

ВІДГУК

на дисертацію Пірка Ярослава Васильовича « ПОЛІМОРФІЗМ ДОВЖИНИ ІНТРОНІВ ГЕНІВ БІЛКІВ ЦИТОСКЕЛЕТУ ЯК ЕФЕКТИВНИЙ ІНСТРУМЕНТ ГЕНОТИПУВАННЯ РОСЛИН» на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність роботи. Молекулярно-генетичним маркерам, які ґрунтуються на нуклеотидних послідовностях поза залежності їхньої функціональної ролі у геномі, належить визначальна роль у встановленні факту надзвичайно високого рівня поліморфізму геномів, який характеризує всі рівні таксономічних статусів – від царин до видів. Результат тридцятирічного інтенсивного використання полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації поліморфізмів у геномах з дуже різними цілями нагадує в цілому залп із дробовика по зграї горобців за своєю ефективністю. Так, влучити можна, якщо зграя велика, проте більшість заряду йде в повітря. Але коли маркерів стає аж дуже багато, складаються карти маркерів (SSR, SNP) які дають можливість пов'язувати гени з конкретними хромосомами. Тим не менш, величезне, на наш погляд, значення того класу продуктів ампліфікації окремих ділянок геному, які в дисертації охарактеризовані як група довільних ДНК-маркерів, полягає в тому, що вони привчили нас до думки, що працювати на рівні ДНК і можна, і доцільно. І тепер ми легко і з відчуттям задоволення переходимо до розробки наступного етапу пошуку та ідентифікації поліморфізмів за послідовністю нуклеотидів безпосередньо у кодувальних генах. Це робить наші зусилля при виконанні певного класу завдань більш прицільними, отже – більш ефективними. Головною умовою для переходу до таких систем стала наявність баз даних з послідовностями нуклеотидів для багатьох біологічних об'єктів, наповненість яких зростає швидше, ніж виконуються дисертації, а також розробка інструментарію для аналізу таких баз. Вміння використовувати цей ресурс для реалізації своєї мети – розробка ген-специфічних маркерних систем

на основі нуклеотидних послідовностей кодувальної частини гена, ставлять роботу Пірка Я.В. в коло досліджень з високим рівнем актуальності.

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

Названий зв'язок поза всяких сумнівів у наявності, тому що зміст роботи визначається тематикою бюджетних науково-дослідних робіт «Вивчення молекулярно-генетичних та клітинних механізмів стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів для покращення їх адаптивних властивостей до несприятливих умов навколишнього середовища» (ДР № 0112U001597, 2012–2016 рр.), «Популяційна біологія і генетика видів деревних рослин на антропогенно трансформованих ландшафтах» (ДР № 0112U007760, 2014–2017 рр.), «Створення молекулярно-генетичних маркерів для диференціації різних генотипів рослин на основі вивчення поліморфізму інтронів генів їх цитоскелетних білків» (ДР № 0115U005025, 2015–2019 рр.), зареєстрованих для виконання у відділі геноміки та молекулярної біотехнології та у відділі популяційної генетики Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», де працює автор дисертації.

Структура та обсяг дисертації. Текст дисертаційної роботи має унормовану структуру та включає всі розділи, які мають бути у сучасній роботі: анотація україномовна та англомовна, зміст, перелік скорочень, вступ, огляд літератури (48 стор.), матеріали та методи дослідження (25 стор.), розділи 3–6 експериментальних результатів (197 стор.), узагальнення результатів (32 стор.), висновки і список використаних джерел. Останній налічує 398 англомовних джерел та 77 україно- та російськомовних.

