

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Шельова Андрія Володимировича на тему «**Поліморфізм генетичних ресурсів тварин за мікросателітними локусами ДНК**», представлену спеціалізованій вченій раді Д 27.355.01 Інституту розведення і генетики тварин НААНУ на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

Актуальність теми. В генетико-селекційних дослідженнях сільськогосподарських тварин велике значення має аналіз популяції, вивчення їх гетерогенності, диференціація та ідентифікація порід. Використання молекулярних маркерів значно розширює можливості генетичного аналізу популяцій, дозволяє встановити між- і внутрішньопородну варіабельність окремих ділянок геному і скласти уявлення про генетичну структуру породи. Одним з найбільш ефективних напрямків досліджень в цьому плані є аналіз міжмікросателітного поліморфізму. Він дозволяє одночасно оцінювати поліморфізм десятків локусів. Даний підхід широко застосовується для диференціації видів і сортів рослин, проте, мало використовується в дослідженнях генофондів сільськогосподарських тварин.

З огляду на це, дисертаційна робота, присвячена використанню поліморфізму мікросателітних локусів ДНК з метою оцінювання генетичних ресурсів різних видів тварин в рамках програм збереження їх біорізноманіття, є актуальною і своєчасною.

Мета і завдання досліджень. Мету сформульовано чітко, визначено завдання, якими передбачалося дослідити генетичну структуру популяцій тварин української червоно-рябої молочної, української чорно-рябої молочної та сірої української порід великої рогатої худоби; свійських коней порід: гуцульська, чистокровна верхова та українська верхова; собак порід – німецька вівчарка, німецький дог, російський той-тер'єр; свійської курки кросів – Ломанн білий, Ломанн коричневий, Хайсекс білий, Хайсекс коричневий та Хай-Лайн W-98 за мікросателітними локусами ДНК; здійснити внутрішньовидовий аналіз генетичної структури досліджуваних порід; порівняти показники генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами ДНК різних видів свійських тварин та оцінити їхню інформативність для різних таксономічних одиниць; дослідити та провести порівняльний аналіз мікроеволюційних процесів у різних таксономічних одиницях; оцінити ефективність різних математичних методів моделювання для оцінювання генетичного поліморфізму різних видів свійських тварин; визначити особливості використання поліморфізму мікросателітних локусів ДНК у системі збереження біорізноманіття та оцінювання генетичних ресурсів різних видів свійських тварин.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що автором вперше обґрунтовано, розроблено та апробовано комплексну систему оцінювання генетичного поліморфізму за мікросателітними локусами ДНК у представників різних таксономічних груп на різних рівнях організації геному та встановлено особливості мікроеволюційних процесів у досліджених популяціях.

Встановлено особливості генетичної структури за мікросателітними локусами ДНК на внутрішньовидовому та міжвидовому рівнях та визначено адекватність різних моделей математичного аналізу та оцінки генетичної ситуації у досліджених популяціях тварин.

Вперше оцінено інформативність мікросателітних локусів ДНК для різних видів та окремих українських порід свійських тварин в залежності від структурних особливостей нуклеотидних послідовностей.

Практичне значення роботи. Дисертантом 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.

Розроблено методичні підходи щодо використання мікросателітних локусів для оцінки генетичної ситуації в популяціях різних порід і видів свійських тварин.

Окремі положення та напрацювання використовуються у навчальному процесі Миколаївського національного аграрного університету при викладанні освітніх компонент «Спеціальна генетика», «Молекулярно-генетичні методи діагностики», «Загальна та молекулярна генетика» та «Генетика у ветеринарній медицині та основи розведення тварин» здобувачам вищої освіти початкового-третього рівнів вищої освіти спеціальностей 162 – «Біотехнології та біоінженерія», 204 – «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва» та 212 – «Ветеринарна гігієна, санітарія та експертиза».

Практичні результати досліджень впроваджено в Громадську спілку «Асоціація кіннозаводчиків України» (Акт впровадження від 13.06 2019) та у Всеукраїнську громадську організацію «Федерація службово-спортивного собаківництва України» (Акт впровадження від 13.11. 2019).

