

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу СТАРОДУБ Любов Феофілівни на тему «Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби та коней за різними типами маркерів», представлену спеціалізованій вченій раді Д 27.355.01 Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика

**Актуальність теми.** Вирішення проблеми збереження генетичного різноманіття сільськогосподарських тварин є важливим для забезпечення сталого розвитку тваринництва, розв'язання питань продовольчої безпеки, розвитку нових ринків і зменшення екологічних проблем. Особливо гостро постає питання збереження генофонду локальних порід сільськогосподарських тварин, що за рівнем продуктивності поступаються перед сучасними породами, але їх геном характеризується унікальними і цінними у господарському відношенні алельними варіантами генів, які комерційні породи поступово втрачають. Генетичні дослідження і селекційна практика свідчать, що саме підтвердження унікальності і консолідованості тієї чи іншої породи є основою для включення її в національні програми із збереження біоресурсів. Генофонди локальних вітчизняних порід великої рогатої худоби та коней є першочерговим об'єктом систематичних комплексних наукових досліджень. Увага науковців та практиків-селекціонерів до генетичного потенціалу тварин аборигенних порід-носіїв рідкісних алелів, що еліміновані внаслідок створення нових порід, є вкрай недостатньою. Дослідження їх мінливості під впливом факторів різної природи носять фрагментарний характер. З огляду на це, дисертаційна робота, присвячена теоретичному обґрунтуванню впливу різних факторів на формування генетичної структури популяцій аборигенних порід свійських тварин, є актуальною і своєчасною. Актуальність обраної дисертантом теми підтверджується і тим, що вона виконувалася відповідно до науково-

технічних програм робіт Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН. Таким чином, проблемність, масштабність та актуальність обраної дисертантом теми є одним з можливих шляхів вирішення першочергових завдань сучасної селекції і генетики сільськогосподарських тварин.

**Мета та завдання досліджень.** В якості мети дисертант визначив теоретичне обґрунтування та оптимізацію методичних підходів комплексного застосування молекулярно-генетичного і цитогенетичного методів у системі аналізу впливу різних факторів на формування генетичної структури популяцій аборигенних порід свійських тварин.

Завданням досліджень передбачалось вирішення наступних питань: дослідження каріотипу аборигенних та малочисельних порід (сірої української, червоної польської, білоголової української, бурої карпатської) великої рогатої худоби;

проведення порівняльного оцінювання параметрів генетичної мінливості каріотипу аборигенних порід великої рогатої худоби та тварин комерційних порід (української чорно-рябої молочної та української червоно-рябої молочної);

визначення впливу токсинів (сірководню у воді) на цитогенетичні показники соматичного мутагенезу великої рогатої худоби; дослідження спонтанної мінливості каріотипу аборигенних та малочисельних порід коней (гуцульської та коника польського);

проведення ретроспективного аналізу архівних матеріалів, з вивчення історії формування аборигенних порід коней та результатів палеонтологічних досліджень щодо поширення плейстоцен-голоценових коней на території України;

проведення досліджень генетичної структури різних популяцій аборигенних порід коней (гуцульської, коника польського та арабської порід) за полілокусними ISSR маркерами;

оптимізація методики виділення ДНК з викопних решток кісток плейстоценового коня, тарпана та давнього свійського коня; встановлення філогенетичних зв'язків між сучасними кіньми та древніми еквідами за ISSR-PCR маркерами.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Автором вперше в Україні здійснено порівняльний аналіз параметрів спонтанної цитогенетичної мінливості аборигенних та малочисельних порід великої рогатої худоби та коней з тваринами комерційних порід.

Вперше застосовано тест «Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster*» для встановлення причин підвищеної мінливості у соматичних клітинах великої рогатої худоби.

Оптимізовано методику виділення ДНК із викопних решток кісток коней, що дає змогу ефективно проводити типування тварин за полілокусними ДНК-маркерами та здійснено виділення ДНК з викопних кісток плейстоценових коней, справжнього тарпана та давнього свійського коня для встановлення зв'язку між сучасними і давніми еквідами з використанням ISSR-маркерів.

Усі перераховані вище і достатньо повно обгрунтовані експериментальними даними дисертаційної роботи пункти цілком достатні для того, щоб стверджувати її оригінальність і новизну в контексті здійснюваних в Україні робіт такого плану.