Характеристика розділів та оцінка змісту дисертації. Розділ 1. «Молекулярно-генетичні маркери у дослідженні генетичного поліморфізму рослин» містить два підрозділи. В першому наводиться коротка і у сенсовому контенті вичерпна характеристика розроблених до сьогодні модифікацій генетичних маркерів, які базуються на ампліфікації довільних (не генспецифічних) послідовностей ДНК. Наводяться приклади їхнього застосування. Головний висновок, який робить автор дисертації до цього

підрозділу, на наш погляд повністю правильний, – кожна модифікація має бути застосована для вирішення певних задач, і від дотримання цієї вимоги залежить ефективність щодо отримання інформації та її аналізу. У другому підрозділі автор дисертації зосереджується на тому класі генетичних маркерів, до розробки яких він долучається своєю докторською роботою: ТВР (поліморфізм довжини інтронів генів бета-тубуліну) та АВР (поліморфізм інтронів генів актину), це генспецифічні маркери. Тут же дається характеристика генів, які кодують α -, β -, γ -глобуліни та актин. Наведена у розділі інформація значно оптимізує подальше сприйняття експериментальної частини роботи.

У розділі 2 докладно описується рослинний матеріал, який став джерелом ДНК для досліджень. Найбільш загальне сприйняття – широке коло залучених рослин: покритонасінні дводольні та однодольні у видовому, популяційному, сортовому статусах, серед них трав'янисті рослини та дерева. Нижчі рослини представлені зеленими мікроводоростями. У підрозділі 2.2 наведено інформацію про наявні у мережі бази даних, які можуть слугувати джерелом потрібних для роботи послідовностей цільових генів. Описується інструментарій, який використовується для пошуку і адаптації такої інформації. Підрозділи 2.3–2.5 висвітлюють процес виділення ДНК та подальшої роботи з нею, в тому числі вказуються послідовності праймерів, як з літературних джерел, так і розроблені автором роботи на основі біоінформатичного аналізу. Вказані умови ампліфікації фрагментів для трьох різновидів ПЛР-аналізу, для ТВР, сТВР, hТВР, SSR, та візуалізації продуктів ампліфікації у гелях.

Розділ 3. «Біоінформатичний аналіз екзон-інтронної структури генів, що кодують білки цитоскелету, та розроблення праймерів для дослідження поліморфізму довжини їхніх інтронів» включає опис роботи *in silico*, з якої тепер у сучасній генетиці має починатися практично кожне дослідження, коли йдеться про конкретні гени. Виконано порівняльний аналіз наявних у відповідних базах даних про екзон-інтронну структуру генів β -, α -, γ -тубулінів та актину (підрозділ 3.1). Зроблено висновок про консервативність екзонів для генів різних тубулінів та актину, менш високу консервативність для інтронів.

Автор спирається на отримані результати як матеріальне підґрунтя для того, щоб шукати консенсусні послідовності для розробки праймерів в ділянках екзонів, прилеглих до інтронів. А самі інтрони мають бути використані для ідентифікації поліморфізму за рахунок зміни кількості нуклеотидів між сайтами екзонів, які будуть гібридизуватися з праймерами (підрозділ 3.2). У цілому розділ включає результати дуже великого обсягу порівняльного аналізу, які стають стартовою точкою для наступної роботи з ДНК обраних для дослідження рослин. Саме в цій частині роботи було ідентифіковано найбільш консервативні ділянки трьох екзонів β -тубуліну, що дало можливість автору розробити дві пари універсальних (вироджених) праймерів, які були використані для виявлення поліморфізмів інтронів для різних видів досліджених рослин, що стало одним із суттєвих пунктів новизни для роботи Пірка Я.В.

Розділ 4. «Генетичне профілювання рослин за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну та актину». Підрозділ 4.1 включає результати визначення генотипів рослин, які належать видам однодольних рослин, за спектрами ампліфікації ДНК з праймерами, підібраними до генів β -тубуліну та актину для ампліфікації послідовностей інтронів. Проаналізовано зразки двох видів *Eleusine*, *Aegilops biuncialis*, *Deschampsia antarctica*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*. Деякі з отриманих результатів використані для розрахунку популяційно-генетичних показників, генетичної дистанції Неї, коефіцієнтів подібності Неї та Лі, показника РС. Для егілопса та дешампсії додатково використовували hTBP- та cTBP-аналіз. Порівняння дендрограм, побудованих для окремих популяцій егілопсу за результатами кожного з цих аналізів показує, що всі вони інформативні, а отже їхнє сполучення підвищує об'єктивність результатів. Виразним хоча і не прямим підтвердженням на користь диференціувальної сили поліморфізму за довжиною інтронів тубулінових генів стали результати, отримані на дешампсії. На відміну від двох інших злаків, пальчастого проса і егілопсу, дешампсія демонструвала значну мономорфність представників окремих популяцій і це на тлі того, що кількість рослин з кожної популяції було збільшено до п'яти. Популяції егілопсів, а

