

ВІДГУК

на дисертаційну роботу **КУЛІБАБИ Романа Олександровича**
«Теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер-асоційованої
селекції українських локальних порід курей», представлену на здобуття
наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю
03.00.15 – генетика.

У практиці світового птахівництва використання досягнень маркерної та геномної селекції вже відноситься до невід'ємних компонентів науково-технічного прогресу. У вітчизняному птахівництві роботи, присвячені використанню сучасних досягнень молекулярної генетики, представлені лише у вигляді поодиноких, окремих досліджень, проведених, за рідкісним винятком, на комерційних породах курей. Переважна більшість робіт з визначення генетичних особливостей локальних порід та ліній курей української селекції охоплює лише питання стосовно біохімічного поліморфізму, імуногенетики, а також варіації прояву продуктивних ознак, тобто, фенотипного прояву в цілому. Як відомо, фенотипова оцінка рівня генетичної мінливості, не може повною мірою відобразити істинну картину, що обмежує селекцію українських локальних порід курей. Тому необхідність використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP, Indel, SSR) які значно розширюють можливості питання контролю походження, лінійної належності птиці, визначення загальних генетико-популяційних параметрів дослідних ліній та нарешті маркер-асоційованої селекції українських локальних порід курей мають суттєве теоретичне та практичне значення і безумовно є актуальними.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із вступу, загальної характеристики роботи, семи розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. На початку роботи наведено анотацію українською та англійською

мовами і перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів.

Текст зі списком літератури (482 джерела), ілюстраціями (61 рисунок, 63 таблиці, 9 додатків) викладено на 374 сторінках машинопису.

У вступі коротко аналізується стан і необхідність сучасних молекулярно-генетичних досліджень для селекції, фундаментальних досліджень і сільськогосподарської практики, коротко обґрунтовується актуальність проведеного автором дослідження.

У розділі «Загальна характеристика роботи» на високому професійному рівні обґрунтовується актуальність роботи (теми); зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами; наведено мету і завдання дослідження; дуже коротко охарактеризовано використані методи досліджень (дано коротке визначення використаних об'єкта, предмета та методів дослідження); викладено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, узагальнені дані про апробацію результатів дисертації та публікації, обсяг та структуру дисертації.

Розділ 1 – це огляд літератури, в якому висвітлено сучасний стан птахівництва та використання маркер-асоційованої селекція (MAS), обговоренні питання щодо класифікації ДНК-маркерів що базуються на використанні ПЛП, а саме: RAPD, SCAR, ISSR, SSR, SNP, PCR-RFLP, Indel. Також у цьому розділі описаний функціональний поліморфізм генів, що пов'язані з проявом господарсько-корисних ознак курей і досить детально та критично проаналізовано опубліковані результати досліджень. Узагальнюючи аналіз викладених літературних даних, автор у кінці даного розділу робить обґрунтування напряму власних досліджень.

Огляд літератури є достатньо аналітичним, містить цікаві узагальнення, в ньому достатньо повно висвітлено останні експериментальні дані з питань, що мають відношення до теми дисертації. Підсумовуючи відмічене, слід підкреслити, що у цілому огляд свідчить про ґрунтовні знання автором

сучасного стану в обраній галузі досліджень, критичне відношення до опублікованих результатів, здатність вичленувати і узагальнити головне з масиву розрізнених літературних відомостей, чітко викласти стан та перспективи досліджень, а також коротко і зрозуміло обґрунтувати актуальність, роль та значення власного дослідження у контексті накопичених світовою наукою знань та сучасних викликів.

У розділі 2 “Матеріали і методи досліджень” чітко та ясно охарактеризовано вихідний тваринний матеріал використаний для проведення досліджень: кури яєчного напрямку продуктивності – лінія А породи бірківська барвистая (n=500), лінія 14 породи полтавська глиняста (n=380), лінія 38 породи род-айленд червоний (n=180), лінія Г-2 породи плімутрок білий (n=400). Загальна схема досліджень вдало описує етапи роботи. Відбір біологічного матеріалу для проведення ДНК-типування, методи виділення ДНК з біологічного матеріалу та ефективність виділення ДНК за допомогою електрофорезу викладено також чітко та ясно. В тексті є усі нуклеотидні послідовності праймерів використані у роботі. У підрозділі «Методи статистичної обробки результатів досліджень» приведені формули за якими виконані розрахунки.

