

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу *Пірка Ярослава Васильовича*
«Поліморфізм довжини інтронів генів білків цитоскелету як ефективний
інструмент генотипування рослин»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
із спеціальності 03.00.22 – молекулярна генетика

Актуальність теми. Обов'язковими умовами успішного збереження і використання різних сортів сільськогосподарських культур є ідентифікація і контроль генетичної мінливості, для вивчення яких використовуються різні методи, в тому числі і методи молекулярно-генетичного аналізу. Методи на основі ДНК-маркерів є високоінформативними, добре відтворюються, надійні при встановленні індивідуальних особливостей генотипу, але практично всі мають деякі недоліки. Незважаючи на те, що на даний час налічується більше 15 різних типів маркерів, які використовуються для молекулярно-генетичного аналізу генома рослин та генотипування, актуальним залишається пошук нових маркерних систем, які були б більш зручними, дешевими та ефективними при молекулярно-генетичному аналізі. Отже, *актуальність* теми наукових досліджень не викликає заперечень, так як дисертаційна робота присвячена дослідженню екзон-інтронної структури генів, що кодують цитоскелетні протеїни (α -, β -, γ -тубулін, актин) у рослин, розробці молекулярно-генетичних маркерів для вивчення поліморфізму інтронів та їх подальшого застосування у молекулярно-генетичних дослідженнях, а саме генетичного профілювання (генотипування) окремих генотипів, сортів, популяцій та видів рослин різних таксономічних груп. Здобувачем сформовано 14 завдань, які також є безумовно актуальними. Мета та завдання роботи справляють цілісне враження та є детальним планом для проведення досліджень за темою дисертації.

Зв'язок роботи з державними науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано у відділі геноміки та молекулярної біотехнології та у відділі популяційної генетики Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» у відповідності з тематиками фундаментальних 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» (2012–2016 рр., 0112U001597), «Популяційна біологія і генетика видів деревних рослин на антропогенно трансформованих ландшафтах» (2014–2017 рр., 0112U007760), «Створення молекулярно-генетичних маркерів для диференціації різних генотипів рослин на основі вивчення поліморфізму інтронів генів їх цитоскелетних білків» (2015–2019 рр., 0115U005025).

Оцінка обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій. Дисертація Пірка Я.В. являє собою завершену наукову роботу, яка має всі необхідні елементи: від обґрунтування актуальності та напрямів досліджень до детального аналізу отриманих результатів та висновків. Рукопис дисертації написаний з використанням фахової термінології.

Робота характеризується логічною послідовністю викладення експериментального матеріалу та його аналізу. Достовірність отриманих результатів підтверджується використанням статистичного аналізу даних. Результати проаналізовано автором та порівняно із результатами інших дослідників, описаними у науковій літературі.

Оцінка змісту дисертації та її завершеності. Дисертація складається з таких частин: вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, експериментальної частини (чотири розділи), аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який включає 475 пунктів.

Основний текст викладений логічно на 385 сторінках, проілюстрований 42 таблицями та 124 рисунками.

У розділі «Молекулярно-генетичні маркери у дослідженні генетичного поліморфізму рослин» виконаний аналітичний огляд сучасної наукової літератури, що дозволило автору обґрунтувати актуальність, мету та завдання дисертаційної роботи. Автором охарактеризовано основні типи ДНК-маркерів, їх переваги та недоліки для різних напрямів застосування. Окремий підрозділ присвячено аналізу досліджень щодо поліморфізму довжини інтронів генів.

У розділі «Матеріали ті методи досліджень» детально охарактеризовано рослинний матеріал – колекції сортів, гібридів, зразків, вибірки з природних популяцій. Представлено достатньо широкий спектр методичних підходів. Автор застосовує сучасні біоінформатичні методи та підходи молекулярно-генетичного аналізу.

У розділах 3-6 дисертантом наведено результати експериментальних робіт та їх первинний аналіз. Кожен з етапів роботи автор завершує обговоренням отриманих результатів та проміжними висновками. Проаналізовано існуючі геномні бази даних рослин на наявність послідовностей генів, що кодують α -, β -, γ -тубулін та актин. Досліджено їх екзон-інтронну структуру, здійснено вирівнювання послідовностей з метою отримання консенсусних послідовностей та підбір праймерів до консервативних ділянок геномів, що оточують інтрони генів. Розроблено видоспецифічні і універсальні (що можуть бути використані у дослідженні багатьох видів рослин) вироджені праймери. Доведено, що ДНК-маркерні системи, засновані на оцінці поліморфізму довжини інтронів генів α -, β -, γ -тубуліну та актину, є ефективним та добре відтворюваним інструментом для молекулярно-генетичного аналізу та дослідження генетичної мінливості рослин. Продемонстрована доцільність використання методу оцінки поліморфізму інтронів генів цих цитоскелетних протеїнів для диференціації, ідентифікації,

дослідження генетичного різноманіття рослин на внутрішньосортовому, міжсорттовому, популяційному, видовому та міжвидовому рівнях.