також види *T. aestivum*, *H. vulgare*, *Oryza sativa* були також оцінені щодо поліморфізму за інтронами гена актину, який виявився менш інформативним у порівнянні з поліморфізмом за інтронами генів тубуліну. Висновок автора про більшу інформативність ТВР-аналізу у порівнянні з АВТ-аналізом і пояснення цього факту здаються цілком обґрунтованим наведеними експериментальними результатами.

Підрозділ 4.2 присвячений опису результатів тих самих варіантів аналізу поліморфізмів із застосуванням ДНК рослин з групи дводольних. Задіяні види *Camelina sativa*, п'ять видів *Linum* (поліморфізм за довжиною або першого або другого інтронів бета-тубуліну та інтрону актину), два види *Achillea* вивчали за поліморфізмом інтронів бета-тубуліну. Розраховувано показники РС і коефіцієнти подібності Неї та Лі, на їхній підставі створено дендрограми спорідненості. На сортах льону виконано дуже цікаве дослідження з порівняння диференціальних потенцій мікросателітних маркерів і поліморфізмів за довжиною інтронів консервативних тубулінових генів. Дослідження виконано добре, вдумливо заплановано, матеріал підбрано адекватний, результат, на думку опонента, не дуже сподобався Ярославу Васильовичу, адепту поліморфізму за довжиною інтронів консервативних генів. Однак обговорив ці результати він добросовісно і зважено. Цей пункт роботи цінний ще і тим, що дослідник на великому матеріалі переконався, що навіть усередині окремого сорту льону, який декларується у тексті дисертації як самозапильна рослина, у наявності великий поліморфізм. Отже якщо будуть створюватися рекомендації з використання такого поліморфізму для паспортизації сортів чи диференціації генотипів у популяціях різного статусу слід включити у рекомендації необхідність встановлювати алельні (ампліконні) частоти і порівняння об'єктів спостереження виконувати лише з їхнім урахуванням. А це прямо вказує, що повноцінна характеристика рослинного зразка не може виконуватися на ДНК однієї рослини. Навіть для самозапильовачів. В цьому ж підрозділі продемонстровано придатність поліморфізму за довжиною інтронів генів β -тубуліну і актину для оцінки ступеня генетичної гетерогенності стародавніх сортів льону, що зберігаються у колекціях.

За поліморфізмом довжини актинових інтронів вивчено два види *Solanum*, 4 сорти картоплі і 12 сортів томатів. Констатовано різницю між двома видами щодо наявності поліморфізму за довжиною інтрону активних генів: сорти картоплі виявили значно більший поліморфізм у порівнянні з сортами томатів. Результатом цього експерименту автор наочно демонструє залежність ефективності маркерної системи від рослинного матеріалу. З іншого боку, отриманий результат вказує на доцільність використання цієї маркерної системи для загальної оцінки внутрішньовидової гетерогенності, коли необхідно зробити швидкий скринінг великих обсягів рослинних зразків з використанням обмеженої кількості праймерів.

