

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Облапа Руслана Васильовича «Методологія молекулярно-генетично го оцінювання сільськогосподарської продукції» представлену на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика.

Актуальність теми.

На сьогоднішній день успішний процес інтеграції України у світове економічне співробітництво неможливий без координації зусиль із забезпечення виробництва якісної харчової продукції та сировини для неї. Ріст рівня забруднення навколишнього середовища, запровадження нових технологій виробництва харчової продукції з застосуванням генної інженерії та біотехнології, глобалізація сучасного виробництва потребує жорстких вимог до безпеки та якості харчових продуктів. Ця проблема має комплексний характер і потребує численних зусиль, як з боку вчених, виробників, санітарно-епідеміологічних служб, державних органів, так і споживачів. Актуальність даної проблеми зростає з кожним роком, оскільки безпека харчової продукції безпосередньо впливає не тільки на здоров'я людей, але і на збереження генофонду людства в цілому. Основним елементом контролю безпеки та якості харчової продукції є її оцінка різними методами випробувань (органолептичними, фізико-хімічними, мікробіологічними, токсикологічними). Одним із сучасних інструментальних підходів - є застосування методів, які базуються на ПЛР, а саме: клонування генів, введення мутацій, секвенування, створення і визначення ГМО, діагностиці захворювань (спадкових, інфекційних), ідентифікації малих кількостей ДНК, встановлення батьківства. Моніторинг і контроль безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції неможливий без застосування цих аналітичних методів аналізу.

З огляду на це, дисертаційна робота, присвячена розробці методології використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів та методів їх аналізу

для оцінювання показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини тваринного і рослинного походження, є актуальною і своєчасною.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у розробленні теоретико-концептуальних засад та впровадженню у виробництво комплексної методології застосування молекулярно-генетичних маркерів та методів генетичного аналізу для оцінювання безпечності та якості сільськогосподарської продукції.

Автором встановлено зв'язок різних генотипів і комплексів генотипів QTL (CSNK, BLG, PRL) з продуктивністю (масова частка жиру і білка в молоці) та технологічними властивостями (сиропритатністю) молока. Експериментально доведено можливість ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* у готовій молочній продукції під час контролю складу молочної мікрофлори та створенні нових заквасок, пробіотиків і пробіотичних продуктів за допомогою технології SYBR®Green методу ПЛР-РЧ. Встановлено найбільш інформативні молекулярно-генетичні маркери видової ідентифікації м'яса тварин, що локалізовані в межах мітохондріальних генів цитохрому b (cytb) курей і свиней та сателітної IV ДНК (1.709 satellite IV DNA family) ВРХ. Оцінено інформативність різних типів молекулярно-генетичних маркерів, що використовуються під час виявлення генно-інженерних конструктів біотехнологічних рослин та розроблено методологію з визначення ГМО з врахуванням типу сільськогосподарських культур, що вирощуються в Україні. Проведено аналіз з виявлення та ідентифікації у сільськогосподарській сировині і харчовій продукції глютену, який асоційований з виникненням целиакії у людей. Визначено та запропоновано до використання молекулярно-генетичні маркери (hly, invA, ipaH), які уможливають ідентифікацію збудників лістеріозу, сальмонельозу та шигельозу в сільськогосподарській сировині, кормах для тварин та харчовій продукції.

Практичне значення роботи. У роботі запропоновано концептуальний підхід з оптимізації техніки визначення збудника лейкозу великої рогатої худоби у коров'ячому молоці за допомогою технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ та