На основі одержаних результатів розроблено: методичні рекомендації «Генетична ідентифікація промислових видів риб», «Генетична ідентифікація та експертиза походження свійських коней (*Equus caballus*) мікросателітними фрагментами дезоксирибонуклеїнової кислоти: Методичні рекомендації», «Генетична ідентифікація собак» та «Рекомендації щодо проведення генетичної оцінки популяцій курей спеціалізованих яєчних кросів із застосуванням ДНК-маркерів», а також каталог «Інформаційна база даних (каталог) показників

генетичної структури популяцій курей спеціалізованих яєчних кросів, які використовують в Україні».

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дослідження проведено методично вірно, для проведення досліджень використовували біологічний матеріал від свійських тварин 4 видів 9 порід, 5 кросів у кількості 901 голова; вони охоплюють період з 2010 по 2020 рік: у лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН та відділі молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України. Тематика має відповідні шифри державної реєстрації. Наукові положення підтверджено значним обсягом проведеної експериментальної роботи з використанням молекулярно-генетичних, популяційно-генетичних та біометричних методів дослідження. Сформульовані здобувачем наукові положення, висновки і рекомендації є аргументованими, ґрунтуються на отриманих результатах і пройшли апробацію у міжнародних, всеукраїнських конференціях та на щорічних наукових звітах Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН.

Повнота викладу в опублікованих працях. Результати досліджень викладено у 39 наукових працях. У тому числі, монографія – 1, статті у фахових виданнях України – 19, у виданнях іноземних держав або які включено до міжнародних науковометричних баз – 3, робіт апробаційного характеру – 5, праць, додатково відображають наукові результати дисертації – 11 (в т.ч. методичних рекомендацій – 5, каталог – 1).

Зміст і оформлення дисертації. Робота викладена на 396 сторінках комп'ютерного тексту, містить 120 таблиць та 106 рисунків та складається з анотацій, переліку умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів, вступу, огляду літератури, загальної методики та основних методів досліджень, результатів власних експериментальних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел (697 джерел, у тому числі 549 латиницею), а також додатків.

В «Огляді літератури» у шести підрозділах автором розглянуто біологічне різноманіття як складова біосфери, генетичне різноманіття в системі збереження генетичних ресурсів, значення та методи оцінки генетичного поліморфізму, генетичні маркери їхні властивості та області застосування, мікросателітні локуси в дослідженнях генофондів свійських тварин та обґрунтування напряму власних досліджень.

У розділі «Загальна методика та основні методи досліджень» наведено місце проведення досліджень, дослідний матеріал та загальна схема досліджень. Достатньо ретельно представлено обладнання, що використовували в роботі та

різні методи і підходи які використані автором щодо відбору зразків біологічного матеріалу для проведення досліджень, виділення ДНК з біологічного матеріалу, постановки полімеразної ланцюгової реакції, проведення фрагментного аналізу, математико-статистичного аналізу одержаних даних.

У розділах 3 - 8 «Результати власних експериментальних досліджень та їх обговорення» встановлено, що усі досліджені три види ссавців відкриті для прилиття нових генотипів. Українська червоно-ряба молочна й українська чорно-ряба молочна породи великої рогатої худоби, українська верхова порода коней та собаки породи німецька вівчарка характеризуються підвищеним рівнем генетичного поліморфізму (що підтверджується більшою середньою кількістю виявлених генотипів ($N_g = 24,0$ й $22,3$, $47,91$ та $18,4$, відповідно), рідкісних генотипів ($N_{g1} = 13,8$ й $13,1$, $21,27$ та $8,6$; $N_{g2} = 5,0$ й $5,3$, 9 та $4,8$, відповідно). Українська червоно-ряба молочна й Українська чорно-ряба молочна породи великої рогатої худоби та українська верхова порода коней мають найвищі значення фактичної ($N_o = 0,784$ й $0,821$ та $0,812$), очікуваної ($N_e = 0,844$ й $0,819$ та $0,865$) й індивідуальної ($N_i = 0,784$ й $0,821$, та $0,784$, відповідно) гетерозиготностей, індексу поліморфізму ($PIC = 0,826$ й $0,807$ та $0,842$).