У підрозділі 4.3 представлені результати вивчення поліморфізму за довжиною інтронів гена β -глобуліну серед деревних рослин. Вивчено представники родів *Pinus* та 17 видів покритонасінних, які представляли різні роди та родини. Це величезне за обсягом дослідження дало можливість розрахувати популяційно-генетичні показники, побудувати дендрограми візуалізації генетичних відмінностей та сформулювати чіткий висновок щодо диференціовальної здатності маркерної системи, яка ґрунтується на довжині інтронів β -тубулінових генів: можна знайти амплікони, специфічні на видовому рівні, з підвищенням таксономічного статусу зростає кількість спільних ампліконів. Підрозділ характеризується застосуванням особливо величезного обсягу дослідженого матеріалу, а сам експеримент спланований і виконаний з бездоганною ретельністю. Як і в підрозділі, присвяченому вивченню гетерогенності серед сортів льону, для деяких видів деревних рослин (*Quercus robur*, *Ulmus pumila*, *U. suberosa*) генотипи скринували з застосуванням мікросателітних маркерів. На наш погляд, на даному матеріалі використання цих маркерів програє порівняно з ТВР-аналізом щодо можливості уніфікувати показник мінливості усередині популяції. Отже і в даному підрозділі підтверджується значення розробленої маркерної системи як ефективною для характеристики генетичної диференціації у зв'язку з філетичними взаєминами досліджуваних представників. Слід погодитися з висновком Ярослава Васильовича про високу придатність цієї маркерної системи у популяційно-

генетичних дослідженнях, колосальна зручність якої полягає у використанні обмеженого набору праймерів, головного затратного матеріалу, коли кількість вкладених коштів зростає разом з різноманітністю синтезованих праймерів.

У підрозділі 4.4 на матеріалі ТВР-аналізу за першим та другим інтронами представників трьох відділів зелених мікрводоростей доведено ефективність використання розробленої системи маркерів для диференціації представників окремих таксонів. Виявлено наявність диференціовальної спроможності методу на рівні родів, видів і навіть окремих штамів водоростей. Враховуючи слабку адаптованість цих таксонів до застосування молекулярно-генетичних маркерів і наявність в той же час необхідності до визначення окремих представників у біоті екосистем, має сенс підкреслити перш за все практичну значущість розробленої системи маркерів для скринування розмаїття зелених водоростей і характеристики окремих штамів.

Розділ 5. «Генетичне профілювання рослин за допомогою поліморфізму довжини інтронів генів α -тубуліну». Використано 5 видів покритонасінних рослин. Зроблено біоінформатичний аналіз з використанням даних сиквенування геномів цих видів і послідовностями *A. thaliana* у якості базових, анотованих як гени альфа-тубулінів. Визначено екзон-інтронну структуру цих генів у різних видів. Зроблено висновок про певну консервативність екзонних ділянок та гіперваріабільність інтронів щодо їхньої довжини та можливість використання першого інтрону для створення нової маркерної системи типу ІЛР (поліморфізм за довжиною інтронів). Автором розроблена пара вироджених (універсальних) праймерів із використанням екзонних послідовностей, що фланкують перший інтрон. Ефективність праймерів перевірено на *A. thaliana*, сортах *L. usitatissimum*, *O. sativa*, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* і доведено їхню ефективність у якості диференціаторів як на видовому, так і на сортовому рівнях групування рослин.

Розділ 6. «Генетичне профілювання рослин за допомогою аналізу поліморфізму довжини інтронів генів γ -тубуліну». Цей розділ за етапами роботи подібний до попереднього, лише аналізували гени γ -тубуліну і

використовували сиквенси генів видів *Zea mays*, *A. thaliana*, *L. usitatissimu*. Було розроблено пару універсальних праймерів, які, як показано у роботі, на ДНК кукурудзи і льону гібридизуються так, що в продукт ампліфікації крім інтронів потрапляє один екзон. Нам здається, що це не може принципово впливати на диференціовальну спроможність такої маркерної системи, зате, як справедливо відмічає автор роботи, зростає універсальність для їхнього використання, тому що не вимагається попереднього знання про екзон-інтронну структуру гена, який постачає матрицю для гібридизації з праймерами.

Розділ 7 включає аналіз та узагальнення результатів роботи, його зміст відповідає назві і дає змогу ще раз переконатися у тому, що дисертаційна робота підкорюється єдиній ідеї, для її реалізації виконано великий обсяг експериментальної роботи і результати, отримані у декількох різних напрямках досліджень, висвітлюють значення системи маркерів, створеної на основі консервативних генів, які можуть бути використані як диференціатори завдяки наявному в них поліморфізму за довжиною інтронів.