доведено можливість її застосування як у комплексі протилейкозних заходів у господарствах, так і безпосередньо під час контролю безпечності продукції. Розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему «М'ясо-тест» на основі технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ, яка уможливорює одночасну ідентифікацію трьох різних ДНК-мішеней, та дає змогу визначати видову належність м'яса курятини, свинини та яловичини у тваринній сировині, кормах для тварин та готовій до споживання харчовій продукції. За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи на виробництво тест-систем «ГМО скринінг», «ГМО кількість», «ГМО ідентифікація» отримано ТУ У 24.6-02568182-001:2011, ТУ У 20.1-40719638-001:2019 та патент на корисну модель. Розроблена серія тест-систем використовується у акредитованих за ДСТУ ISO/IEC 17025 випробувальних лабораторіях України різних систем підпорядкування. Упродовж 2007–2017 рр. за використання розроблених тест-систем здійснено контроль за обігом ГМО в країні шляхом перевірки сільськогосподарської сировини та харчової продукції. Розроблено методичку (МВИ 17/59-12) з визначення глютену злакових культур за допомогою ПЛР-РЧ (тест-системи «Глютен-скринінг»), на основі технології TaqMan® методу ПЛР-РЧ для здійснення контролю харчової продукції на вміст глютену.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, є достатнім, що демонструється сукупністю експериментального матеріалу, обґрунтованим теоретичним обговоренням власних і літературних даних. Якість досліджень, викладених у дисертації, підтверджується ретельно розробленою методикою, сучасними методами, застосованими для отримання експериментальних даних, репрезентативністю вибірок, грамотним статистичним аналізом. Логіка викладення матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертації.

Структура дисертації побудована відповідно до чинних вимог і представлена анотаціями українською та англійською мовами, змістом, переліком умовних позначень, вступом, чотирма розділами, які включають огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних експериментальних

досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення отриманих результатів; висновків, пропозицій виробництву, списком використаних джерел та 17 додатками. Обсяг роботи – 410 сторінок комп'ютерного тексту до списку літературних джерел, вона містить 113 таблиць та 83 рисунки. Список використаних літературних джерел включає 716 джерел (362 латиницею).

Повнота викладу в опублікованих працях. Фактичний матеріал дисертаційної роботи та висновки за результатами досліджень апробовано на сторінках наукових видань, доповідались на численних вітчизняних та міжнародних наукових конференціях. Вважаю, що основні положення дисертаційної достатньою мірою викладено у 73 наукових працях, серед яких 2 монографії, 20 статей у фахових виданнях України, у виданнях іноземних держав або у виданнях, які включено до міжнародних наукометричних баз – 8, 34 наукових працях апробаційного характеру у збірниках наукових конференцій, з'їздів та симпозіумів, 8 методичних рекомендаціях, 1 патенті України на корисну модель.

До найбільш вагомих здобутків дисертаційної роботи варто віднести такі:

Встановлено асоціативні зв'язки між генотипами та комплексами генотипами досліджених QTL (*CSNK*, *BLG*, та *PRL*) тварин з параметрами молочної продуктивності (масова частка жиру та білка) та технологічними властивостями молока (сиропродатність). Застосування розробленої технології *TaqMan*® методу ПЛР у реальному часі для ідентифікації збудника лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ, *BLV*) у молоці корів, яка базується на аналізі консервативної ділянки гена *Env*, що кодує поверхневий вірусний глікопротеїд *gp51*, уможлиблює високоточну діагностику поголів'я на захворюваність лейкозом. За використання молекулярно-генетичних маркерів ділянок генів *16S* рРНК та фактору елонгації *Tu* для якісної та кількісної ідентифікації бактерій родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* та *Enterococcus* розроблено метод визначення корисної мікрофлори у складі молочної продукції на основі технології *SYBR*®*Green* методу ПЛР-РЧ та доведено можливість ідентифікації групи молочнокислих бактерій та біфідобактерій у готовій молочній продукції під час

