

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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. 8 (495) 633-09-22, 8 (495) 954-28-21, 8 (495) 952-20-88

Факс 8 (495) 954-55-34, e-mail: admin@sevin.ru

www.sevin.ru

Отзыв официального оппонента,
доктора биологических наук Марины Владимировны Холодовой,
на диссертацию

Оюн Надежды Юрьевны,

**«Генетическое разнообразие яка (*Bos grunniens*) Саяно-
Алтайского региона»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

по специальности 03.02.07 – генетика

Диссертационная работа Н.Ю. Оюн посвящена исследованию генетического разнообразия популяций яка (*Bos grunniens*), обитающих на территории Саяно-Алтайского региона России и Монголии. Актуальность темы диссертации не вызывает сомнений. Объект исследования, як – уникальное по морфо-физиологическим характеристикам домашнее животное, дикая форма которого до сих пор обитает в высокогорье Цинхай-Тибетского нагорья.

Як является ценнейшим домашним животным, способным обитать в суровых условиях высокогорья, в условиях гипоксии и низких температур. В этом отношении с ним смогут сравниться только ламы Южной и Центральной Америки. Традиционно разводимый преимущественно в горных регионах Азии, в последние годы як становится домашним животным и Нового Света. В последние десятилетия достаточно активно проводятся исследования генетического разнообразия, фило- и геногеографии, филогении яка, а также генетических механизмов адаптации этого вида к гипоксии в условиях высокогорья. До сих пор эти исследования практически не затрагивали породы яков, разводимых на территории России – в Туве, в Бурятии, на Алтае. Изучение яка *Bos grunniens* в качестве модельного вида молекулярно-генетических основ адаптации к гипоксии в условиях высокогорья имеет важное фундаментальное значение. Именно этим актуальным проблемам посвящена диссертация Н.Ю. Оюн.

Диссертация изложена на 103 страницах и состоит из Введения, трех глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 135 источников, в том числе 125 на иностранных языках. Работа содержит 15 таблиц и 23 рисунка.

Основные результаты диссертации представлены в пяти научных публикациях, из них три в журналах, рекомендованных ВАК, а также доложены на двух международных конференциях и опубликованы в материалах этих конференций.

Работа построена по традиционному плану и очень хорошо структурирована.

Во «**Введении**» автор подробно обосновывает актуальность темы исследования, определяет его цель и задачи, кратко характеризует научную новизну, практическую и теоретическую значимость работы и формулирует положения, выносимые на защиту. Введение полностью отвечает названию

диссертации, в нем ясно сформулирован круг проблем и представлена информация, необходимая для понимания рассматриваемых вопросов.

Глава «**Обзор литературы**» включает два раздела. В первом рассматривается литература, посвященная общей характеристике и современной систематике вида *B. grunniens*, рассматриваются вопросы происхождения, доместикиции и распространения пород и географических популяций яка. Во втором разделе дается обзор литературных источников, посвященных исследованиям *B. grunniens* с использованием генетических маркеров. В нем приводятся сведения о филогенетических отношениях яка, выявленных на основе анализа мтДНК, об уровне генетического полиморфизма по данным полиморфизма микросателлитных локусов. Отдельный подраздел посвящен молекулярно-генетическим основам адаптации яка к гипоксии в условиях высокогорья. Все разделы «Обзора литературы» хорошо проиллюстрированы таблицами, рисунками и фотографиями, подписи содержат сведения об источниках цитирования. При обсуждении опубликованных данных Н.Ю. Оюн отмечает до сих пор нерешенные вопросы, связанные с генетическими характеристиками яка, особенно теми, которые имеют отношения к якам одомашненной формы.

В целом этот раздел отражает достаточно широкую эрудицию автора в вопросах, связанных с темой диссертации.

