підрозділі 3.1** наведено результати досліджень з оптимізації методики виділення ДНК з листа ліщини. Запропоновано проводити виділення ДНК з висушеного молодого листа ліщини та розроблено власну модифікацію методики виділення ДНК високої якості для молекулярно-генетичних досліджень.

У **підрозділі 3.2** наведено результати аналізу зразків ліщини за допомогою мікросателітних маркерів. Відібрано 9 найбільш ефективних мікросателітних маркерів. Для підвищення ефективності аналізу запропоновано проводити мультиплексні ПЛР з 3 підібраними парами праймерів. Визначено генотипи за 9 SSR локусами для колекції зразків ліщини, зокрема для сортів української селекції, та проаналізовано частоти алелів. Проведено аналіз інформативності 9 SSR-маркерів за низкою

показників та підібрано ефективні комбінації локусів, достатніх для диференціації сортів. Клоновано та секвеновано алелі 4 мікросателітних локусів, їх послідовності задепоновано в базі даних NCBI. Проведено біоінформатичний аналіз щодо структури 9 мікросателітних локусів на основі послідовностей в базі NCBI та власних секвенсів. Результати аналізу також наведено в додатку Б. Дослідження деяких локусів показало, що амплікони однакової довжини – продукти одного локусу можуть відрізнятись за нуклеотидною послідовністю.

У підрозділі 3.3 описано результати аналізу поліморфізму iPBS-маркерів для зразків ліщини. Такий аналіз для ліщини було проведено вперше. Підібрано високоінформативні маркери, що дозволили відрізнити всі проаналізовані зразки. Запропоновано комбінації маркерів для диференціації великої кількості зразків. Показано вищу інформативність iPBS-маркерів порівняно з мікросателітними. Запропоновано iPBS-маркери як відносно недорогий і простий метод для диференціації сортів ліщини.

У підрозділі 3.4 наведено результати кластерного аналізу досліджених сортів методом UPGMA на основі генотипів за SSR локусами та за iPBS-спектрами. Одержані дендрограми дозволили зробити висновок про високий рівень генетичної різноманітності українських сортів ліщини. Цікавим результатом є уточнення видової приналежності зразка, який розглядався як *C. chinensis*. Результати кластерного аналізу вказують на те, що це зразок *C. avellana* або ж міжвидовий гібрид.

У розділі 4. викладено узагальнення результатів дослідження.

Структура роботи є логічною і продуманою. Висновки відповідають поставленим завданням. Наукові положення і висновки є обґрунтованими.

Висвітлення результатів у наукових публікаціях. Матеріали дисертаційної роботи достатньо повно висвітлено у наукових працях: опубліковано 9 наукових праць, з них 5 наукових статей і 4 тези доповідей на наукових конференціях

Академічна доброчесність. Дисертація та наукові публікації, у яких висвітлені основні наукові результати дисертаційної роботи, не мають ознак академічного плагіату.

Зауваження щодо змісту і оформлення.

Не завжди написано курсивом назви роду і виду (ст. 20, 23, весь список літератури).

Замість терміну «внутривидовий» (ст. 33) краще було використати «внутрішньовидовий». Замість «спостережувана (Ho) гетерозиготність», можливо, краще було використати термін «фактична гетерозиготність»

ст. 52 (табл. 2.1). Вираз «культурні сорти фундука» є недоречним, достатньо «сорти фундука».

У посиланні [50] пропущено частину назви статті (Hazelnut ‘Jefferson’ Transcriptome).

У реченні «Для SSR-аналізу використовували дев'ять пар мікросателітних праймерів, описаних у роботі Akin et al. (2016). треба було дати посилання [92]. У реченні Для iPBS-аналізу застосовували праймери, розроблені на основі

консервативних послідовностей сайтів зв'язування tРНК Kalendar et al., 2010.» треба було дати посилання [7].

У табл. 2.1 треба було вказати походження зразків (установу, де було створено сорт).

У таблиці 2.2 є колонка «Група зчеплення **». У примітці треба було пояснити, що означають дві зірочки.

Наприкінці огляду доречною була б фраза, що українські сорти ліщини досі не вивчалися за молекулярними маркерами.

Не вказано, яка концентрація iPBS праймера була в реакційній суміші

Про яку оцінку рівноваги Харді-Вайнберга йдеться, коли досліджували не популяцію великого розміру з вільним схрещуванням, а обмежену кількість колекційних генотипів різного походження (19 українських і 6 іноземних)?

Як можна пояснити, що сорти Пиріжок, Софіївський 1, Софіївський 15, Софіївський 2, Дар Павленка, Корончатий, Шедевр в дисертації описано як ліщина європейська або звичайна *Corylus avellana* L., а їх було зареєстровано (внесено в Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні) як сорти *Corylus maxima* Mill. (ліщина велика)?

Наведені зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку дисертації, не знижують її актуальності, наукової новизни і практичного значення роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертація Міщенко А.М. є закінченою науковою працею. Проведені дослідження з розробки і застосування молекулярних маркерів сприятимуть дослідженню генофонду ліщини, паспортизації сортів та підвищенню ефективності селекції.

Вважаю, що дисертаційна робота Міщенко А.М. «Розробка і використання ДНК-маркерів для ідентифікації сортів ліщини української селекції», представлена на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія», є закінченим науковим дослідженням та повністю відповідає 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» прийнятій 12.01.2022р №44, та постанов Кабінету Міністрів України №502 від 19.05.2023 та №507 від 03.05.2024, містить нові науково обґрунтовані експериментальні результати проведених здобувачем досліджень, має наукову новизну і практичну цінність, а її автор Андрій Миколайович Міщенко заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент
завідувач лабораторії екологічної
генетики рослин і біотехнології
Інституту захисту рослин НААН
доктор біологічних наук



Н.О. Козуб

Н.О. Козуб