контролю складу молочної мікрофлори, а також створення нових заквасок, пробіотиків та пробіотичних продуктів. Розроблено мультиплексну ПЛР-РЧ тест-систему «М'ясо-тест» для одночасної детекції трьох видів м'яса – курятини, свинини та яловичини, що дає змогу виявляти фальсифікацію видової належності м'яса у складі сільськогосподарської сировини та харчової продукції. Підібрано видо- та родоспецифічні молекулярно-генетичні маркери для ідентифікації зоонозних харчових бактеріальних патогенів – *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* та *Shigella spp.*, що дало змогу розробки серії мультиплексних ПЛР-РЧ тест-систем «*L. Monocytogenes*-ідентифікація», «*Salmonella spp.*-ідентифікація», «*Shigella spp.*-ідентифікація». Доведено доцільність використання видоспецифічних молекулярно-генетичних маркерів зернових (ω-гліадини пшениці та жита, *B1 hordein* ячменю, *avenin* вівса) та технології *TaqMan*® методу ПЛР у реальному часі, що уможливорює ідентифікацію у складі сільськогосподарської сировини і готової до споживання харчової продукції глютену. Проведено моніторинг існуючих в Україні ліній біотехнологічних сільськогосподарських культур (ГМО, ГМР) і розроблено методологію якісного та кількісного аналізу сільськогосподарської сировини, кормів для тварин та харчової продукції на вміст елементів генно-інженерних конструкцій. Встановлено особливості поліморфізму структурних елементів генно-інженерних конструкцій, використаних для розроблення генетично модифікованих рослин, і підібрано молекулярно-генетичні маркери для їх ідентифікації. Розроблено і впроваджено у виробництво 51 діагностичну тест-систему для ідентифікації, якісного та кількісного визначення ГМО за допомогою технології *TaqMan*® методу ПЛР у реальному часі.

Загалом позитивно оцінюючи дисертаційну роботу **Облапа Р.В.**, слід вказати і на окремі недоліки, висловити зауваження та побажання:

Перелік умовних скорочень

1. Доцільно було б розширити перелік умовних скорочень оскільки вони наведені в дисертаційній роботі: BLAD - bovine leukocyte adhesion deficiency / Бичачий дефіцит адгезії лімфоцитів, DUMPS - deficiency of uridin monophosphate

synthase - дефіцит урідин монофосфат синтетази, FAO - food and agriculture organization - харчова та сільськогосподарська організація, НКЗ - негативний контрольний зразок, ПКЗ - позитивний контрольний зразок.

Вступ

2. У розділі є посилання на праці, які не мають відношення безпосередньо до теми роботи. Для цього є розділ огляду літератури. На мій погляд, у цьому розділі мають згадуватись найбільш знані дослідники за темою дисертаційної роботи.

Огляд літератури

3. У розділі детально представлена інформація щодо основних підходів з визначення показників безпечності та якості сільськогосподарської сировини і харчової продукції, основних типах молекулярно-генетичних маркерів, що використовуються у дослідженнях генетичної мінливості тварин, рослин і мікроорганізмів, сучасних молекулярно-генетичних методах досліджень. Суттєвих зауважень до розділу немає.

Матеріал і методи досліджень

4. У розділі деталізовані етапи проведення досліджень. Деякі з них, зокрема методи екстракції ДНК та отримання генно-інженерних позитивних контрольних зразків можна було б і не описувати. Загалом розділ представлено кваліфіковано, і не виникає сумніву в тому, що дослідження дисертантом виконано власноруч.

Результати експериментальних досліджень та їх обговорення

5. У загальній схемі досліджень відсутня інформація щодо чисельності дослідного матеріалу (поголів'я тварин, штамів мікроорганізмів, зразків сільськогосподарської сировини) на якому проводилися дослідження.

6. З тексту дисертаційної роботи не зовсім зрозуміло чому для оцінки якості продукції тваринництва було обрано саме гени к-казеїну, β -лактоглобуліну та пролактину, і на скільки повно вони характеризують потенціал молочної продуктивності досліджених популяцій ВРХ?

7. В розділі 3.1.1 зустрічаються дані інформативного характеру які, на мою думку, більше належать до розділу огляду літератури.