Виявлено значний рівень консолідованості досліджених порід, що підтверджується результатами розрахунків рівноваги за Гарді-Вайнбергом (велика рогата худоба: українська чорно-ряба молочна знаходиться в стані генетичної рівноваги за 8 мікросателітними локусами з 10, українська червоно-ряба молочна – за 7 з 10, а сіра українська – лише за 3; коні: гуцульська порода – за 7, чистокровна верхова – за 4 і українська верхова – за 2 мікросателітними локусами ДНК з 11; собаки: німецька вівчарка – за 3 з 5, а німецький дог та російський той-тер'єр – за 1 мікросателітним ДНК-локусом з п'яти), нижчим рівнем фактичної гетерозиготності ніж очікуваної в середньому по виду і по всіх породах та значеннями індексів Райта (велика рогата худоба – $F_{is} = 0,033$ й $F_{it} = 0,092$, коні – $F_{is} = 0,062$ та $F_{it} = 0,108$, собаки – $F_{is} = 0,100$ та $F_{it} = 0,142$). Найбільшу консолідованість, як за кількістю виявлених алелів так і за розмахом алельних спектрів виявили найдавніші породи з найбільш суворими стандартами селекційної роботи з породою – чистокровна верхова ($p \leq 0,001$) та німецький дог ($p < 0,05$).

Достовірні випадки зчепленого успадкування різних мікросателітних локусів ДНК відмічено тільки в сірої української породи великої рогатої худоби ($HWD = 0,328$; $N_{LD} = 39$; $p < 0,001$) та собак породи німецька вівчарка ($HWD = 0,2405$; $N_{LD} = 1$; $p < 0,05$).

Відповідно до результатів розрахунків ефективної чисельності популяцій в сприятливому стані перебуває тільки українська червоно-ряба молочна порода великої рогатої худоби ($N_e = 554,6$), у загрозливому стані знаходились популяції української чорно-рябої молочної породи великої рогатої худоби ($N_e = 5397,1$),

української верхової ($N_e = 103,9$) та чистокровної верхової ($N_e = 96,2$) порід коней, собак порід німецька вівчарка та російський той-тер'єр ($N_e = 88,2$ та $124,0$, відповідно), на межі зникнення – гуцульська порода коней ($N_e = 55,1$), а за цією межею сіра українська порода великої рогатої худоби ($N_e = 25,1$) та собаки породи німецький дог ($N_e = 28,9$).

Тварини різних порід всередині таксонів характеризуються незначним але достовірним рівнем генетичної диференціації (велика рогата худоба ($F_{st} = 0,122$), коні ($F_{st} = 0,047$), що підтверджується результатами аналізу молекулярної мінливості (AMOVA) (відносно низьке значення (велика рогата худоба $F_{st} = 0,058$, коні $F_{st} = 0,082$) генетичної диференціації між досліджуваними породами демонструє високий рівень значущості ($p \leq 0,001$).

У сірої української породи виявлено найбільшу кількість локусів за якими зафіксовано найбільшу кількість виявлених алелів (4), за якими зафіксовано найбільшу кількість породоспецифічних алелів (6), а також, власне породоспецифічних алелів ($N_{aunic} = 11(0,022)$). Дана порода характеризується проявом ефекту «пляшкового горлечка», оскільки нульову гіпотезу в її випадку можна відкинути з рівнем значущості $p = 0,014$ (тест знаків). Має місце високий ступінь інбредованості даної популяції (невипадковість об'єднання гамет ($HWD = 0,328$, NLD для СУ (39 випадків з 45), а сама порода перебуває на межі зникнення, адже ефективна чисельність (N_e) її становить 25,1 голів, з довірчим 95% інтервалом 15,7 - 44,2 особин, а також в неї зафіксовано найвужчі генотипові спектри за всіма мікросателітними локусами ДНК та більш високий ніж в решти порід худоби рівень консолідованості за певними (1-3) генотипами переважної більшості локусів. Локальні породи (гуцульська порода коней), характеризуються більшими розмірами алелів, середнім рівнем поліморфізму ($N_a = 10$, $N_g = 26$, $N_{g1} = 11,64$, $N_{a1} = 7$, $N_{g2} = 5,09$, $N_{aunic} = 3$, $N_{gunik} = 70$, $A_e = 5,253$, $N_o = 0,775$, $N_e = 0,802$, $N_i = 0,673$, $I = 1,869$, $PIC = 0,779$) та широким розмахом спектрів генотипової мінливості ($LimN_g$), за 6 мікросателітними локусами ДНК з 11 досліджених.

