

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Шельова Андрія Володимировича «ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНЕТИЧНИХ РЕСУРСІВ ТВАРИН ЗА МІКРОСАТЕЛІТНИМИ ЛОКУСАМИ ДНК», представлена на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми дисертаційної роботи. Сучасні ДНК-технології – абсолютний та безумовний тренд двох останніх десятиріч’я розвитку генетики як науки. Грунтуючись на фундаментальних поняттях науки про живе, виступаючи в якості необхідної теоретичної основи еволюційної теорії, генетика дала дослідникам також і непревершений інструментарій для вирішення різних практичних завдань тваринництва – технологію молекулярно-генетичних маркерів. Використання даної технології дало змогу проводити селекцію тварин безпосередньо на рівні спадкового матеріалу (MAS), що, врешті решт, й послужило запорукою успіху племінної роботи в самих різних галузях тваринництва. Поряд з цим, важливі питання, також, вирішуються і з позицій широкомасштабних досліджень однієї з найбільш важливих характеристик живого – мінливості. Для оцінки рівня генетичної мінливості на рівні ДНК, аналіз якої лежить в основі популяційної біології, використовуються різноманітні молекулярно-генетичні маркери, найбільш перспективними з яких (у даному контексті) є мікросателіти.

Як правило, мікросателіти характеризуються високим рівнем поліморфності в порівнянні з іншими типами ДНК-маркерів. Кількість алелів на локус може досягати декількох десятків, що забезпечується унікальними якостями мікросателітних маркерів – феноменом мікросателітної нестабільності. Наявність значної кількості алелів на локус (свого роду роздільна здатність) дає потенційну можливість масштабного використання мікросателітів в якості інструменту дослідження генетичної мінливості в популяціях різних видів тварин. Більш того,

типування особин за сукупністю мікросателітів – ефективний інструмент для ідентифікації та контролю походження, що має особливе значення в контексті племінної роботи. Аналіз параметрів генетичної мінливості – ключ до розуміння мікроеволюційних процесів у популяціях, що має особливу цінність на тлі критичної важливості питання про збереження генофонду та оцінки біорізноманіття.

Саме вирішенню актуальних і своєчасних питань теоретичного обґрунтування та експериментального відпрацювання системи використання мікросателітних локусів з метою оцінки і прогнозування мікроеволюційних процесів у популяціях тварин різних видів у рамках програм збереження біорізноманіття і присвячена дана дисертаційна робота.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у розробці теоретичних зasad, науковому обґрунтуванні та апробації комплексної системи оцінювання поліморфізму мікросателітних локусів ДНК у представників різних таксономічних груп та рівнях організації геному (алельному, генотиповому, популяційному). За результатами проведених досліджень автором встановлено особливості мікросателітної мінливості у дослідних популяціях тварин на внутрішньовидовому та міжвидовому рівнях, визначено адекватність різних моделей математичного аналізу та оцінки генетичної ситуації. Вперше оцінено інформативність мікросателітних маркерів для різних видів та окремих українських порід свійських тварин залежно від структурних особливостей нуклеотидних послідовностей. Розроблено та оптимізовано технологію мультиплексного генотипування особин різних видів свійських тварин за сукупністю SSR-маркерів.

Практичне значення роботи. У дисертаційній роботі запропоновано новий комплексний підхід на індивідуальному і популяційному рівнях прогнозування та оцінки мікроеволюційних процесів у популяціях свійських видів тварин за поліморфізмом мікросателітних локусів ДНК, що дає можливість генетичного контролю формування генофондів різних таксономічних одиниць в селекції та системі збереження генетичного біорізноманіття. Одержано нові дані щодо рівня поліморфізму геному окремих порід та видів свійських тварин за мікросателітними

локусами ДНК. Оцінено можливість їх використання для оцінки генетичного різноманіття тварин.

