

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Міщенко Сергія Володимировича «Теоретичні і практичні основи використання інбридингу та гібридизації в селекції конопель»**, що представлена на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво

Актуальність теми і отриманих результатів. Коноплі (*Cannabis sativa* L.) – прадавня культура, що тисячоліття вирощувалась у світових цивілізаціях. На сьогодні зацікавленість до неї зросла, вона є цінною волокнистою культурою, промислові коноплі все більше використовують у насінневому, олійному, целюлозному, біоенергетичному і медичному напрямках. Особливий попит виник на медичні коноплі, тобто сорти з підвищеним вмістом не психотропних канабіноїдів – канабідіолу (КБД), канабігеролу (КБГ), канабінолу (КБН), канабіхромену за одночасної відсутності наркотичної складової – тетрагідроканабінолу (ТГК). У зв'язку з цим виникла проблема створення сортів конопель різнопланового використання, що вимагає пошуку нової методології створення вихідного селекційного матеріалу однодомних конопель як основи майбутніх сортів та розробки ефективної ідентифікації канабіноїдних сполук. Існуючі методики оцінки даних речовин у селекційних цілях не в повній мірі є ефективними при доборах на збільшення вмісту окремих. Тому, представлена робота є актуальною та своєчасною і спрямована на вирішення поставлених задач.

Дисертаційна робота присвячена теоретичному узагальненню та новому вирішенню важливої наукової проблеми використання інбридингу та гібридизації в селекції конопель шляхом удосконалення методичних підходів до ефективної ідентифікації канабіноїдних сполук, визначення закономірностей впливу внутрішніх й зовнішніх факторів на формування канабіноїдів в онтогенезі та взаємозв'язків між ними, комплексного використання інбридингу в селекції культури, зокрема створення самозапиленних ліній і на їх основі отримання різних типів гібридів, підвищення продуктивності, стабілізації ознак однодомності і відсутності канабіноїдних сполук, збільшення вмісту непсихотропних канабіноїдів, створення вихідного селекційного матеріалу і конкурентоздатних сортів конопель.

Дисертаційна робота Міщенко С.В. є завершеною науковою працею, яку він виконав в Інституті луб'яних культур НААН впродовж 2008–2019 рр. згідно завдань: 1) ПНД НААН «Луб'яні культури» – 19.01/015 «Розробити та удосконалити методи створення генетично стабільних ліній конопель для селекції за ознакою відсутності наркотичних властивостей, високих показників однодомності, вмісту волокна і насінневої продуктивності» (2006–2010 рр., номер державної реєстрації 0106U008789), 19.00.01.04.Ф «Встановити особливості генетичного контролю ознак відсутності канабіноїдних сполук та стабільності однодомності з метою створення гетерозисних гібридів конопель» (2011–2015 рр., 0111U004052), 19.00.01.07.П «Розробити методи збільшення генетичного потенціалу ознаки насінневої продуктивності сортів однодомних конопель з відсутністю наркотично активного тетрагідроканабінолу» (2011–2013 рр., 0111U004055), 20.00.01.03.Ф «Розробити теоретичні основи створення безнаркотичних конопель медичного напрямку використання з підвищеним вмістом канабідіолу на основі встановлення генетичних і фізіологічних механізмів його формування (синтезу)» (2016–2020 рр., 0116U000372), 20.00.01.06.Ф «Встановити генотипову мінливість ознак жирнокислотного складу олії в насінні ненаркотичних конопель з метою його поліпшення» (2016–2020 рр., 0116U000374), 20.00.02.10.ППШ «Розробити спосіб розмноження *Cannabis sativa* L. і *Linum usitatissimum* L. з насіння з низькою схожістю та життєздатністю в умовах *in vitro*» (2019 р., 0119U100897); 2) ПНД НААН «Генетичні ресурси рослин» – 09.01.01.17.Ф «Розробити методологію формування та ведення генетичного банку льону та конопель, розширити їх генетичне різноманіття для ефективного використання в наукових, селекційних та навчальних програмах» (2011–2015 рр., 0111U004054), 24.01.01.11.Ф «Встановити генотипові мінливості інтродукованих зразків льону та конопель за адаптивною здатністю, сформувати та поповнити ознакові та генетичні колекції» (2016–2020 рр., 0116U004145). Виконання

досліджень згідно державних завдань підтверджує актуальність і новизну досліджень.