У розділі 3 дисертаційної роботи наведено результати власних досліджень автора, з оптимізації техніки ДНК-типування та проведено їх детальне обговорення шляхом висування різних гіпотез та їх спростування чи підтвердження у експерименті, що на мою думку позитивно характеризує дисертанта. Цей розділ складається з двох підрозділів. У підрозділі 3.1 «Аналіз конформаційних артефактів ПЛР при вивченні мікросателітної мінливості» автор припускає, що за умов відносно низьких концентрацій ампліфікованої ДНК відбувається утворення переважно цільових фрагментів (лінійної гомодуплексної ДНК), у випадку ж, коли концентрація ампліфікованої ДНК перевищує визначене порогове значення, комплементарні взаємодії ланцюгів упродовж всієї дуплексної молекули порушуються, що й призводить до утворення нелінійної гомодуплексної

ДНК. За результатами проведених досліджень Р.О. Кулібаба стверджує, що при ампліфікації SSR-локусів основним типом артефактів ПЛР, що мають близьку до цільових фрагментів електрофоретичну рухливість, є «нелінійні» гомодуплекси (НГД). Цілком зрозуміло, чому виходячи із стандартних (не денатуруючих, нативних) умов проведення електрофорезу, визначати алельний профіль досліджуваних зразків слід лише на підставі повної картини мікросателітної мінливості за конкретним локусом у межах популяції, що вивчається і на власному досвіті визначає, що швидкість міграції додаткових фрагментів (НГД) нижче цільових і робить висновок: «За основу необхідно брати лише нижню пару ампліконів. При цьому необхідно контролювати положення верхнього фрагменту цієї пари (більш важкого), який повинен заходитися у межах міграції найважчого (найдовшого) мікросателіту для цього локусу. Як додаткового критерію для прийняття правильного рішення у випадку гетерозигот можна використовувати аналіз профілю гетеродуплексів, які мають більш низьку електрофоретичну рухливість. У суперечливих ситуаціях, а також при аналізі одиничного зразку, варто провести повторну ампліфікацію вирізаних із гелю фрагментів». На мою думку, причина яка вимусила дисертанта проводити генотипувати без проведення денатуруючого гель-електрофорезу полягає катастрофічно низькому рівні фінансуванні наукових досліджень в Україні.

У підрозділі 3.2. «Гетеродуплексний аналіз поліморфізму цільових генів» дисертант також побудував викладення шляхом висування різних гіпотез та їх спростування чи підтвердження у експерименті та провів порівняльний аналіз публікацій інших авторів в яких артефакти полімеразної ланцюгової реакції, зокрема гетеродуплекси, привели до невірних висновків та помилок генотипування. У результаті, Р.О. Кулібаба переконливо довів природу утворення артефактів при генотипування особин за PCR-RFLP та Indel-маркерами.

Позитивним є те, що викладені у даному розділі результати, автор активно використовував у своїх подальших експериментальних дослідженнях.

У наступних розділах викладені результати дослідження популяцій курей різних порід. Розділ 4. Мікросателітна мінливість у популяціях курей різних порід української селекції містить **три підрозділи: 4.1** Мікросателітна мінливість у популяціях курей різних порід ячного та комбінованого напрямів продуктивності, **4.2** Генетична диференціація різних субпопуляцій українських м'ясо-яєчних курей та **4.3** Генетична диференціація популяцій курей ліній 02 та 38 породи род-айленд червоний. Як результат досліджень Р.О. Кулібабою встановлено, що загальна кількість алелів за всіма локусами становила 66. У процесі аналізу показників F-статистики (F_{st}) виявлено, що дослідні популяції характеризуються значною дивергенцією (19,5 % загальної генетичної мінливості розподілено між породами, в той час як 80,5 % припадає на внутрішньопорідну складову). За значеннями генетичних дистанцій за Nei встановлено, що породи плімутрок білий та род-айленд червоний характеризуються найбільшими генетичними відмінностями (65,9 % відмінностей), у той час як плімутрок білий та полтавська глиняста – найменшими (32,3 %). Між породами яєчно-м'ясного напрямку продуктивності (полтавська глиняста та род-айленд червоний) виявлено 35,9 % відмінностей. У яєчних курей породи бірківська барвиста найбільша відмінність відмічена з породою род-айленд червоний (58,8 %). Загальний алелофонд дослідних субпопуляцій м'ясо-яєчних курей за обраними локусами представлений 38 алелями, для ліній род-айленду червоного – 29. У субпопуляції Г-4 виявлено найменшу кількість алелів за всіма локусами (30), найбільшу – у субпопуляції Г-2 (35). Що до породи род-айленд червоний – у лінії 02 визначено 29 алелів; в лінії 38 – 28. Найменше генетичне різноманіття за кількістю алелів на локус серед усіх досліджених популяцій курей характерне для маркеру ADL0278 (3 алеля на локус), найбільше – для MCW104 (6,4 алеля на локус) у випадку м'ясо-яєчних курей; LEI0094 та

