

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЭКОЛОГИИ И ЭВОЛЮЦИИ им. А.Н. СЕВЕРЦОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИПЭЭ РАН)

119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33
Тел.(495)633-09-22, (495)954-28-21, (495)952-20-88;
Факс (495)954-55-34, e-mail: admin@sevin.ru

Отзыв

официального оппонента, доктора биологических наук

Марины Владимировны Холодовой,

на диссертацию Нестерук Любови Викторовны

« ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ РОМАНОВСКОЙ ПОРОДЫ ОВЕЦ»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность темы диссертации Л.В. Нестерук не вызывает сомнения. Всестороннее изучение и сохранение разнообразия генофондов домашних животных – одна из важнейших задач современной генетики. Работа Л.В. Нестерук имеет прямое отношение к этой ключевой проблеме. Изучение генетического разнообразия одной из древнейших отечественных пород овец – романовской, отличающейся высокой плодовитостью и целым набором ценных хозяйственных характеристик, имеет существенное значение для сохранения и успешной селекции этой уникальной породы, по классификации пород ФАО имеющей трансграничный статус и широкий ареал распространения. Необходимость оценки современной структуры и разнообразия генофонда романовских овец в России обусловлена резким сокращением численности этой породы в конце прошлого столетия, а также неудачными попытками «улучшить» породу.

Рукопись диссертации изложена на 119 страницах машинописного текста, включает введение, три основных раздела (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключение, выводы, предложения производству, список используемых сокращений, список литературы и приложение. Работа содержит 21 таблицу и 18 рисунков. Список литературы включает 307 источников, в том числе 168 на иностранных языках.

Основные результаты диссертации представлены в 11 научных публикациях, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК, 8 — в материалах и тезисах конференций, а также доложены на нескольких международных и всероссийских конференциях, совещаниях и школах молодых ученых.

Во Введении изложена актуальность проблемы, четко сформулированы цель и задачи исследования.

Первый раздел диссертации «Обзор литературы» включает три подраздела, в которых рассматриваются публикации, посвященные породному разнообразию и происхождению овец, романовской породе, генетическим маркерам, используемым в изучении генетического разнообразия овец. В первом подразделе автор кратко останавливается на вопросах происхождения и одомашнивания овец, а также приводит описание разнообразия пород овец и их классификацию. Отмечу некоторый недостаток в этой части обзора современной литературы, особенно это касается вопросов одомашнивания овец, а также избыточное с моей точки зрения цитирование энциклопедий (БСЭ и БРЭ). Гораздо более подробно и профессионально рассматриваются публикации, посвященные происхождению и истории создания романовской породы овец, характеристике овец этой породы, их современному состоянию, распространению и численности. При описании молекулярных маркеров, используемых в изучении генетического разнообразия овец, Л.В. Нестерук дает краткий обзор по микросателлитам, более подробно по мультилокусным ДНК-маркерам (полиморфизму длин продуктов амплификации, AFLP-маркерам; межмикросателлитному полиморфизму, ISSR-маркерам). Также здесь рассматриваются полиморфные маркеры, основанные на тестировании однонуклеотидных замен (SNPs). Наиболее интересен обзор работ, связанный с рассмотрением генов-кандидатов плодовитости сельскохозяйственных животных. В целом данный раздел отражает достаточную эрудицию автора в вопросах разнообразия пород овец, современного статуса романовской породы и методах изучения генетического разнообразия овец и других домашних копытных.

Раздел 2 дает достаточно полное представление о материалах и методах данного исследования. Работа основана на обработке большого объема материала, обеспечившего успешное решение поставленных задач: исследованы образцы от 1840 особей, представляющих 11 отечественных и зарубежных пород овец, изучены 35 популяций овец, в том числе пять выборок овец романовской породы из генофондных хозяйств Ярославской области. Отмечу, что Л.В. Нестерук принимала непосредственное участие в экспедиции по сбору образцов от романовских овец в Ярославской области. Необходимо подчеркнуть, что выборки, исследованные автором, являются репрезентативными, так как племенное ядро (около 10 баранов и 50 овцематок в зависимости от количества голов в отарах) по отдельным хозяйствам, разводящих романовскую породу овец, исследовано практически полностью.