Наукова новизна. Теоретично обґрунтовано вирішення важливої наукової проблеми використання інбридингу та гібридизації в селекції конопель шляхом удосконалення методичних підходів до ефективної ідентифікації канабіноїдних сполук. Визначені закономірності впливу внутрішніх й зовнішніх факторів на формування канабіноїдів в онтогенезі та взаємозв'язки між ними. Встановлено можливість комплексного використання інбридингу в селекції конопель. Розроблено теоретичні та методичні основи використання самозапилених ліній однодомних конопель як компонентів різних типів схрещувань, що дало позитивний ефект, який полягає у підвищенні продуктивності конопель за окремими ознаками і їх комплексом, формотворенні унікальних генотипів, що проявляються у фенотипах з принципово новими ознаками. Удосконалено методику створення самозапилених ліній і на їх основі отримання різних типів гібридів для формотворення унікальних генотипів задля підвищення продуктивності, стабілізації ознак однодомності і відсутності канабіноїдних сполук, збільшення вмісту непсихотропних канабіноїдів, створення вихідного селекційного матеріалу і конкурентоздатних сортів однодомних конопель різних напрямів господарського використання. Створено новий вихідний матеріал та інноваційні сорти конопель різнопланового використання.

Практичне значення отриманих наукових результатів. Створено і запропоновано виробництву інноваційні сорти конопель: Глесія (з високою насінневою продуктивністю), Глухівські 51 (з високим вмістом волокна), Миколайчик (з високим вмістом олії в насінні, нижчою висотою стебел за сорт-стандарт, що полегшує процес збирання насінневих посівів зернозбиральним комбайном), Глухівські 85 (енергетичного напрямку використання з високим урожаєм біомаси), Артеміда (універсального напрямку використання, але з високим вмістом олії, інтенсивним і потужним ростом рослин на початку вегетації), Гармонія (універсального напрямку використання, але з високим виходом волокна і містом олії), Вік 2020 (медичного напрямку використання з підвищеним вмістом КБГ). Сорти Глесія і Глухівські 51 займають більше половини посівних площ в Україні і проходять реєстрацію за кордоном.

Розроблено «Методику визначення вмісту канабіноїдних сполук у рослинах конопель методом тонкошарової хроматографії для селекційних цілей», «Спосіб оцінки рослин конопель на наявність канабіноїдних сполук» (патент на корисну модель № 107426 UA, 2016 р.), «Спосіб створення гібридного селекційного матеріалу однодомних конопель без психотропних властивостей» (№ 107427 UA, 2016 р.), «Спосіб створення синтетичних популяцій конопель» (№ 141089 UA, 2020 р.), «Спосіб розмноження рослин конопель з насіння з низькою схожістю та життєздатністю» (№ 120489, UA 2017 р.), «Живильне середовище для культивування однодомних ненаркотичних конопель (*Cannabis sativa* L.) середньоросійського еколого-географічного типу в умовах *in vitro*» (№ 139471 UA, 2020 р.) та впровадити їх у селекційний процес. Також запропоновано та успішно використано на практиці схеми селекції конопель із залученням самозапилених ліній

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, їх достовірність. Представлена дисертація має чітку спрямованість і продуманість поставлених на вивчення питань. Всі заплановані дослідження виконано в повному обсязі на високому науково-методичному рівні. Одержані результати обґрунтовані, систематизовані, статистично оброблені. Описання, аналіз та узагальнення експериментального матеріалу виконані з урахуванням наявної наукової інформації. Дисертація виконана за продуманим планом з використанням сучасних селекційно-генетичних методів досліджень. Усі розділи дисертації є повними, закінченими, з обґрунтованими висновками, які витікають з результатів досліджень. Загальні висновки відображають експериментальні дані дисертації і свідчать про глибокий аналіз отриманих результатів. Достовірність основних наукових положень підтверджується глибоким аналізом табличного матеріалу та проведеним статистичним обробітком експериментальних даних із застосуванням сучасних і новітніх методик.