Найбільшу кількість алелів (N_a), породоспецифічних алелів (N_{aunic}), а також локусів, за якими виявлено унікальні алелі та локусів, за якими виявлено найбільшу кількість алелів взагалі, зафіксовано у наймолодших порід – української верхової породи коней та собак породи російський той-тер'єр, а також аборигенної сірої української породи великої рогатої худоби.

Для собак породи німецький дог характерними виявились найбільші значеннями фактичної ($N_o = 0,754$), очікуваної ($N_e = 0,833$) та індивідуальної ($N_i = 0,82$) гетерозиготностей та індексу поліморфізму ($PIC = 0,812$) найменша кількість виявлених ($N_g = 10,4$) та рідкісних ($N_{g1} = 5$, $N_{g2} = 3$) генотипів, $F = 0,012$, а також відсутність породоспецифічних алелів та генотипів ($N_{aunic} = 0$, $N_{gunik} = 0$). Російські той-тер'єри характеризувались досить широким, але з великою кількістю випадінь, спектрами алельної та генотипової мінливості,

високою консолідованістю за певними алелями, найбільшою кількістю породоспецифічних алелів ($N_{aunic} = 2$ (0,025) та найменшою середньою кількістю виявлених ($N_a = 8,2$) та ефективних ($A_e = 5,46$) алельних варіантів та найнижчими значеннями фактичної ($H_o = 0,690$), очікуваної ($H_e = 0,788$), та індивідуальної ($H_i = 0,690$) гетерозиготностей, індексів Шеннона ($I = 1,804$) та поліморфізму ($PIC = 0,766$).

Кроси фірми «Lohmann Tierzucht» характеризуються ширшими алельними спектрами і зменшенням довжин фрагментів. Причому коричневий крос дещо переважає білий. Курка кросу Ломанн білий вирізняється серед птиці інших кросів надзвичайною наповненістю певними алелями.

Оцінено інформативність окремих мікросателітних локусів ДНК для різних таксономічних одиниць. Оцінено перспективність і доцільність використання запропонованої системи використання поліморфізму мікросателітних локусів ДНК із застосуванням разом з комплексом математичних методів аналізу генетичної ситуації в популяціях свійських тварин на різних рівнях організації геному з метою збереження біорізноманіття та оцінки генетичних ресурсів різних видів свійських тварин.

«Висновки» викладено у 18 пунктах. Вони в цілому розкривають визначені метою та завданнями дисертації питання та ґрунтуються на одержаних вірогідних результатах досліджень. Пропозиції виробництву сформовано у чотирьох пунктах. Список використаних джерел наведено у разі посилання на джерело у тексті.

Автореферат дисертації відображає основні положення самої роботи.

Зауваження до змісту дисертації.

Загалом позитивно оцінюючи дисертаційну роботу Шельова А.В., слід вказати і на окремі недоліки, висловити зауваження та побажання:

1. В практичному значенні одержаних результатів не вказано № реєстрації та дати затвердження методичних рекомендацій. В додатках дисертаційної роботи міститься два акти впровадження. Не зрозуміло, чому автор не відобразив їх у даному підрозділі.

2. В огляді літератури забагато уваги приділено опису та характеристиці різних методів дослідження ДНК тварин і відсутня характеристика досліджених порід окремих видів свійських тварин.

3. У підрозділі 1.3 (Значення та методи оцінки генетичного поліморфізму приведено визначення: «Генетичний поліморфізм здебільшого визначають, як менделівську ознаку, що зустрічається в популяції принаймні в 2 варіантах з частотою не менш 1% для кожного» (ст.43). Нижче, на цій самій сторінці це визначення повторюється: «Поліморфною ознакою називають менделівську (моногенну) ознаку, за якою в популяції присутні що найменше два алелі,

причому жоден з них не зустрічається з частотою менше 1% (тобто не є рідкісним)», що не виправдано перевантажує рукопис.