Методы проведения лабораторных анализов, включая выделение ДНК, проведение ПЦР и ISSR-анализа, секвенирование экзона 4 гена рецептора эстрогена *ESR1*, анализ полиморфизма в экзоне 1 гена рецептора эстрогена *ESR1* с помощью типирования аллелей А- и В-аллелей методом ПЦР-ПДРФ, а также с помощью аллель-специфичной ПЦР, описаны четко и прозрачно. Это особенно важно для таких методов как ISSR-анализ, воспроизведение которых и получение аналогичных результатов в разных лабораториях не всегда успешно. Положительной оценки заслуживает то, что кроме праймеров, опубликованных другими авторами, при типировании А- и В-аллелей гена *ESR1* Л.В. Нестерук использовала оригинальные аллель-специфичные праймеры, разработанные автором с коллегами. Особо отмечу ценность методических разработок для ПЦР-типирования, позволяющих быстро и недорого генотипировать большое количество образцов без секвенирования. Статистическая обработка проведена адекватными методами. Достоинством работы является то, что статистическая обработка полученных данных, включая графические построения, выполнена с привлечением разнообразных современных компьютерных программ и методов, выбор которых достаточно хорошо обосновывается автором. Отмечу также, что наряду с широко принятыми в мировой практике стандартными показателями генетического разнообразия, Л.В. Нестерук использовала оригинальные характеристики, разработанные нашими учеными – Л.А. Животовским и др. Описание материалов и методов заслуживают самой высокой оценки.

Полученные результаты и их обсуждение отдельно не рассматриваются, а приводятся в самом объемном третьем разделе диссертации «РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ». В целом это объединение оправданно. Этот раздел построен вполне логично. Сначала приводятся и обсуждаются результаты, полученные методом ISSR–

анализа, затем автор переходит к описанию данных по полиморфизму гена эстрогенового рецептора *ESR1* (1 и 4 экзоны) у овец романовской породы.

Подраздел, посвященный полиморфизму межмикросателлитных локусов, занимает центральную часть диссертации. В начале приводятся описания полученных данных по генетическому полиморфизму ISSR-фрагментов у романовской породы овец, характеристики спектров AG- и GA-ISSR фрагментов, затем на основании данных ISSR-анализа дается оценка популяционной структуры и генетического разнообразия романовской породы. Использование этого подхода позволило автору достоверно показать существование в генофонде романовских овец исследованных хозяйств Ярославской области двух различающихся генетических линий, указывающих на то, что в формировании данной породы принимали участие две исходные прародительские популяции. Л.В. Нестерук оценила вклад каждой из этих популяций-основателей в формирование генофонда романовских овец отдельных хозяйств. Эти данные имеют как практическое, так и теоретическое значение. Стоит отметить, что в качестве одного из показателей генетического разнообразия романовской породы овец Л.В. Нестерук впервые использовала значение коэффициента генетической оригинальности (КГО), исходно разработанного для оценки генофондов растений. В результате выполненных исследований автору удалось выявить два хозяйства, где сосредоточено наибольшее количество типичных для породы генотипов и хозяйство, представляющее наиболее оригинальный генофонд романовской породы овец. Эти данные могут с успехом использоваться при ведении селекционных работ с этой породой овец.

Большой интерес представляет подраздел «Анализ ассоциаций между хозяйственно-полезными признаками романовских овец и ISSR-фрагментами». Автором выполнен поиск возможных ассоциаций данных по генетическому полиморфизму с результатами бонитировок из баз данных исследуемых хозяйств. С помощью построения модели наследования признака как регрессионной линейной модели и применения критерия Фишера Л.В. Нестерук провела анализ ассоциации хозяйственно-значимых признаков продуктивности, в основном характеризующих шубные качества и показатели плодовитости, романовских овец с определенными ISSR-фрагментами. Для девяти признаков выявлена достоверная связь с одним или несколькими ISSR-фрагментами и наоборот - для некоторых ISSR-PCR маркеров была установлена связь с несколькими фенотипическими признаками. Характерно, что некоторые фрагменты ассоциированы как с полезными хозяйственными качествами овец, так и с признаками (например, наличие мертворожденных ягнят), требующие селективной элиминации. Этот раздел работы заслуживает самой высокой оценки. Уже первые результаты этой поисковой работы дают

возможность сделать предварительные выводы о потенциальной значимости некоторых описанных ISSR-фрагментов. Но самое главное – эта работа имеет хорошую перспективу. Расширение выборок, дальнейшее усложнение методов, например секвенирования наиболее перспективных ISSR-фрагментов, выявление SNP и т.п., позволит подойти к серьезному и научно обоснованному решению ряда задач, стоящих перед селекционерами романовских овец. Этот подраздел дополняют данные оценки взаимосвязи между 15 анализируемыми признаками романовских овец с помощью корреляционных коэффициентов Пирсона, в результате которых были выявлены достоверные взаимосвязи между анализируемыми фенотипическими признаками. Эти данные также полезны для проведения селекционных работ.