8. У дисертаційній роботі автор переважно застосовує такі сучасні методи молекулярно-генетичних досліджень як технологію SYBR[®]Green і TaqMan[®] методу ПЛР у реальному часі. У зв'язку з цим виникає питання: чому дослідження поліморфізму генів кількісних ознак проводилось менш сучасним методом ПЛР-ПДРФ-аналізу? Чи не доцільно було б розробити систему визначення алельних варіантів обраних QTL методом дискримінації алелів ПЛР-РЧ?

9. Як відомо, під час циркуляції вірусам властиво змінюватися, і вірус лейкозу великої рогатої худоби, не виняток, хоча він зазнає мутацій повільніше за віруси грипу чи ВІЛ. З огляду на це, чи не доцільніше було розробити систему діагностику вірус лейкозу великої рогатої худоби за двома вірусними генами? (розділ 3.1.3.1).

10. Згідно з міжнародними нормами (*Codex Alimentarius*), вміст глютену в усіх без винятку безглютенових продуктах не має перевищувати 20 ppm (20 мг/кг). З огляду на це більш доцільним було б розроблення діагностичума для кількісного визначення глютену у сільськогосподарській сировині і готовій до споживання харчовій продукції (розділ 3.4.1).

11. Деякі рисунки (наприклад, рис. 3.16, 3.33, 3.37-3.41, 3.52-3.56, 3.68-3.70 і т. ін.) перевантажені інформацією і важко сприймаються.

12. Назви деяких таблиць (наприклад, табл. 3.34, 3.75, 3.85, 3.91 і т. ін.) не лаконічні і не повністю відповідають змісту.

Робота цікава і перспективна для України, зроблено великий обсяг досліджень. Ще більшої цінності вона набула б, коли автор дав би відповідь на ряд запитань, а саме: у теперешній час одним з перспективних напрямків досліджень є з'ясування механізмів генетичної резистентності тварин до різних патогенів вірусної і бактерійної природи. Є певні напрацювання і в плані стійкості великої рогатої худоби до вірусу лейкозу. У зв'язку з цим виникає запитання щодо можливості і доцільності застосування в запропонованій автором методології молекулярно-генетичних маркерів прогнозування резистентності великої рогатої худоби, наприклад, до вірусу BLV. Автором запропоновано застосування різновидів полімеразної ланцюгової реакції для визначення низки показників

безпе́чності і якості сільськогосподарської продукції. Виникає запитання – чому самі ці методи було обрано для визначення даних показників і який з методів (ПЛР-ПДРФ, SYBR Green ПЛР-РЧ або TaqMan ПЛР-РЧ) більш доцільно використовувати в залежності від типу молекулярно-генетичних маркерів, показників та, можливо, об'єктів досліджень?

Висновки

13. Висновки розташовані невідповідно до підрозділів дисертаційної роботи, а деякі з них (9,10) мають суто декларативний характер.

Зауваження до форми викладу:

14. У розділах дисертант застосовує одночасно і минулий і теперішній час. Зустрічаються русизми, невдалі терміни та стилістичні обороти.

Автореферат

Автореферат дисертації відображає основні положення дисертації.

Водночас зауваження не є суттєвими, не стосуються принципів положень дисертаційної роботи, носять дискусійний характер і не зменшують її актуальності.

Загальний висновок. Враховуючи актуальність теми, обсяг досліджень, наукову новизну, кваліфікаційний рівень, аналіз одержаних результатів, апробацію, зміст висновків, вважаю, що дисертаційна робота на тему «**Методологія молекулярно-генетично го оцінювання сільськогосподарської продукції**», відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів...» щодо докторських дисертацій, а її автор **Облап Руслан Васильович** заслуговує на присудження наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент, д-р с.-г. наук, професор,
головний науковий співробітник відділу генетики
та біотехнології ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН

Підпис Копилова К.В.

вчений секретар ІРГТ ім. М.В. Зубця НААН

к. с.-г.н., ст.н.сп.

К.В. Копилов

Засвідчує



Ю.В. Мільченко