4. На сторінці 59 приведено цитату: «Загальноновизнано, що поліморфізм мікросателітів обумовлений помилками в процесі реплікації або репарації ДНК (ефект "злипання")». Нажаль, у цьому цитуванні відсутнє написання цього поняття англійською мовою. Якщо мова йде про «DNA replication slippage» то доцільніше використати переклад проковзування ланцюга під час реплікації ДНК. Нижче на цій же сторінці ефект «злипання» вже не є загальноновизнаним механізмом утворення варіабельності у кількості повторів: «Природними причинами різноманіття в кількості повторів одиниць мікросателітів в геномі є «прослизання» (slippage) полімерази під час реплікації ДНК, і/або невідповідний кросинговер, неспівпадіння/відновлення ушкоджень подвійної нитки ДНК, а також переміщення ретротранспозонів. Ці варіації призводять до поліморфізму довжин фрагментів, що виявляються при електрофорезі».

5. На ст. 77. «І. Хонг з колегами проводили популяційно-генетичне дослідження південно корейської популяції єнотовидного собаки за 12 мікросателітними локусами». Згідно зі списком назв ссавців України, затвердженому Комісією з зоологічної термінології Інституту зоології НАН України, коректною українською назвою є єнотоподібний собака.

6. У загальній схемі досліджень відсутня інформація щодо чисельності дослідженого поголів'я, як по породах так і по видах, на якому проводилися дослідження.

7. Не зрозуміло чому було проведено відбір зразків біоматеріалу від тварин досліджених порід великої рогатої худоби з одного господарства?

8. В тексті роботи зустрічаються два умовних позначення генетичної диференціації F_{st} та Φ_{st} , поясніть в чому їхня відмінність.

9. В чому полягає оптимізація методик генотипування, якщо склад та співвідношення інгредієнтів реакційних сумішей та температурні режими відповідають характеристикам комерційних наборів StockMarks™?

10. На мою думку занадто багато уваги приділено аналізу розподілу частот алелів та генотипів у досліджених видів.

11. Окремі рисунки та таблиці займають більше однієї сторінки тому доцільно було б винести їх у додатки.

12. Потребує пояснення про аналіз яких генетичних процесів в промислових кросах курки йдеться в роботі, адже кроси – це штучно створені популяції.

13. Рис. 4.22. Чому для апроксимації вибрана ступенева функція, а не логарифмічна або експонентна. Автор стверджує, що «УЧР та УЧР породи демонструють вищий рівень поліморфізму за кількістю та характером розподілу частот виявлених генотипів, свідченням чого є наведені на рис. 4.22». Не зрозуміло, як можна оцінити характер поліморфізму на основі такого графічного

матеріалу. Аналогічні розрахунки і висновки зроблено відповідно до коней (Рис. 4.46), для собак (Рис. 4.60), для птиці (Рис. 4.74).

14. У розділах дисертант застосовує одночасно і минулий і теперішній час. Зустрічаються русизми, невдалі терміни («наймасовіший», «найменш масовим», «найпоширенішим» та «найрідкіснішим») та стилістичні обороти. Відсутність пропусків між словами, початок речення з малої літери, відкриті і незакриті дужки, незакінчені речення. Певна недбалість редагування виражена у відсутності крапок у кінці речень.

15. Висновки 2, 17 і 18 мають декларативний характер.

Водночас зауваження не є суттєвими, не стосуються принципових положень дисертаційної роботи, носять дискусійний характер і не зменшують її актуальності.

Загальний висновок. Дисертаційна робота А.В. Шельова є самостійним, завершеним дослідженням, в якому отримані нові, науково обґрунтовані результати, що підтверджують доцільність використання поліморфізму мікросателітних локусів ДНК з метою оцінювання генетичних ресурсів різних видів тварин в рамках програм збереження їхнього біорізноманіття.

Враховуючи актуальність теми, обсяг досліджень, наукову новизну, кваліфікаційний рівень, аналіз одержаних результатів, оформлення, апробацію, зміст висновків і пропозицій виробництву, вважаю, що дисертаційна робота на тему «Поліморфізм генетичних ресурсів тварин за мікросателітними локусами ДНК», відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» (Постанова Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р.), а її автор Шельов Андрій Володимирович заслуговує присвоєння наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Офіційний опонент, д-р с.-г. наук, професор,
завідувач кафедри гігієни тварин та
ветеринарного забезпечення
Національної поліції України
Подільського аграрно-технічного
університету

Т.М. Супрович

Учений секретар ПДАТУ
кандидат с.-г. наук, доцент

О. Т. Кобернюк