Висновки кількістю 16. Характеризують всі результати роботи і повністю обґрунтовані наявними в розділах роботі даними.

Достовірність отриманих результатів Судячи з дат перших публікацій, роботу сплановано та розпочато було давно, ще коли були зроблені перші припущення про маркерну потенцію поліморфізму за довжиною інтронів генів тубуліну. Тепер, по завершенню роботи, видно, що її сплановано логічно, значно розширений перелік можливих складових елементів гаплотипів і автор дисертації оперував з інтронами трьох паралогів тубуліну та актину разом чи поодиночі. Аналіз та обговорення отриманих результатів до кожного з експериментальних розділів залишає відчуття задоволення, тому що виглядають вони цілком обґрунтованими і до обговорення залучаються сучасні публікації з тієї самої або спорідненої тематики. Експериментальна частина роботи, виконана у відповідності до сучасних методів молекулярної генетики, цілком відповідає задекларованій меті роботи. Обсяг експериментальної роботи величезний. Достовірність сформульованих висновків сумнівів або зауважень

не викликає, тому що вони повністю обґрунтовані результатами експериментальної частини. Дисертацію оформлено згідно вимогам ДАК МОН України до оформлення докторських дисертацій.

Наукова новизна результатів дисертаційної роботи. Можливість використання поліморфізму генів за довжиною інтронів реалізовано на чотирьох комплексах генів, що кодують білки цитоскелету клітини: актин, α -, β - та γ -тубуліни через створення маркерних систем групи ПЛР-маркерів, в яких ампліфікація ДНК здійснюється за допомогою праймерів, специфічність яких визначається консервативними ділянками згаданих генів, а мінливість продуктів визначається варіативною частиною консервативних генів – інтронами. Перелічені гени використані як індивідуально, так і у сукупності, і верифікація інформативності маркерних систем перевірена на рослинному матеріалі, який представляє, з одного боку, різні таксони, з іншого – розмаїття генотипів у середині видів на рівні сортів, сортотипів, локальних популяцій та штамів. Доведено експериментально, що зростання універсальності праймерів за рахунок виявлення як можна більш консервативних сайтів для гібридизації з праймерами у екзонах збільшує придатність цих маркерних систем для оцінювання філогенетичних відстаней між окремими представниками таксонів верхнього рівня. Підвищення специфічності праймерів дає змогу диференціювати генотипи усередині спеціальних популяцій одного і того самого виду. Новизною характеризується також результати порівняльного аналізу диференційовальної спроможності двох принципово різних типів маркерів з групи ПЛР-маркерів, що базуються на мікросателітних повторах і на поліморфізмі за довжиною інтронів: ефективність кожного з двох типів молекулярних маркерів залежить від мети, з якою виконується дослідження.

Теоретичне значення одержаних результатів досліджень. Доведено можливість використання генів, наявних у всіх біологічних видів і консервативних на рівні транскриптому через принципову важливість незмінної структури білкового продукту для нормального функціонування клітини, для створення маркерної системи завдяки внутрішньогенному поліморфізму за довжиною інтронів, ділянок генів, еволюційно вільних для

накопичення мутацій. Це робить консервативні гени матрицею для створення принципово нових маркерних систем, які можуть бути використані для скринування будь-яких рослинних видів на практично будь-якому рівні групування представників із залученням універсальних праймерів.