Хотелось бы также остановиться на подразделе «Сравнительный анализ генофондов романовской и других пород овец на основании оценок полиморфизма AG-ISSR-фрагментов». С целью выделения породоспецифичных уникальных фрагментов, оценки генетического разнообразия, выявления меж- и внутривидового сходства/различия, определения филогенетических связей пород и их «протогенофонда» методом анализа полиморфизма AG-ISSR-фрагментов автором была изучена генетическая структура девяти пород овец (33 популяций), разводимых на территориях России и Монголии. Данные этого раздела имеют большое значение для реальной оценки уровня генетического разнообразия исследованных Л.В. Нестерук популяций романовской породы. В целом показан сравнительно высокий уровень разнообразия данной породы. В этом подразделе автор также делает попытку прояснить вопрос о происхождении романовской породы овец. Л.В. Нестерук упоминает в тексте (с. 78) о двух гипотезах происхождения романовской породы. Согласно первой романовская порода является потомком местных северных короткохвостых овец, возможно скрещенных с голландскими баранами, по второй - романовские овцы пришли с монголо-татарами и затем разводились «в себе» на территории Центральной России. Результаты сравнительного анализа генетических расстояний по полиморфизму ISSR-фрагментов показали генетическую близость романовской породы с тувинской овцой и с овцами, входящими в подкластер, объединяющий породы калмыцкая и буубэй. Автор рассматривает эти данные в качестве возможного подтверждения второй гипотезы или же о родстве всех этих пород.

Большой интерес представляет подраздел, посвященный изучению у овец романовской породы полиморфизма гена эстрогенового рецептора *ESR1* (1 и 4 экзоны) – одного из кандидатов на маркеры продуктивных признаков у сельскохозяйственных животных. Л.В. Нестерук впервые получила данные по изменчивости гена *ESR1* (экзонам 1 и 4) у высоко плодовитой романовской породы, сравнив их с аналогичными данными у

низко плодовитых пород полл дорсет и суффолк. В ходе выполнения данной работы автором была оптимизирована методика типирования полиморфизма экзона 1 гена *ESR1* овец - подобраны рестриктазы для проведения рестрикционного анализа продуктов амплификации, разработаны аллель-специфичные праймеры. Это позволило более точно и быстро выявлять *A (C)*- и *B (G)*-аллели. На основании описания полиморфизма гена эстрогенового рецептора Л.В. Нестерук описала аллели и показала существенное преобладание у овец романовской породы частоты аллеля *B* по *ESR-ex1* локусу гена *ESR1*, обычно ассоциирующегося с повышенной плодовитостью у овец. Кроме того, автором дана оценка доли этого аллеля в отдельных исследованных овцеводческих хозяйствах. В данной работе удалось выявить достоверные различия в частотах аллелей гена *ESR1*, в том числе и аллеля *B* по *ESR-ex1*, у высоко плодовитой романовской породы и разводимых в России низко плодовитых овец пород полл дорсет и суффолк канадской селекции. В то же время Л.В. Нестерук отмечает, что по литературным данным у некоторых высоко плодовитых пород овец встречается и низкая частота генотипа *BB* по *ESR-ex1* локусу гена *ESR1*. Включение этой информации в обсуждение полученных результатов говорит не только об эрудиции автора в данном вопросе, но и о серьезном отношении соискателя к оценке полученных результатов. В целом предположение автора о связи *ESR-ex1* локуса гена *ESR1* с повышенной плодовитостью романовских овец вполне поддерживается полученными результатами. По новизне и значимости результатов, качества их обсуждения и перспективности развития данного направления данный подраздел заслуживает самой высокой оценки.

Очень четко написано «Заключение» в котором суммируются и кратко обсуждаются наиболее значимые результаты работы.

В диссертации также приводятся «Предложения производству», основанные на разработанных автором методах и полученных результатах, имеющие существенное значение для контроля и сохранения существующего генетического разнообразия отечественных пород овец, для проведения селекции и мониторинга генетических изменений в составе романовской и других пород овец.

Приложение включает таблицы с данными о частотах встречаемости *ISSR*-фрагментов, полученных для 33 популяций девяти пород овец; схему расчета коэффициента генетической оригинальности (КГО) генофонда романовской породы овец, данные о генетических расстояниях между 33 популяциями девяти пород овец; дендрограмму генетических расстояний между изученными популяциями 9 пород овец. Включение этого материала в диссертацию важно, поскольку позволяет ознакомиться с первичными данными.