Загальні висновки відображають наукову та практичну значимість дисертації, логічно завершують узагальнення отриманих результатів.

Повнота викладення основних результатів роботи в наукових фахових виданнях. Дисертаційна робота Пірка Я.В. є самостійним оригінальним дослідженням. Роботу апробовано на конференціях міжнародного та національного рівнів. За темою дисертації опубліковано 37 наукових праць, 23 статті – у наукових фахових виданнях, 13 тез доповідей – у матеріалах наукових конференцій. Основні результати дисертації повно викладені в наукових фахових виданнях.

Відповідність змісту автореферату та основних положень дисертації. Зміст та структура автореферату відповідає структурі, основним положенням та висновкам, наведеним в дисертації.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором одержані нові для науки дані та узагальнення. Розроблено нові маркерні системи, що виявляють поліморфізм довжини інтронів генів цитоскелетних протеїнів у різних видів рослин. Вперше оцінено поліморфізм інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину на видовому, популяційному, сорттовому та внутрішньосорттовому рівнях різних таксономічних груп рослин. Вперше за результатами аналізу поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубулінів та актину проведено генетичне профілювання представників господарсько цінних видів рослин - льону-довгунця, рису посівного, пшениці, ячменю, томату, картоплі. Вперше досліджено генетичну мінливість та диференційовано природні популяції егілопсів *Aegilops biuncialis* з Кримського півострову. Показана висока ефективність використання маркерів, що базуються на оцінці поліморфізму інтронів генів цитоскелетних протеїнів у порівнянні з мікросателітними маркерами на прикладі аналізу родів *Linum* L., *Quercus* L., *Ulmus* L. Продемонстровано зручність та надійність застосування

методу ТВР-аналізу для молекулярно-генетичного маркування трав'янистих та деревних рослин, для вивчення окремих аспектів внутрішньовидового поліморфізму господарсько цінних, садово-паркових та лісоутворюючих порід. Вперше отримано специфічні ТВР-профілі мікрородоростей, які дозволили чітко диференціювати генотипи на різних таксономічних рівнях та підтвердити однорідність окремих зразків, що належать до одного штаму.

Практичне значення одержаних результатів. Практичне значення дисертаційної роботи витікає із зроблених автором теоретичних узагальнень. Розроблені маркерні системи, що базуються на аналізі поліморфізму інтронів генів α -, β -, γ -тубуліну, актину, можуть бути застосовані для генотипування різних генотипів, сортів, популяцій, видів рослин при філогенетичних, популяційно-генетичних та селекційно-генетичних дослідженнях. Зокрема, продемонстровано високу диференційну здатність розроблених маркерів на генотипах та видах роду елевсина (*Eleusine*), популяціях егілопсу (*Aegilops biuncialis*), ряду ендемічних рослин, зокрема, *Deschampsia antarctica*, *Achillea glaberrima* Клок. та *Achillea leptophilla* Vieb., що може бути використано для розроблення програм генетичного моніторингу та комплексної охорони видів. Встановлено міжсортівий поліморфізм перспективних олійних сортів та сортозразків рижю української селекції. Практично цінним виявилось застосування ТВР, АВР-аналізу в комбінації з аналізом мікросателітних маркерів для генотипування та генетичної диференціації сортів льону української селекції. Встановлено, що більшість досліджених сортів льону української селекції є генетично гетерогенними. Продемонстровано застосовність ІЛР-маркерних систем для генотипування деревних рослин. Отримано ІЛР-профілі вікових дерев дубу звичайного *Quercus robur*. Ефективність диференціювання генотипів мікрородоростей на різних таксономічних рівнях за допомогою ТВР та сТВР-аналізу свідчить про доцільність використання цих методів у молекулярно-філогенетичних дослідженнях нижчих рослин.

Висловлення ряду побажань і зауважень. Принципових зауважень до дисертаційної роботи немає. Але під час аналізу виникли певні запитання до здобувача.

Немає перекладу використаних скорочень IDSE, ISJ, CISP, PLUG, IT (стор. 28), STS (стор. 29), ILP-Cg (стор. 30).