Розроблено методичні підходи щодо використання мікросателітних локусів для оцінки генетичної ситуації в популяціях різних порід і видів свійських тварин, що має суттєве значення у контексті проведення постійного генетичного моніторингу відповідно до міжнародної програми «Глобального плану дій щодо збереження, підтримання та розвитку генетичних ресурсів тварин» під егідою FAO та «Конвенції про охорону біологічного різноманіття». Рекомендовано у практичній роботі лабораторій з генетики та молекулярної діагностики використання комплексних мультиплексних реакцій для підвищення ефективності генотипування за мікросателітними локусами, що дозволяє суттєво зменшити час та собівартість досліджень.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дослідження проведені на сучасному науковому рівні за використання достатньої для статистичної обробки кількості тварин різних видів (всього проаналізовано 4 види, 9 порід та 5 кросів загальною кількістю 901 голова). Для кожного виду тварин використано достатню (для генетико-популяційних досліджень) кількість різних мікросателітних маркерів – для великою рогатої худоби десять; для свійських коней – одинадцять; для свійських собак – п'ять; для свійської курки – п'ять. Якість досліджень підтверджено розробленою методикою та схемою наукових дослідів, адекватністю використаного статистичного апарату із залученням відповідного програмного забезпечення (GenALEX, PAST, MICROSATELLITE ANALYSER, GENEPOP, STRUCTURE, FSTAT та інші). Об'єкт і предмет досліджень обрані вірно і коректно, чітко сформульовані. Розділи дисертаційної роботи органічно пов'язані та викладені у логічній послідовності. Висновки та пропозиції виробництву повністю відображають поставлені мету та завдання досліджень та у повному обсязі відповідають отриманому експериментальному матеріалу.

Структура для обсяг дисертаційної роботи. Дисертаційна робота оформлена відповідно до чинних вимог та складається з усіх необхідних розділів:

анотації українською та англійською мовами, зміст, перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів, вступ, огляд літератури, загальна методика та основні методи досліджень, результати власних експериментальних досліджень (шість розділів), висновки, рекомендації виробництву, список використаних джерел, додатки (4 шт.). Загальний обсяг дисертаційної роботи становить 396 сторінок. Робота містить 120 таблиць та 106 рисунків. Список використовуваних джерел представлений 697 найменувань, з яких 549 – латиницею.

Повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи в опублікованих працях. Матеріали дисертаційної роботи за результатами досліджень неодноразово доповідалися на численних міжнародних науково-практических конференціях. Основні положення достатньо представлені у 39 наукових працях, серед яких опубліковано у фахових виданнях України – 19, у виданнях іноземних держав або у виданнях, які включені до міжнародних наукометрических баз – 3 (з них у Web of Science – 3), наукових працях апробаційного характеру – 5, роботах, що додатково відображають наукові результати дисертації – 11, монографії – 1.

Зауваження та побажання щодо змісту дисертаційної роботи.

Поряд з позитивною оцінкою дисертаційної роботи Шельова А.В., слід вказати на окремі недоліки, зазначити деякі зауваження та побажання:

1. Бажано пояснити, що означає термін “повні гетерозиготи”, який досить часто зустрічається на сторінках дисертаційної роботи.
2. Потрібно надати пояснення стосовно виразу “профілі індивідуальної гетерозиготності”.
3. На думку дисертанта, чи є різниця між термінами “поліморфізм” та “біорізноманіття”? Складається враження, що ці терміни дисерант використовує як рівнозначні.
4. Автор стверджує, що для мікросателітних локусів є характерним досить великий рівень поліморфізму, що й доведено у проведених дослідженнях. Виникає питання – на думку дисертанта, що є причиною значного рівня поліморфізму саме мікросателітних локусів?

5. За сучасною хімічною термінологією вираз дезоксинуклеотидтрифосфат є помилковим (у контексті дисертаційної роботи). Коректним є термін дезоксинуклеозидтрифосфат.

6. У розділі “Загальна методика та основні методи досліджень” детальний опис деяких методик є зайвим (можна просто навести посилання на відповідний протокол виробника).

7. У розділі стосовно оптимізації проведення ПЛР, а також у розділі “Загальна методика та основні методи досліджень” бажано було б наводити значення концентрацій використаних праймерів (олігонуклеотидів), що має критичне значення саме для розробки мультиплексних реакцій.