Оцінюючи обсяг та рівень аналізу дисертантом експериментальних даних, можна стверджувати про їх достовірність. Висновки та пропозиції виробництву є науково-обґрунтованими та вірогідними.

Результати досліджень опубліковані у фахових виданнях, пройшли добру апробацію на науково-практичних форумах різного рівня.

Ступінь впровадження результатів роботи на момент її захисту достатній. Створені сорти конопель з підвищеним рівнем адаптивності, що занесено до Державного реєстру сортів рослин, придатних до поширення в Україні, займають більше половини посівних площ в Україні і проходять реєстрацію за кордоном.

Рекомендації щодо використання результатів досліджень. Наукові результати роботи, рекомендується використовувати в селекційному процесі при створенні сортів конопель різного напрямку використання. Практичні результати (сорти) рекомендується використовувати на виробництві.

Обсяг і повнота опублікованих матеріалів досліджень. Матеріали досліджень опубліковані в 106 наукових працях, з яких 3 розділи у колективних монографіях, 37 статей у фахових наукових виданнях України, 8 статей у наукових періодичних виданнях інших держав, 37 матеріалів конференцій, 4 авторські свідоцтва на сорти конопель, 5 патентів на корисні моделі. Також отримано 7 свідоцтв про реєстрацію зразків та 2 свідоцтва про реєстрацію колекцій генофонду рослин у Національному центрі генетичних ресурсів рослин України.

Оцінка мови і стилю дисертації. Дисертацію написано українською мовою, аргументовано, логічно, доступно для читання.

Автореферат дисертації відображає в стислому вигляді зміст дисертації, результати дослідів, висновки і практичні рекомендації.

Оцінка змісту дисертації. Дисертаційна робота Міщенка С.В. викладена на 525 сторінках машинописного тексту, у т. ч. 312 сторінок основного тексту. Містить анотацію, вступ, сім розділів, висновки, рекомендації для селекційної практики і виробництва, десять додатків, ілюстрована 110 таблицями та 112 рисунками. Список використаних джерел включає 519 найменувань, з них 145 латиницею. Об'єм дисертації, її структура, рівень і стиль поданого матеріалу відповідають вимогам до дисертаційних робіт.

У **вступі** аргументовано подано аналіз стану сучасних досліджень, актуальність та новизну. В практичному значенні показано, що завдяки впровадженню запропонованих методик створено і новий вихідний матеріал та сорти конопель, що впровадженні у виробництво.

Дискусійні положення.

- Бажано було б додати і до задач пункт – про визначення показників харчової якості та їх мінливості у нового селекційного матеріалу (тим більш, що ці матеріали в дисертації є).

У **розділі 1 «ОБґРУНТУВАННЯ ВИКОРИСТАННЯ ІНБРИДИНГУ ТА ГІБРИДИЗАЦІЇ В СУЧАСНІЙ СЕЛЕКЦІЇ КОНОПЕЛЬ (огляд літератури)»** здобувачем узагальнено значну кількість літературних джерел, в яких висвітлено сучасний стан та проблеми з питань таксономії, біології, селекції конопель, генетичних ресурсів. Встановлено рівень проведених наукових досліджень на даний час за темою дисертаційної роботи, з'ясовано які питання потребують вирішення. Виявлено недостатню вивченість можливості використання самозапилених ліній та гібридів для створення нового вихідного матеріалу. Використано достатню кількість сучасних іноземних джерел.