**Значимість результатів для науки і практики** Результати досліджень із порівняльного аналізу спонтанної цитогенетичної мінливості аборигенних та комерційних порід великої рогатої худоби різних напрямів продуктивності можна використовувати як додатковий критерій для добору тварин з низьким рівнем соматичного мутагенезу з метою збереження переваг, які мають тварини локальних та аборигенних порід.

Оптимізація методу виділення ДНК із викопних решток древніх коней дає можливість встановлювати зв'язок між сучасними і давніми еквідами за

допомогою ISSR-PCR методу. За допомогою ISSR-аналізу одержані дані дають змогу характеризувати особливості кожної дослідженої породи коней та доповнюють інформаційну базу даних геному.

Ретроспективний аналіз архівних матеріалів з питань вивчення історії розведення та збереження гуцульських коней є свідченням проходження цих процесів на українських землях у господарствах гуцулів.

**Практичне значення роботи.** Запропоновані в роботі підходи можуть бути використані для організації контролю внутрішньопопуляційних генетичних процесів у результаті оцінки консолідації аборигенних порід за поліморфізмом генетичних маркерів.

Тест «Спосіб визначення мутагенної активності ксенобіотиків на *Drosophila melanogaster*», можна рекомендувати для виявлення мутагенності природних середовищ (води і ґрунту), хімічних речовин та як тест на канцерогени, що впливають на організм сільськогосподарських тварин.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації.** Високий рівень наукових результатів і висновків, отриманих під час виконання дисертації, демонструється усією сукупністю експериментального матеріалу та обґрунтованим теоретичним обговоренням власних і літературних даних.

Дисертантом чітко сформульовано мету і завдання досліджень, проведено вичерпний аналіз результатів досліджень інших авторів, до вирішення поставлених питань залучено сучасні методи аналізу, які сприяли високому рівню виконання роботи і обґрунтованому обговоренню отриманих результатів і формулюванню висновків. Матеріал дисертації викладений послідовно і повністю відповідає поставленій меті та завданням дисертації. Слід відзначити також наочність представлення одержаних результатів, які проілюстровано 47 таблицями та 59 рисунками.

Структура дисертації побудована відповідно до чинних вимог і представлена анотаціями українською та англійською мовами, змістом, переліком умовних позначень, вступом, п'ятьма розділами, які включають

огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних експериментальних досліджень та їх обговорення, аналіз та узагальнення отриманих результатів; висновків, рекомендацій, списком використаних джерел та 4 додатками. Список використаних літературних джерел включає 450 джерел (220 латиницею).

На основі проведеної всебічної оцінки суті викладених в дисертації експериментально отриманих і теоретично узагальнених даних можна зробити висновок, що ступінь достовірності матеріалу, викладеного в кожному з розділів, висновках та рекомендаціях, як з методичної, так і теоретичної точки зору є достатньою. Дисертаційна робота Стародуб Л.Ф. характеризується належним ступенем обґрунтованості сформульованих наукових положень, висновків і рекомендацій.

**Повнота викладу в опублікованих працях.** Фактичний матеріал дисертаційної роботи та висновки, сформульовані на основі його аналізу, апробовано на сторінках наукових видань, доповідались на численних вітчизняних та міжнародних наукових конференціях. Вважаю, що основні положення дисертації достатньою мірою викладено в 24 наукових працях. Автореферат дисертації відображає основні положення самої роботи.

До найбільш вагомих здобутків дисертаційної роботи варто віднести такі:

Встановлення показників соматичного мутагенезу великої рогатої худоби аборигенних порід, які мають широкі внутривидові межі, що зумовлено їх адаптогенними властивостями; Виявлення підвищеної цитогенетичної мінливості великої рогатої худоби (кількісні та структурні порушення хромосом, частки апоптозних клітин) внаслідок інфікованості корів збудником туберкульозу; Доведення зниженої чутливості корів червоної польської породи до дії мутагенного чинника (сірководню у воді) порівняно з коровами української червоно-рябої молочної породи; Розроблення системи оцінки рівня генетичного поліморфізму популяцій коней гуцульської, арабської породи та коника польського за маркерами

(GA)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>9</sub>C, (AG)<sub>8</sub>CA, (AG)<sub>8</sub>CG, (GA)<sub>6</sub>CC, (ACC)<sub>6</sub>G, (GAG)<sub>6</sub>C та (CTC)<sub>6</sub>C для підтвердження унікальності і консолідованості популяцій в якості основи для включення їх в національні програми зі збереження біоресурсів; За результатами ISSR-аналізу встановлені видоспецифічні спектри продуктів ампліфікації для підроду *Equus*; Оптимізацію методики виділення ДНК та підбирання оптимальних умови проведення ПЛР, отриманої із викопних решток: (коня плейстоценового періоду (близько 10 тис. р. до нашої ери), зуба дикого коня тарпана (4,5 тис. р. до н. е.), давнього свійського коня (2-3 тис. р. до н. е.) за ISSR-маркерами. Виявлення унікальних поліморфних ДНК-локусів древніх еквід.