Практичне значення отриманих результатів. Біоінформатичний аналіз нуклеотидних послідовностей, наявних для тих видів, з якими працював Я.В.Пірко, надає конкретні відомості про екзон-інтронну структуру генів, обґрунтовує націленість на певні сайти генів як джерело потенційних матриць для розробки праймерів. Ті високоспецифічні та особливо вироджені праймери, які були розроблені в ході виконання роботи, мають величезну цінність, тому що будуть використовуватися надалі дослідниками. Практичне значення мають результати порівняння ефективності маркерних систем, основаних на мікросателітах, з ефективністю маркерних систем, специфічних до консервативних генів. Велике практичне значення має демонстрування того факту, що розроблені маркерні системи є ефективними для популяційно-генетичних досліджень усередині одного і того самого виду, а також для швидкого і зручного розрізнення представників різних таксонів у сукупності організмів (мікроводорості), які важко розрізняти за фенотипними властивостями. Найбільш вагомим практичним значенням, на наш погляд, є створення універсальних праймерів, тому що уніфікація праймерів працює на зменшення вартості експерименту та збільшенню кола об'єктів спостереження, з якими можна працювати.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Результати дослідження, що містяться у дисертаційній роботі, повністю представлені у 37 наукових працях, з них 23 – у рецензованих фахових виданнях вітчизняних та закордонних, 13 тезах доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних форумів спеціалістів. Зміст автореферату відбиває основний зміст дисертації.

Зауваження щодо змісту та оформленню дисертації.

1. У підрозділі 2.5 написано, що ДНК виділяли з насіння, паростків або зеленої маси рослин. Але в жодному випадку не вказано скільки об'єктів спостереження було використано для виділення ДНК від кожного з рослинних видів. Практично відсутня така інформація також у розділах 3-6. В результаті порівняння окремих зразків залишає відкритим питання: чи вказує наявна різниця у спектрах ампліфікації на існування цієї різниці між окремими зразками, чи вона просто відбиває внутрішній поліморфізм, притаманний кожному із досліджених зразків. Іншими словами, не показано гомогенність (або гетерогенність) спектрів для кожного зразка окремо.
2. У підрозділах експериментальної частини дано ретельну характеристику досліджуваних видів за певними біологічними властивостями. Однак в абсолютній більшості випадків (за виключенням *Linum usitatissimum* та ще кількох видів) не вказується спосіб розмноження, властивий конкретному біологічному виду і, якщо розмноження статеве, не згадується система запліднення: ауткросинг, самозапліднення чи змішана система. Між тим це має принципове значення у спробах охарактеризувати поліморфність угруповання за якимось генетичним елементом, в даному випадку, за довжиною інтронів певних генів.
3. У тексті дисертації починаючи з огляду літератури особисто мені не вистачало теоретичного порівняння маркерів на основі мікросателітів (довільні, розкидані по всьому геному) та ген-специфічних, як в даній роботі. Таке зауваження, напевно, в мене б не виникло, якщо б практично в кожному розділі Ярослав Васильович не згадував про значення розроблених маркерних систем для диференціації генотипів за ознаками, які мають якесь значення чи то у селекції, чи то у екологічних дослідженнях тощо. І тут в мене виникає заперечення і бажання вказати на величезну різницю між мікросателітними маркерами, довільними, розкиданими по всьому геномі, та маркерними

системами що обговорюються, ген-специфічними. Скільки б недоліків не було у SSR-маркерів, а своє головне призначення – картування цільових генів на хромосомах, вони виконують. До цього завдання у принципі не можна підходити з ген-специфічними маркерами. Тому групування рослин у відповідності до їхньої належності до різних генотипів за такими маркерами можна в окремих випадках, як нам здається, накласти на розподіл за градаціями ознак, які ми вважаємо корисними, через зчеплення або через асоціацію відповідних генів з геном – джерелом ген-специфічної маркерної системи. Але декларувати ген-специфічні маркери як такі, що придатні для ідентифікації групи рослин, збагачених на якісь корисні ознаки, було б неправильно.