MCW0081 (2 алеля на локус) і MCW104 (7 алелів на локус) для род-айленду червоного, відповідно. За результатами розрахунків генетичних дистанцій автором з'ясовано, що найбільш генетично розділеними є субпопуляції Г-1 та Г-4 (28,8 % відмінностей), в той час як субпопуляції Г-2 та Г-3 максимально подібні серед усіх дослідних груп м'ясо-яєчних курей (13,3 % відмінностей). У свою чергу між лініями 02 та 38 породи род-айленд червоний виявлено 7,9 % відмінностей. Досліджена дисертантом мікросателітна мінливість у популяціях курей різних порід української селекції внесла значний внесок до вивчення генетичних характеристик дослідних популяцій, що цілком відповідає задачі збереження унікальних генетичних ресурсів та паспортизації існуючих порід. У цілому було використано сучасні методи, за допомогою яких отримано коректні результати, адекватні стосовно поставлених задач дослідження.

Розділ 5. Поліморфізм локусів кількісних ознак у популяціях курей української селекції найбільш об'ємний і складається із 15 підрозділів. Для дослідження Indel та однонуклеотидних поліморфізмів, окрім одного, Р.О. Кулібаба використав вже раніше описані методики їх визначення. Для аналізу нуклеотидної послідовності четвертого інтрону гену гормону росту курей у якій дисертант визначив нову мутацію в сайті пізнавання *Alu I* (транзиція С→Т у положенні Chr27:1788455), розроблена структура олігонуклеотидних праймери, що фланкують фрагмент четвертого інтрону розміром 460 п.н.

На основі отриманих даних щодо різних поліморфних локусів дисертантом встановлені частоти алелей та генотипів, були розраховані генетичні дистанції між дослідними лініями курей різних напрямів продуктивності. Найбільш віддаленими між собою виявилися породи бірківська барвиста та род-айленд червоний (у середньому 24,9 % відмінностей). Відмінності між породами курей м'ясо-яєчного та яєчно-м'ясного напрямку продуктивності за дослідженими поліморфізмами виявилися не значними. Максимальні відміни спостерігались між породами

полтавська глиняста та плімуток білий (11,2%), мінімальні – між род-айлендом червоним та плімутроком білим (4,2%).

На основі отриманих результатів досліджень щодо генетичної структури дослідних популяцій курей автор робить висновок, що співвідношення значень показників гетерозиготності в кожній із дослідних популяцій курей є достатньо варіабельними за більшою частиною вивчених маркерів. Відсутність відмінностей у популяції курей породи род-айленд червоний, так й незначні відхилення в усіх інших лініях, вказує на недостатню виражену дію добору, а суттєвих змін генетичної структури популяцій не відбувається. Аналізуючи результати інших авторів Р.О. Кулібаба погоджується з відсутністю активних формоутворюючих процесів у популяціях м'ясо-яєчних курей.

Цікавим та насиченим результатами експериментальних досліджень є розділ 6 присвячений аналізу зв'язку поліморфних локусів із господарсько-корисними ознаками курей різних порід та напрямів продуктивності. У цьому розділі дисертаційної роботи Р.О. Кулібабою приведений аналіз зв'язку алельних варіантів різних генів з показниками продуктивності курей порід бірківська барвіста, полтавська глиняста та род-айленд червоний.