8. З тексту дисертаційної роботи не зовсім зрозуміло за яким алгоритмом та за якою процедурою проводили визначення параметру нерівноваги за зчепленням (LD). Чому в якості програмного інструменту визначення LD використовували саме програму PopGene, яка має певні обмеження, у першу чергу, за кількістю локусів, що аналізуються.

9. Незрозуміло, що означає термін «тонка» генетична структура? Якщо є «тонка» генетична структура, то який тип генетичної структури їй можливо протиставити?

10. Автор стверджує, що ”Нижчий середній рівень фактичної гетерозиготності ($H_o=0,624$) ніж очікуваної ($H_e=0,684$) по виду та по всіх, крім Хай-Лайн W-98, кросах є свідченням того, що досліджені популяції виявляє тенденцію до консолідації”. Виникає питання – як досить незначні відмінності у параметрі фактичної гетерозиготності призводять до консолідації породи?

11. Консолідація породи не завжди супроводжується станом генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом. Навпаки, спрямована селекція, що є направленою на консолідацію породи, й призводить до відхилення від рівноважного стану.

12. Незрозуміло, який поріг поліморфності локусу був використаний автором у дослідженнях?

13. Потребує пояснення, яким чином частоти унікальних алелів (наприклад, у дослідній групі курей кросу Хайсекс білий $N_{\text{unic}} = 0,008$) співвідносяться до значення саме порогу поліморфності кожного з мікросателітних локусів?

14. Виникає наступне питання – на думку дисертанта, які є обмеження за значенням частоти унікального алеля (для будь-якої популяції) для його використання в якості інструмента маркування (типування, ідентифікації) популяції? Чи може наявність унікальних алелів з дуже низькою частотою використовуватися для детального опису популяції? Цей феномен є характерною для певної популяції закономірністю, або випадковістю?

15. За використання F-статистик Райту для аналізу отриманих даних не зрозуміло, які значення F_{st} дисерант використовує в якості стандарту для визначення ступеню дивергенції між популяціями. Для вирішення цього питання рекомендуємо використовувати роботу S. Wright, 1979 (Evolution and the genetics of populations. Volume 4).

16. Наскільки доцільним є використання виразів “знаходиться у загрозливому стані” та “на межі зникнення” відносно видів тварин, з породами яких проводиться максимально “жорстка” спрямована селекційна робота? Чи дійсно німецький дог знаходиться на межі зникнення?

17. Автор стверджує, що “суворі стандарти селекційної роботи” призводять до зниження генетичного поліморфізму. Також він підкреслює, що дослідні мікросателітні локуси є селективно нейтральними. Виникає питання, яким чином інтенсивна селекція призводить до звуження генетичної мінливості у випадку з нейтральними маркерами?

18. У дисертації висвітлено дуже цікавий факт, що для свійських собак є характерним, у випадку з тетрануклеотидними мікросателітами, більш великий розмір ампліконів (222-248 bp) у чисто пуринових мотивів, на відміну від чисто піримідинових (174-202 bp). На думку дисертанта – це є закономірність? Якщо так, то що лежить в її основі?

19. Чому саме мікросателіти з динуклеотидною структурою мотиву характеризуються найбільшим різноманіттям за кількістю алелів на локус?

Зазначені зауваження не є принциповими, вони не зменшують позитивну оцінку та науково-практичну цінність представленої дисертаційної роботи.

Загальний висновок. Дисертаційна робота Шельова Андрія Володимировича «Поліморфізм генетичних ресурсів тварин за мікросателітними локусами ДНК» є завершеним науковим дослідженням, виконаним на сучасному методичному рівні. Враховуючи актуальність теми, відповідне методологічне забезпечення досліджень та їх новизну, повноту викладення матеріалу, аналіз та обґрунтованість отриманих результатів, теоретичне та практичне значення висновків роботи, вважаю, що дисертаційна робота **«Поліморфізм генетичних ресурсів тварин за мікросателітними локусами ДНК»**, відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів...» МОН України щодо докторських дисертацій, а її автор, **Шельов Андрій Володимирович**, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент, доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник, професор кафедри
біології тварин Національного університету
біоресурсів і природокористування України

Р.О. Кулібаба