Загалом позитивно оцінюючи дисертаційну роботу Стародуб Л.Ф., слід вказати і на окремі **недоліки**, висловити **зауваження та побажання**:

### Огляд літератури

У цьому розділі дисертантом проаналізовано наукові праці вітчизняних і зарубіжних дослідників, в яких висвітлені питання генетичного моніторингу аборигенних порід сільськогосподарських тварин, зокрема сірої української породи великої рогатої худоби, червоної польської породи, бурої карпатської і білоголової української порід. А, також, коней гуцульської породи і породи коник польський, досліджено еволюційні етапи формування коней. Проаналізовано молекулярно-генетичні методи аналізу ДНК коней, генетичний поліморфізм порід домашнього коня за ISSR-PCR маркерами.

1. Р. 1.3 «Еволюційні етапи формування коней» фразу «на думку багатьох вчених» бажано було б завершити посиланням на роботи цих вчених.

2. Р. 1.3.3, стор. 68. В тексті «(ISAG) розроблені тест системи»... Краще, не тест системи, а панелі мікросателітних маркерів.

3. Р. 1.3.4 необхідно було б навести відомі результати інших дослідників щодо використання ISSR-маркерів при аналізі палеонтологічного матеріалу тварин. Такі дані допомогли би обґрунтувати використання цих маркерів для

аналізу викопних рештків. Адже в останніх ДНК не завжди зберігається в достатньо непошкодженому для аналізу стані.

4. Розділ 1.3.4, стор. 71. У розділі мова йде про ISSR-маркери, але в тексті є абзац, який починається з «Генотипування за мікросателітними локусами...». ISSR-маркери, як автор неодноразово вказує в своїй роботі, представляють собою міжмікросателітні маркери.

### **Матеріал та методи дослідження**

У розділі наявна наочна схема досліджень. Методики, які використав дисертант, відповідають поставленим завданням, є сучасними і як загальноприйнятими, так і оригінальними.

5. Незрозуміло, навіщо у таблиці 2.2 наведено інформацію про господарів тварин, які було використано у дослідженні. Крім того ця таблиця потребує примітки, де була би інформація про те, що таке БК, ПЦ, УЧРМ та інші скорочення. Подібної примітки потребує і таблиця 2.3.

6. Розділ 2.3.1. Подано перелік обладнання, яке необхідне як для виділення ДНК, так і для проведення ПЛР. А у назві цього розділу мова йде лише про виділення ДНК. Ця процедура не потребує термоциклера, транслюмінатора і т.п. Термостат «ТС – 80М-2» наведено двічі.

7. Розділ 2.3.2. Як визначалася «ефективність виділення ДНК», яка «складала» 50-70% ?

8. Розділ 2.3.3. За текстом «Електрофорез агарозного гелю». Мабуть, автор мав на увазі електрофорез в агарозному гелі.

9. Розділи 2.3.3 «Техніка проведення електрофорезу» і 2.3.5 «Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації» необхідно було б об'єднати.

10. Матеріал розділу 2.3.4 щодо програм ампліфікації, на нашу думку, краще було би подати у вигляді таблиці.

### Результати експериментальних досліджень та їх обговорення.

У розділі 3 подано результати цитогенетичних досліджень аборигенних порід великої рогатої худоби. Зокрема, з питань каріотипової мінливості, впливу збудника туберкульозу на стабільність каріотипу корів, співвідношення віку і хромосомної нестабільності, оцінювання соматичного мутагенезу у тварин великої рогатої худоби аборигенних порід. У розділі 4 вивчені питання збереження генофонду локальних та зникаючих порід коней. У розділі 5 представлені результати дослідження генетико-популяційної структури представників класу *ungulata* за мультилокусними ділянками ДНК, проведений філогенетичний аналіз.