За результатами проведених досліджень дисертантом встановлено, що найбільш виражений ефект на показники м'ясної продуктивності курей породи полтавська глиняста мали алелі генів рецептору гормону росту (HindIII-поліморфізм у 2 інтроні); інсуліноподібного ростового фактору I (HinfI-поліморфізм у промоторній ділянці); гормону росту (SacI- та AluI- поліморфізм у четвертому інтроні); гіпофізарного фактору транскрипції 1 та трансформуючого ростового фактору $\beta 1$. За винятком гену гормону росту (за обома поліморфізмами) за всіма вивченими локусами встановлено перевагу за показниками продуктивності гомозиготних особин. Більші значення показників продуктивності гетерозигот у випадку гену гормону росту автор пояснює відсутністю відповідних гомозиготних особин у кількості, що є достатньою для проведення порівняльного аналізу. Також відмічає

гемізіготний характер локусу рецептору гормону росту, що визначає відсутність гетерозиготних особин у самиць птиці.

За результатами проведених досліджень, Р.О. Кулібабою встановлено, що найбільш виражений ефект на показники кількості яєць за 12 та 40 тижнів продуктивності курей породи род-айленд червоний надали алелі пролактину (інсерція у 24 п.н. у промоторній ділянці, SNP у положенні -2402); інсуліноподібного ростового фактору I (PstI-поліморфізм у 5'UTR); трансформуючого ростового фактору $\beta 2$ та гену Mx (на рівні тенденції). У свою чергу з показниками маси яйця на 30 та 52 тижні життя виявились пов'язані алелі пролактину (інсерція у 24 п.н. у промоторній ділянці; SNP в положенні -2402); трансформуючого ростового фактору $\beta 3$ та гену Mx.

Важливо на мою думку, що Р.О. Кулібаба приводить об'єктивні результати досліджень, які встановили відсутність вірогідних відмінностей між особинами різних генотипів за локусами гіпофізарного фактору транскрипції 1 та трансформуючого ростового фактору $\beta 1$. За генотипами гену Mx (AG та GG) істотних різниць за дослідженими показниками не відмічено. Результати досліджень генетичної структури дослідних популяцій курей за використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів, а також аналіз зв'язку виявлених поліморфних локусів з господарсько-корисними ознаками курей яєчного та комбінованого напрямів продуктивності надали змогу дисертанту розробити й апробувати загальну схему комплексної системи використання маркер-асоційованої селекції у сучасному птахівництві України.

Обґрунтовано загальні принципи, послідовне використання яких дає змогу проводити генетичний моніторинг в процесі створення нових ліній птиці, здійснювати контроль динаміки генетичної структури популяцій, визначати чистоту лінійного розведення птиці, оцінювати особин для підбора пар для схрещувань з метою отримання мікроліній із заданими комплексами генотипів на основі поліморфізму локусів кількісних ознак для яєчного, м'ясного чи комбінованого напрямків продуктивності птиці.

Важливим і цікавим є розділ 7 «Аналіз і узагальнення результатів досліджень» Це досить детальний, усесторонній, глибокий і, разом з тим, лаконічний узагальнюючий аналіз результатів досліджень з широким залученням літературних даних. Узагальнюючи отримані результати, автор приводе загальні принципи, послідовне використання яких дає змогу проводити генетичний моніторинг в процесі створення нових ліній птиці, здійснювати контроль динаміки генетичної структури популяцій, визначати чистоту лінійного розведення птиці, оцінювати особин для підбора пар для схрещувань з метою отримання мікроліній із заданими комплексами генотипів на основі поліморфізму локусів кількісних ознак для яєчного, м'ясного чи комбінованого напрямків продуктивності птиці. Ці принципи оформлені у логічну схему комплексної системи використання різних типів молекулярно-генетичних маркерів (PCR-RFLP, Indel, SSR) у маркер-асоційованій селекції курей локальних порід української селекції.

За результатами проведених досліджень Р.О. Кулібаба вивів формули бажаних комплексних генотипів для порід різного напрямку продуктивності.