Надано різні переклади Marker Assisted Selection (MAS): маркер-опосередкований добір (стор. 26), маркер-допоміжна селекція (стор. 41) та подальше використання «MAS-селекція». В перекладі с англійської мови «selection» - це добір.

Не можу погодитись з твердженням, що «довільні ДНК-маркери проектуються випадковим чином» (стор. 45). До їх дизайну висуваються певні вимоги (кількість нуклеотидів, відсоток Г-Ц складу, відсутність димерів та інш.).

Зустрічаються невдалі вирази: «... генів білків рослин, що кодують тубулін...» (стор. 34), «... маркери повинні бути сконцентровані на кількісних характеристиках» (стор. 43), «...площа між праймерами...» (стор. 51), «...площа розподілу ампліконів...» (стор. 235), «...генів..., закодованих в геномах...» (стор. 66).

Що мається на увазі «умови нормальної температури» (стор. 92)?

Щодо рисунків. Надписи на рис. 1.2, 1.3, 1.4, 3.1-3.10, 4.60 мають бути українською мовою, а не англійською. На більшості рисунків з електрофореграмами (рис. 4.1-4.3, 4.6, 4.8, 4.9 ... 4.49) не вказано, який саме маркер молекулярної маси використано. На рис. 4.36, 4.39, 4.53, 4.54, 4.58, 4.59 немає розшифровок абревіатур. Вони є в тексті, але рисунки мають бути самодостатніми. Однакові рисунки 3.39 (стор. 141) та 6.1 (стор. 293) – схема зображення місць відпалу вироджених праймерів. Не зрозуміло, навіщо їх дублювання.

Вказано, що в ПЛР використовували 50 нг ДНК (стор. 93). І це незалежно від виду рослин. Але розмір їх геномів різний. Як це враховували? Чи кількість вихідної матриці була достатньою?

Дублювання інформації в таблиці 2.8 і в тексті щодо температури відпалу праймерів.

Наведені умови ПЛР на стор. 93 та стор. 97 однакові. Тому достатньо було б вказати їх один раз.

Кількість нуклеотидів для праймерів в табл. 2.11 виражена в парах нуклеотидів, але праймери – це фрагменти одноланцюгової нуклеїнової кислоти.

В розділі з результатами біоінформатичних досліджень замість виразу «На сьогодні...» щодо кількості послідовностей в базах бажано використовувати «Станом на...» або «Дата пошуку...», так як кількість може змінитися через певний час.

Деякі підрозділи власних досліджень перевантажені інформацією, яку можна було б надати в огляді літератури (особливо підрозділ 4.3.3) або така інформація вже є в огляді (наприклад, обґрунтування доцільності використання маркерів). Але для деяких випадків, можливо, таке подання більш зручно для розуміння отриманих результатів.

Чи відома локалізація аналізованих мікросателітних локусів льону-довгунця (lu1, lu7, lu21, lu25) та їх розташування відносно генів, що кодують протеїни цитоскелету?

Чому для оцінки «генетичного поліморфізму» та «внутрішньосортового поліморфізму» льону обрано локуси lu1 і lu25 (стор. 205), а для аналізу «внутрішньовидової мінливості сортів» - локуси lu7 і lu21?

Сформовані зауваження не зменшують наукової та практичної цінності роботи, а наведені запитання мають, в тому числі, й дискусійний характер.

Загальний висновок. Таким чином, дисертаційна робота Пірка Ярослава Васильовича «Поліморфізм довжини інтронів генів білків цитоскелету як ефективний інструмент генотипування рослин», являє собою закінчену науково-дослідну роботу, в якій за результатами дослідження екзон-інтронної структури генів, що кодують цитоскелетні протеїни (α -, β -, γ -тубулін, актин) у рослин, розроблено молекулярно-генетичні маркери для застосування в генетиці та селекції рослин різних таксономічних груп.

На підставі проведеного аналізу вважаю, що за своєю актуальністю, обсягом проведених досліджень, новизною, достовірністю отриманих результатів, обґрунтованістю висновків дисертаційна робота Поліморфізм довжини інтронів генів білків цитоскелету як ефективний інструмент генотипування рослин» відповідає вимогам до докторських дисертацій, а її автор Пірка Ярослава Васильовича заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика.

Офіційний опонент
доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
заступник керівника відділу
молекулярної генетики та фітосанітарної експертизи
ТОВ «Україна Котекна Лімітед»



Н.Е. Волкова

30.04.2021 р.

Підпис Волкової Н.Е. засвідчую.



Директор з кадрів *Арадаракі В. І.*
30.04.2021