11. Стор. 187. Рис. 5.2. Незрозуміло, що саме використовувалося в якості контролю, представлений на електрофореграмі. На більшості інших електрофореграм контроль відсутній.

12. Розділ 5.2.1. Для кожного з використаних ISSR-праймерів наведені результати щодо розміру отриманих ПЛР-фрагментів, визначені межі їх розмірів. Виникає питання, яким чином визначилися розміри фрагментів з такою точністю і як визначалися межі? ДНК-маркер, який використовувався в роботі, не мав достатньої щільності ДНК-фрагментів для цього. Можливо розміри ISSR-фрагментів відомі з літературних джерел?

13. Номери окремих рисунків (електрофореграм) для певних праймерів не співпадають з такими в тексті. Наприклад, праймер (AG)<sub>9</sub>C, електрофореграму представлено на Рис. 5.3, в тексті для цього праймера йде посилання на Рис. 5.4. Подібна ситуація має місце і для праймера (AG)<sub>8</sub>CG. Номер 5.6 повторюється двічі, рисунки різні (стор. 190, 191).

14. Стор. 206. Другий абзац і другий рядок зверху. Речення після «11 ампліконів» бажано завершити додавши «, відповідно».

15. Стор. 207. Третій абзац знизу, нижній рядок. В тексті «тяжких» ампліконів» Що автор мав на увазі?

16. Стор. 209. За текстом «амплікони розміром 380-400, 500-520, 560-590, 640-670, 820-870 та 1000-1050 пн. є найбільш консервативними,



оскільки, зустрічаються не менш ніж за трьома різними праймерами». Чи можна робити такий висновок? Адже фрагменти ДНК приблизно одного розміру, отримані в різних системах ISSR-ампліфікації (з різними праймерами), не є одними і тими же фрагментами. Вони лише співпадають за розміром, а за послідовністю нуклеотидів і розташуванням в геномі можуть бути зовсім різними.

17. Розділ 5.3. В роботі бажано було б акцентувати, в чому саме полягає модифікація методики виділення ДНК? Чи визначалася її нативність після виділення?

18. Стор. 223. Щодо ПЛР-ампліфікації. Не зазначено, скільки внесено ДНК і одиниць активності Tag-полімерази у реакційну суміш. Другий абзац цієї сторінки у певній мірі дублює інформацію, яка наведена в розділі Матеріал та методи дослідження.

19. Бажано було б представити результати щодо оптимізації температурних режимів проведення ПЛР для використаних ISSR-праймерів, для якого праймера яка температура їх відпалу визначена як оптимальна.

### **Аналіз та узагальнення результатів**

У розділі зроблено аналіз і обговорення результатів цитогенетичних і молекулярно-генетичних досліджень аборигенних порід сільськогосподарських тварин. Розглянуті питання збереження їх генофонду, еволюційної адаптації. Підкреслюється важливість цитогенетичного і молекулярно-генетичного аналізу, як складових комплексної генетичної оцінки племінних тварин, особливо під час породотворчого процесу та породовипробування. Суттєві зауваження до розділу відсутні.

### **Висновки і пропозиції виробництву**

Друга пропозиція виглядає неконкретною. В ній автор лише ще раз підтвердив загально відомі положення про необхідність молекулярно-

генетичного моніторингу процесів, які відбуваються в популяціях аборигенних порід.

Зазначені зауваження стосуються лише окремих положень дослідження, носять дискусійний, уточнювальний та рекомендаційний характер, не ставлять під сумнів актуальність роботи і не зменшують її наукового та практичного значення.

**Загальний висновок.** Дисертаційна робота Стародуб Л.Ф. є самостійним, структурно завершеним дослідженням, виконане на високому сучасному теоретичному та методичному рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків. Висновки відповідають отриманим експериментальним даним.

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 «Генетична мінливість аборигенних порід великої рогатої худоби та коней за різними типами маркерів» відповідає вимогам п. 10 щодо «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» (Постанова Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р.), а її автор СТАРОДУБ Любов Феофілівна заслуговує присвоєння наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 - генетика.

Зав. лабораторії генетики  
Інституту свинарства і агропромислового  
виробництва НААН, доктор  
сільськогосподарських наук



В.М. Балацький

Підпис Балацького В.М. засвідчую:  
Вчений секретар Інституту свинарства  
і агропромислового виробництва НААН,  
кандидат сільськогосподарських наук



М.О. Ільченко