Напрямок яєчної продуктивності: $PRL^{II} PRL^{CC} GH1 (MspI)^{BB} GH4 (MspI)^{CC} TGF-\beta 1^{FF} TGF-\beta 3^{LL} Mx^{GG}$.

Для курей породи полтавська глиняста лінії 14 у напрямі яєчної продуктивності: $PRL^{CC} GHR (HindIII)^{B0} GH (SacI)^{AB} IGF-I (HinfI)^{CC} TGF-\beta 1^{FF} TGF-\beta 2^{LL} TGF-\beta 3^{BB}$.

У напрямі м'ясної продуктивності: $GH4 (SacI)^{AB} GHR (HindIII)^{B0} IGF-I (HinfI)^{CC} PIT-1^{DD} TGF-\beta 1^{FF}$.

Для курей породи род-айленд червоний лінії 38 у напрямі яєчної продуктивності: $PRL^{ID} PRL^{CT} IGF-I (PstI)^{C1C2} TGF-\beta 2^{BL} TGF-\beta 3^{LL} Mx^{AG}$.

Напрямок м'ясної продуктивності: $GH1 (MspI)^{AA} GH4 (MspI)^{CC} GH4 (AluI)^{TT} TGF-\beta 2^{BB} TGF-\beta 3^{BB}$.

Окрім питань маркер-асоційованій селекції птиці дисертант підкреслює необхідність всебічного генетичного аналізу, зокрема із залученням мікросателітних маркерів, які дають значні можливості у питаннях контролю

походження, лінійної належності птиці, а також для визначення загальних генетико-популяційних параметрів дослідних ліній. Цілком обґрунтовано автор робить висновок, що використання наявного комплексу різних ДНК-маркерів дає змогу успішно виконувати як генетичний моніторинг за проведенням селекційної роботи, так й оцінку мікроеволюційних процесів у дослідних популяціях.

У цілому експериментальний матеріал викладено доступною мовою, чітко і логічно, основні результати достатньо підтверджено оригінальними ілюстраціями, зокрема, фотографіями та схемами. У процесі викладу автор ретельно і критично аналізує власні результати, робить у процесі опису коректні заключення та підсумки. Обговорення та узагальнення проведено чітко, на високому професійному рівні, із залученням літературних даних по всьому тексту дисертації, воно свідчить про те, що автор своїм дослідженням зробив істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі генетики та генетичних основ селекції курей. Пріоритет власних результатів розроблено спосіб контролю денатурації ДНК під час електрофорезу у денатуруючих поліакриламідних гелях захищено патентом України на корисну модель № 123147.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно випливають з експериментальних даних. Вони викладені досить чітко, лаконічно та ясно.

Пропозиції виробництву стосуються в основному лабораторій з генетики та молекулярної діагностики, які за браком коштів на мають можливості виконувати генотипування за мікросателітними локусами на сучасному обладнанні. Пропозиція формувати групи курей за комплексними генотипами логічна та витікає з результатів досліджень.

Суттєвих зауважень щодо наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. Проте не можу не відмітити наступного:

1. При тлумаченні методу DHPLC бажано вживати назву методу аналізу не «Денатуруюча високоефективна рідка хроматографія (DHPLC)», а «Денатуруюча високоефективна рідинна хроматографія».

2. Породу курей полтавська глиняста невдало називати «полтавські кури» у такому контексті, як: «У полтавських курей алель F...», «Так, для полтавських курей гомозиготні за алелем L...».

3. Поряд використовують термін «Показник **розрахункової** гетерозиготності» та «**Очікуваний** рівень гетерозиготності». Для терміну надлишок гетерозиготних особин використано термін «ексцес» гетерозиготних особин. В цьому разі можливо очікувати замість нестачі гетерозиготних особин – «редукшен» гетерозиготних особин. При визначенні дослідних популяції курей як **штучних**, доцільно використати поняття **синтетичних**, або **комполитних**.

4. У розділі «Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів», а також у тексті не розшифровано скорочення *GH1* (MspI) та *GH4* (MspI), хоча можна здогадатися, що мова йдеться про перший та четвертий інтрон гена гормону росту (*GH*) курей. Також це скорочення не зовсім вдале через те, що існує декілька генів гормону роста – ген *GH2*, який експресується в плаценті та ген *GH1*.