4. Пункт 4.2.2. «Генетичне профілювання *Achillea...*» краще було б не включати в роботу. У порівнянні з іншими пунктами дисертації він містить геть обмежену інформацію, нічого нового в ньому немає і він програє у порівнянні з іншими.
5. У формулі (1) для визначення інформаційного змісту поліморфізму (PIC) f_{ai} це не частота фрагментів, у яких відсутній фрагмент i , а саме так написано у підрозділі 2.6, а кількість зразків (треків на гелі), в яких відсутній фрагмент i . Так само слід поправити позначення для f_{bi} .
6. Неточне вживання загальновідомих генетичних термінів. Стор. 44 літогляду: ДНК-маркери класифікуються за формою взаємодії генів: кодомінантні і домінуючі ДНК-маркери. Вказана взаємодія – не міжгенна, а міжallelна. Міжгенні взаємодії – це різні види епістазу. Звісно, алель – це форма гена, однак бувають контексти, де словом ген не можна замінювати слово алель. І перший такий контекст – взаємодія алелів. По всьому тексту дисертації в різних варіантах вказується, що нуклеотидні послідовності кодують гени. Наприклад:

Предмет дослідження – нуклеотидні послідовності генів цитоскелетних білків (α -, β -, γ -тубуліну та актину), закодовані в геномах різних видів рослин; використання поліморфізму інтронів цих генів в молекулярно-генетичних дослідженнях рослин.

Або: «Молекулярно-генетичні маркери (ДНК-маркери) – нуклеотидні послідовності, що кодують певні гени...» (стор. 39). Нуклеотидні послідовності гени не кодують, вони самі є генами, коли кодують послідовності амінокислот, які складають білок – продукт експресії гена. Застосовується термін «відпал», прямий переклад російськомовного слова отжиг, який, в свою чергу, з'явився як прямий і невдалий переклад англійського слова annealing. У сучасній літературі він витискується терміном ренатурація або гібридизація, принаймні суто технічний термін відпал не використовується.

annealing ренатурація ДНК	Medical (En-Ru)
annealing отжиг, гібридизація (нуклеиновых кислот)	Biology (En-Ru)

Аналіз не біоінформаційний (стор.

101), а біоінформатичний.

7. У підпункті 2.2 написано: «Серед обраних для дослідження рослин лише для пшениці та ячменю є дані повного сиквенсу геному». А серед досліджуваного рослинного матеріалу вказано *Arabidopsis thaliana*, *Linum usitatissimum*, *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*, *Oryza sativa* про які відомо, що їхні геноми сиквеновані. І у дисертації на стор. 283 це підтверджується. Як розуміти таке протиріччя у тексті дисертації?
8. Щодо оформлення дисертації є два загальних порушення. По-перше якщо по всій дисертації застосовується англомовна аббревіатура ТВР, її не слід в окремих пунктах замінити на ТБП. По-друге, коли таблиця переноситься на іншу сторінку, слід дублювати шапку таблиці, а не просто писати «продовження таблиці».

Безумовно, немає нічого простішого, ніж робити зауваження за матеріалами вже зробленого дослідження, адже тепер на нього можна дивитися у цілому і вказувати, що, де і коли зроблено не так. Реальна ж ціна роботи визначається зовсім іншим, а саме: чи була ідея чи поставлені завдання, чи адекватні методи для їхнього виконання, чи зроблений аналіз результатів, що із створеного несе ознаки наукової новизни, що – практичної значущості. І чи можна сформулювати наукову концепцію дослідження, яке виконується як

докторське. На всі ці питання потрібно відповідати стверджено і констатувати, що дисертація справляє позитивне враження справжнього наукового дослідження, результатами якого ми будемо користуватися.

Висновок по дисертації. Дисертацію написано за результатами завершеного експериментального дослідження, націленого на вирішення конкретної наукової проблеми: розробити систему молекулярних маркерів, яка ґрунтується на поліморфізмі за довжиною інтронів у генах, що кодують білки цитоскелету клітин. Дисертаційна робота «Поліморфізм довжини інтронів білків цитоскелету як ефективний інструмент генотипування рослин» є завершеною науковою працею, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567 зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015, № 567 від 27.07.2016, № 943 від 20.11.2019 та № 607 від 15.07.2020, та сучасним вимогам до оформлення дисертацій, затверджених наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40, а її автор Пірко Ярослав Васильович заслуговує на присудження йому наукового ступеню доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика.

Завідувач кафедри біології Факультету
природничих наук Національного
університету «Києво-Могилянська академія»
д.б.н. професор

Т.К. Терновська Терновська Т.К.