Дискусійні положення та зауваження.

– За посилання на монографії бажано вказувати сторінки.

– В огляді літератури (стор. 77, посилання на джерело 219, 234) вказано, що цитоплазматична чоловіча стерильність не була виявлена. Проте, це дані минулого

століття. Чи є перспективи створити, чи виявити в популяціях такі форми задля селекції на гетерозис та створення промислових гібридів F_1 .

У розділі 2 "УМОВИ, МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ" висвітлено ґрунтово-кліматичні, погодні умови зони проведення досліджень, наведено методики з проведення досліджень та статистичного аналізу отриманих експериментальних даних. Досить детально та змістовно наведено схеми дослідів, в яких вивчався вихідний матеріал.

Зауважень та побажань немає.

Розділ 3. "ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ КАНАБІНОЇДНИХ СПОЛУК КОНОПЕЛЬ У СЕЛЕКЦІЙНИХ ЦІЛЯХ». Проведені дослідження з удосконалення якісної оцінки канабіноїдних сполук. Детально обґрунтовано запровадження удосконалених методик та їх технічне використання. Наведена ефективність застосування удосконалених методів визначення канабіноїдних сполук на різних етапах селекції у поєднанні з індивідуальним і сімейно-груповим добором за ознаками їх наявності та вмісту. Результативність використання методик підтверджено практичними результатами зі створення конопель з відсутністю канабіноїдних сполук (до 100% елітних рослин) та створеними зразком VIK CBN і сортом Вік 2020 з підвищеним вмістом КБГ.

Дискусійні положення та запитання.

– В таблиці 3.7 (стор.173) показано збільшення за роками кількості рослин сортів конопель з відсутністю канабіноїдів. Чи це був природній процес, чи результати попередніх доборів елітних рослин за показником «відсутність канабіноїдів»? Наскільки успадковується показник «відсутність канабіноїдів»? Від чого залежить поява рослин з канабіноїдами?

У розділі 4 "ЗАКОНОМІРНОСТІ ПРОЯВУ ОЗНАК НАЯВНОСТІ ТА ВМІСТУ КАНАБІНОЇДНИХ СПОЛУК І ЇХ ВИКОРИСТАННЯ В СЕЛЕКЦІЇ КОНОПЕЛЬ» досліджено колекції генетичних ресурсів конопель за хемотипом як джерел вихідного матеріалу, встановлено взаємозв'язки між канабіноїдними сполуками і можливостями інбридингу. Проведено пошук ліній з перерваним процесом біосинтезу канабіноїдів як єдино можливого шляху для створення гетерозисних гібридів з відсутністю психотропних властивостей та початку селекції конопель у медичному напрямку. Проведені розробки способів доборів зразків для аналізу канабіноїдів, принципів підбору батьківських форм для схрещування.

Дискусійні положення та запитання до розділу 4

– В розділі декілька разів (стор.189-191) робляться висновки про сильний позитивний взаємозв'язок канабіноїдних сполук ТГК (психотропна) з КБД, КБГ, КБХ. Проте, більшість напрямів селекції культурних рослин ведеться на розривання таких природних кореляцій шляхом рекомбінаційної селекції. Чи були виявлені колекційні зразки (з 500 зразків), що мають незалежний синтезу канабіноїдних сполук.

– В колекцію було залучено зразки з країн, що знаходяться в різних географічних широтах (від Фінляндії до Італії). Чи спостерігалась фотоперіодична реакція цих зразків на 50-х широтах? Чи залучались зразки з Індії?

– Сорт Гляна середньоєвропейського походження (яка країна?) за даними ТШХ має ТГК 1 бал (стор. 193, другий абзац). Проте, на стор. 196 (табл. 4.3) показники ТГК збільшені удвічі. З чим це пов'язано?

– Стор. 201, табл. 4.5, 4.6 децю не зрозуміло щодо «примітки» - істотно що? відмінність сполуками, чи органами?