5. Не на усіх представлених електрофореграмах продуктів ампліфікації мікросателітних локусів зрозуміло які розміри фрагментів ДНК зображено на рисунку, зокрема тому, що маркер M-200 представлено тільки одним фрагментом 200 п.н., що ускладнює аналіз результатів. Це також вимушує дисертанта уникати зазначення кількості повторів досліджених алелів локусу MCW0104, вказуючи, що наприклад цей алель містить найменшу кількість повторів.

6. На електрофореграмах продуктів ампліфікації мікросателітних локусів не вказано, де на думку дисертанта «лінійний» гомодуплекс, а де «нелінійний» гомодуплекс, що також ускладнює сприйняття тексту.

7. Недостатньо приділено уваги порівнянню власних даних отриманих у ході виконання дисертаційної роботи з опублікованими даними інших дослідників, особливо курей породи полтавська глиняста, яка добре досліджена у роботах M.N.Romanov, J.Hillel, S. Weigend, I.G.Moiseyeva. Дисертант обмежується зауваженням, що подібні дослідження виявилися досить схожими.

8. Опис підрозділу «Проведення електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації/рестрикції» утиснуто у 7 рядків і відповідно не містить таких критичних для методу параметрів, як співвідношення акриламід у та бісакриламід, молярність сечовини у гелі, спосіб готування зразків ДНК для нанесення на гель, об'єм зразків, спосіб нанесення зразків на гель, у якому електрофорезному буфері та за яких умов проводили електрофорез. Для агарозних гелів критичним є тип агарози. Бажано було б також привести методіку сріблення гелів з зазначенням фарбування на склі, чи у розчині (особливо цікаво для 4% ПААГ).

9. У тексті бажано вказувати яку саме генетичну дистанцію Nei було використано: D_M , D_S чи D_A .

10. Дисертант відмічає, як імовірно «що петлеві фрагменти можуть бути різного розміру та міститися у різних ділянках мікросателітного повтору, що ймовірно пов'язано зі структурою основного мотиву та загальною кількістю повторів». Між тим, нуклеотидна послідовність цього локусу доступна в базі NCBI, код доступу CHKMCW104 (LOCUS CHKMCW104 450 bp DNA linear VRT 14-NOV-1995, DEFINITION *Gallus domesticus* DNA microsatellite marker MCW104) і з аналізу первинної нуклеотидної послідовності видно, що алель який містить найменшу кількість повторів має структуру $(ca)_5tacacgtacg(ca)_3$. Взагалі, ні для мікросателітних локусів ні для генів у яких досліджували PCR-RFLP та Indel маркери не зазначено коди доступу баз даних первинних нуклеотидних послідовностей NCBI.

11. Поліморфізм гену *TGF-β2* у людини вивчено набагато більше ніж у птиці і на промоторній ділянці знайдено безліч одонуклеотидних поліморфізмів. Що дає Вам впевненість очікувати, що на ампліфікованому фрагменті гена *TGF-β2* знаходиться тільки один поліморфізм -640T>C і тільки цей поліморфізм утворює петлю?

12. Оскільки під гаплотипом розуміють поліморфізми локалізовані на одній хромосомі стає питання, як визначали гаплотип особини за локусом IGF-I (*Pst* I + *Hinf* I-поліморфізми) у випадку гетерозиготності особин C₁C₂AC і як у цьому випадку порівнювали розподіл частот гаплотипів та виявляти закономірності?