Результаты, полученные Л. В. Нестерук, отличаются высокой степенью **новизны**. Впервые с помощью ISSR-PCR маркеров изучены генетическая структура, показатели генетического разнообразия, филогенетические связи и генетические дистанции пяти генофондных хозяйств романовской породы овец России. Впервые для романовских овец исследованных хозяйств были выделены две внутривидовые генетические группы, свидетельствующие о сложности происхождения породы. Впервые получена информация о генетическом разнообразии овец теленгитских и буубэй, установлена генетическая близость романовских овец с тувинскими короткожирнохвостыми, показано, что наиболее древними из изученных пород были эдильбаевские, тувинские и монгольские овцы. Впервые для сельскохозяйственных животных был применен метод расчета значения коэффициента генетической оригинальности (КГО). Впервые были описаны нуклеотидные последовательности и определены частоты аллелей и генотипов экзонов 1 и 4 гена эстрогенового рецептора (*ESR1*) у высоко плодовитой романовской и низко плодовитых (полл дорсет и суффолк) породах овец.

Результаты диссертационной работы Любови Викторовны Нестерук имеют существенное **теоретическое значение** для расширения знаний в области микроэволюции и формообразования, понимания исторических процессов одомашнивания копытных, фундаментальных основ селекции. Результаты работы имеют также большую **практическую** значимость для сохранения существующего генетического разнообразия овец романовской и других отечественных пород. Разработанные и оптимизированные автором молекулярно-генетические методы могут с успехом применяться для описания генетического разнообразия различных пород овец, для научного обоснования работ по селекции овец и мониторингу состояния их генофондов. Практическое значение для племенной работы могут иметь полученные автором результаты об участии в формировании романовской породы двух исходных прародительских популяций и оценка вклада каждой из этих популяций–основателей в формирование генофонда романовских овец исследованных хозяйств. Применение метода расчета коэффициентов генетической оригинальности (КГО) позволило выявить хозяйства как с наибольшим количеством типичных для породы генотипов, так с наиболее оригинальным генофондом романовской породы овец, что может с успехом использоваться при ведении селекционных работ с этой породой овец. Следует также отметить и практическое значение выполненной автором оптимизации метода генотипирования полиморфизма экзона 1 гена *ESR1*, позволяющее в ряде случаев избежать более затратного секвенирования фрагментов гена. Результаты, имеющие практическую значимость, четко сформулированы в предложениях производству.

Диссертационная работа Л.В. Нестерук производит очень хорошее впечатление. Результаты соответствуют поставленным целям и задачам, выводы отражают важнейшие результаты работы. Рукопись оформлена в соответствии с правилами оформления кандидатских диссертаций, хорошо иллюстрирована. Диссертация написана хорошим литературным языком. Рукопись хорошо выверена, в ней мало опечаток.

Выводы следуют из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации. Основные результаты работы опубликованы в научных изданиях.

По постановке цели и задач, разнообразию использованных экспериментальных и статистических методов, теоретическому осмыслению работа соответствует современному уровню развития мировой науки.

При общей положительной оценке диссертации, необходимо отметить, что к работе имеет смысл высказать несколько замечаний:

1. Не совсем корректно говорить о влиянии (подчеркивание рецензента) выявленной генетической структуры (AG- и GA-ISSR-PCR маркеры) на изменчивость хозяйственно-полезных признаков романовских овец (с.65 и др.). Поскольку в данном методе оперируют фрагментами анонимных нуклеотидных последовательностей, везде в тексте было бы более оправданно говорить об ассоциациях между хозяйственно-полезными признаками романовских овец и ISSR-фрагментами, как это дано в заголовке подраздела и в выводах.
2. Для романовских овец автором получена достоверная ассоциация ISSR-фрагмента A12 с признаком «максимальное количество ягнят» (с. 66, Табл.10). В то же время, при межпородном сравнении у романовских овец, отличающихся многоплодностью, частота встречаемости этого фрагмента оказалась сравнительно низкой (табл.12, с.71). Хотелось бы узнать мнение автора – чем может быть обусловлен этот парадокс?
3. (с. 79) Не совсем корректно проведена проверка гипотез о происхождении романовской породы овец. Исследованная выборка была составлена в основном из пород, происходящих из восточных регионов. Для полноценной проверки и более аргументированной поддержки гипотезы следовало бы использовать в сравнительном анализе и несколько европейских пород. Это не столько замечание, сколько пожелания на будущее.