– Стор. 213., другий абзац. Цитата: «Епігенетики ділять концепцію спадковості...». На мою думку, термін «епігенетики» децю звужує сферу інтересів і діяльності генетиків та селекціонерів. Адже термін «епігенез» - це один із багатьох

теоретичних напрямів щодо онтогенетичного розвитку і мінливості організмів, успадкування і прояву ознак.

Розділі 5 "ОСОБЛИВОСТІ ЗМІНИ БІОЛОГІЧНИХ І СЕЛЕКЦІЙНИХ ОЗНАК РОСЛИН КОНОПЕЛЬ ПІД ВПЛИВОМ ІНБРИДИНГУ». У розділі наведені результати досліджень з прояву ознак при близькоспорідненому розмноженні та його використання в селекції конопель. Показано, що у результаті самозапилення одностатевих конопель спостерігалася генетична стабілізація ознак, диференціація інбредних ліній за окремими і комплексом ознак, формування унікальних генотипів із характеристиками, які не були властиві вихідним формам, та явище інбредної депресії, що полягало у зниженні морфологічних ознак. Показано прояв інбредної депресії репродуктивних органів конопель, що призводить до зміни статеві структури в результаті самозапилення. Репродуктивна інбредна депресія у в онтогенезі проявлялася у зниженні енергії проростання і схожості насіння, розвитку різного роду аномалій генеративних органів – жіночої та чоловічої стерильності, появі рослин з інтерсексуальними квітками та безстатевих форм, зміні статеві структури популяції, зниженні кількості сформованого насіння у різних поколіннях вихідних для самозапилення форм. Доведено можливість створення цінних самозаплених ліній за окремими селекційними ознаками та їх комплексом, зокрема з високими показниками (мінімальним ступенем інбредної депресії) загальної і технічної довжини стебла, діаметру стебла, маси стебла і волокна, вмісту волокна, маси насіння з рослини, вмісту олії, ромбоподібною формою суцвіття, зі стійкістю до шкідників і хвороб, з однорідним статевим складом, зближеними строками початку цвітіння чоловічих і жіночих квіток тощо.

Обговорення розділу 5.

- Самозапилення призводить до депресії утилітарних ознак і це загально визнано. Проте, на Рис. 5.2, стор.250 спостерігаємо, що маса 1000 насінин у сорту Золотоніські зростає в 11 циклі інбридингу на відміну у інших сортів! Чим це пояснити.

- В розділі 5.2 (стор.253) вказано, що у конопель інбредна депресія проявлялась у виявах: 2) розвиток аномалій генеративних органів - ...чоловічої стерильності. Чи може це бути ЦЧС (цитоплазматична чоловіча стерильність), чи генна стерильність і чи можливо було б її використовувати в гетерозисній селекції?.

- стор. 311, останній абзац вказано «Комбінація (суміш) самозаплених ліній рідко використовується як метод для покращення перехреснозаплених культур....». Можна не погодитись з цим висновком. Можливо, у овочевих культур і є така проблема, на що посилається здобувач (джерело 7), проте у зернових культур (наприклад кукурудза) суміш ліній, або їх перезаплення у розсаднику полікросу є досить поширеним методом періодичного добору і навіть створення комерційних синтетичних популяцій.