13. Аналіз результатів досліджень *Msp* I-поліморфізму в четвертому інтроні гена гормону росту приведених у дисертаційній роботі та аналіз первинної нуклеотидної послідовності (код доступу: CHKGHG), вказують, що на ділянці яка ампліфікується у ПЛР з використанням олігонуклеотидних праймерів ctaaaggacctggaagaaggg таaactgtcgtaggtgggtctg є не один, а два поліморфні *Msp* I-сайти g.2897T>G та g.2999C>T. Це твердження підтримує: по перше, можливість при гідролізі продукту ПЛР розміром 1164 (~1200) п.н. утворення двох рестриктних фрагментів розміром 683(~700) п.н. і 481(~500) п.н. або 586(~600) п.н. і 579(~600) п.н. По друге результати секвенування, що визначили нуклеотидні послідовності які фланкують поліморфні сайти *Msp* I: aaagcaggcctggg та gcagttgagc і які дозволяють чітко ідентифікувати їх на послідовності гена гормону росту (код доступу: CHKGHG). Якщо погодитись з таким аналізом результатів, то при наявності двох сайтів пізнавання *Msp* I в позиціях 2895-2898 та 2998-3001 може утворюватися ще один рестриктний фрагмент розміром 104(~100) п.н. Це дозволяє припустити існування ще одного алелю 481(~500) п.н. 104(~100) п.н. і 579(~600). Оскільки експериментально серед дослідженої вибірки птиці цей алель виявлено не було, то на кінцеві висновки дисертаційної роботи це не вплинуло.

14. Не можу погодитися з твердженням дисертанта, що: «повсюдне використання електрофорезу в денатуруючому ПААГ не є панацеєю, а навпаки, найчастіше слугує джерелом значної кількості помилок». Як відомо денатуруючий ПААГ при електрофорезі STR локусів на пластинах та капілярах широко використовується у криміналістиці та судовій медицині. Результати таких досліджень приводяться у кримінальних та цивільних справах як докази і пильно вивчаються суддями, адвокатами і консультантами-фахівцями з молекулярної генетики. За таких умов наявність артефактів недопустима. Що стосується генетики тварин, то артефакти не допускаються через періодичну процедуру порівняльних тестів, що проводиться під егідою Міжнародного товариства генетики тварин (ISAG).

15. Також у мене є зауваження до твердження дисертанта: «що утворення статерів – процес імовірнісний та трапляється далеко не при кожній ампліфікації. В процесі вивчення генетичної структури популяції курей української селекції (4 породи за сукупністю мікросателітних локусів) ми лише один раз виявили утворення статерів при проведенні полімеразної ланцюгової реакції (локус MCW0104)». З мого власного досвіту та численних опублікованих фото гелів (наприклад, протокол Promega GenePrint™ STR Multiplexes for Silver Stain Detection) видно, що утворення статерів процес звичайний, а відсутність статерних смуг на гелях у роботі дисертанта пов'язана з особливістю обладнання. Зменшити або усунути появу статорних смуг можливо з використанням *Pfu* ДНК-полімерази, яка на відміну від *Taq* ДНК-полімерази має 3'-5' екзонуклеаза-корегуючу активність та видаляє нуклеотиди, хибно введені на 3' кінці та як видно з матеріалів і методів. Нажаль, з тексту дисертації невідомо, яку саме полімеразу було використано при дослідженні мікросателітних маркерів. На мою думку, твердження дисертанта, що «артефакти, у випадку утворення статерів, є, по суті, гетеродуплексною ДНК, тобто гібридною молекулою» викликано невірним визначенням «статер». Під поняттям «статер» розуміють ДНК фрагменти з кратно меншими на повторами, які абсолютно вірно дисертант називає SI-

DNA (Slipped Intermediates DNA). Якщо використати термін «конформаційний» артефакт та визначати ним фрагменти ДНК які рухаються у гелі повільніше ніж справжні алелі, то усі висновки дисертанта відносно їх природи та механізмів їх утворення можуть бути вірними.

Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами і їх впровадженням, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота «Теоретичне обґрунтування та практична реалізація маркер-асоційованої селекції українських локальних порід курей», заслуговує позитивної оцінки. Вона відповідає сучасному рівню генетичних досліджень і вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №657 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор – **Кулібаба Роман Олександрович** заслуговує присудження йому пошукового наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді 51 наукової праці, з них 21 статей у фахових виданнях у галузі сільськогосподарських наук, 11 статей у виданнях, що включені до міжнародних наукометричних баз даних, є патент України на корисну модель, методичні рекомендації.

Зав. лабораторією генетики

Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН України,
доктор сільськогосподарських наук *К.Ф. Почерняєв* К.Ф. Почерняєв

Підпис *К. Ф. Почерняєв*
ЗАСВІДЧУЮ:
Учений секретар Інституту свинарства
і агропромислового
виробництва НААН *М. О. Гусенко*
20 р.