У розділі 6 «РІВЕНЬ ПРОЯВУ ТА УСПАДКУВАННЯ СЕЛЕКЦІЙНИХ ОЗНАК У ГІБРИДІВ КОНОПЕЛЬ, СТВОРЕНИХ НА ОСНОВІ САМОЗАПЛЕНИХ ЛІНІЙ» представлені результати аналізу селекційної цінності сортолінійних, лінійносортових і міжлінійних гібридів конопель F₁–F₃ різних еколого-географічних типів. Доведено можливість створення гібридів конопель на основі самозаплених ліній з високою продуктивністю (наявністю гетерозисного ефекту) при одночасній відсутності канабіноїдів і стабільній ознаці одностатевості для урізноманітнення вихідного матеріалу, розширення його генетичної основи та прискорення селекційного процесу. Проведено аналіз селекційної цінності лінійносортових, міжсортових і складних гібридів конопель різних еколого-географічних типів. Порівняльний аналіз лінійносортових і міжсортових гібридів, споріднених за батьківської формою (сортом Глухівські 51), показав, що перші мають вищу селекційну цінність за основними господарськими ознаками. Доведено можливість і ефективність комбінаційної селекції у одностатевих форм конопель. Дослідження самозаплених ліній і сортів конопель за параметрами комбінаційної здатності показало значну їх диференціацію за ефектами ЗКЗ і варіансами СКЗ).

Обговорення розділу 6.

- В розділі наводяться показники коефіцієнту домінування, істинного та гіпотетичного гетерозису. Проте, бажано було б показати і конкурсний гетерозис за ознаками, що могло б стати підґрунтям для подальших планувань щодо селекції на гетерозис.

Розділ 7. «ЕФЕКТИВНІСТЬ СЕЛЕКЦІЇ НЕПСИХОТРОПНИХ КОНОПЕЛЬ З ВИКОРИСТАННЯМ ІНБРИДИНГУ ТА ГІБРИДИЗАЦІЇ»

Обґрунтовано методичні основи використання інбридингу та гібридизації в селекції конопель. У результаті теоретичного узагальнення проведених досліджень й отриманих практичних результатів обґрунтовано методичні основи та побудовано схеми селекції неспсихотропних високопродуктивних конопель на основі використання інбридингу і гібридизації, що включають опис моделі та послідовності створення самозапилених ліній, критерії їх добору як компонентів схрещувань, прийоми ізоляції та гібридизації рослин конопель, особливості оцінки вихідного матеріалу на різних етапах селекційного процесу, створення синтетичних популяцій тощо. Описано особливості розроблених і впроваджених «Способу створення гібридного селекційного матеріалу однодомних конопель без психотропних властивостей» і «Способу створення синтетичних популяцій конопель».

Установлено вплив гаметоцидів 1,3-дибромпропану, дибутилфталату та етефону на формування чоловічої стерильності і селекційних ознак конопель. Доведено ефективність використання на коноплях у ролі гаметоциду дибутилфталату

Наведені практичні результати використання інбридингу та гібридизації в селекції конопель. Ефективність розроблених методичних основ селекції доведена низкою створених і поліпшених конкурентоздатних сортів Артеміда, Гармонія, Глухівські 85, Миколайчик, Глесія, Глухівські 51, Вік 2020 та зразків конопель Деметра, Аврора, Грація, Іріда.

Зауваження та побажання.

- В табл. 7.3, 7.4, 7.5 в примітках вказана «різниця істотна на рівні...». Проте, істотна різниця можлива не тільки за перевищення стандарту, що і спостерігаємо в таблиці. Крім того, надається я НІР, що і є критерієм відмінності

Загальний висновок.

Дисертаційна робота Міщенка Сергія Володимировича є завершеною науковою працею, виконана на високому науково-методичному рівні, в якій наведено теоретичне обґрунтування та нове вирішення важливої наукової проблеми. Проведені багаторічні експериментальні дослідження мають вагомое теоретичне та практичне значення.

Відмічені вище недоліки не знижують наукову та практичну цінність дисертаційної роботи та її актуальність. Дисертаційна робота С.В. Міщенка відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів №567 від 24 липня 2013 року, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво.

Офіційний опонент:

доктор сільськогосподарських наук, професор,
академік НААН, головний науковий співробітник
відділу селекції Інституту зрощуваного
землеробства НААН

Ю.О. Лавриненко

О.І. Жақун

Підпис Ю.О. Лавриненка засвідчую:
Зав. відділом кадрів ІЗЗ НААН



м. Херсон, 01.12.2020 р.