Глава «**Материалы и методы**» хорошо отражает большую работу, проведенную соискателем. Диссертационную работу Н.Ю. Оюн характеризует обработка достаточно объемной выборки, разнообразие использованных молекулярных маркеров и методов анализа. В работе проанализировано 504 особи из четырех географических популяций (Тува, Алтай, Бурятия и Монголия) и, соответственно, из семи яководческих хозяйств России и трех из Монголии. В главе приводятся краткие климато-географические характеристики районов расположения исследованных яководческих хозяйств. Молекулярно-генетические методы включали секвенирование D-петли мтДНК (700 п.н.) от 10 особей из каждого хозяйства (всего 100); проведение фрагментного анализа по 15

микросателлитных локусов для 364 образцов. Кроме того, для целевых фрагментов гена VEGF-A получены 24 нуклеотидные последовательности (244 и 240 п.н.) и, на основании выявленных замен (SNP), проведено генотипирование 477 яков методом ПДРФ. В главе приводится подробное описание всех этапов работы. Автор также четко указывает где проводились отдельные этапы работы, а также коллег, помогавших в обработке полученных данных. Для обработки полученных данных использованы современные биоинформатические и математико-статистические методы и программы, включая пакеты программ виртуальной R-среды. Отмечу, что описания методов статистической обработки приводятся сразу после изложения соответствующего метода молекулярно-генетического анализа, что очень удачно.

Данная глава дает достаточно полное представление о материалах и методах данного исследования. Все этапы работы от сбора материала до статистической обработки описаны подробно и четко.

Центральную и самую объемную часть диссертации занимает третья глава «**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**». Глава включает три раздела, каждый из которых в свою очередь делится на несколько подразделов. Все разделы соответствуют задачам, поставленным автором для достижения цели исследования.

В первом разделе приводятся результаты оценки генетического разнообразия яка исследованного региона на основе полиморфизма D-петли мтДНК. Н.Ю. Оюн достаточно подробно описывает результаты анализа гаплотипического разнообразия D-петли мтДНК исследованной выборки, приводит Байесово дерево филогенетических отношений 17 описанных гаплотипов, на котором выделяются пять гаплогрупп. Автором проведен анализ встречаемости отдельных гаплотипов и гаплогрупп в каждой из десяти исследованных региональных выборок, приведена карта частот распределения гаплогрупп в каждой из территориальных выборок. Заслуживает высокой оценки филогенетический анализ оригинальных данных, объединенных с гаплотипами D-петли мтДНК дикого и одомашненного яка, полученных другими авторами (из Генбанка), (всего

170 гаплотипов) позволивший автору изучить вклад материнских линий наследования в формирование внутри- и межпородного разнообразия яка, а также возможные изменения, связанные с одомашниванием яка. Четко выраженных корреляций распределения частот гаплотипов и гаплогрупп как с породной, так и с географической принадлежностью яков выявить не удалось. Не было существенных различий и между домашними и дикими яками. Данные Н.Ю. Оюн подтвердили ранее выдвинутую гипотезу о том, что гаплогруппы мтДНК яка сформировались задолго до одомашнивания этого вида полорогих. Существенным вкладом в изучение генетической структуры и филогеографии *B. grunniens* стало и то, что в данном исследовании были описаны четыре новых гаплотипа.

Очень подробно автором исследовано генетическое разнообразие и генетическая структура популяций яка Саяно-Алтайского региона на основании полиморфизма аллелей микросателлитных локусов. Дана сравнительная оценка изменчивости у яка 15 микросателлитных локусов, разработанных для крупного рогатого скота. Для каждого локуса в объединенной выборке получены данные по аллельному разнообразию, гетерозиготности, индексов полиморфности, фиксации и инбридинга, что имеет существенное методологическое значение для дальнейших исследований генетического разнообразия этого вида. Выявлены максимально информативные локусы, отличающиеся наиболее высокими значениями средней эффективной численности, потока генов и индекса полиморфности *PIC*. Отмечены также и наименее информативные локусы, применение которых в дальнейшем автор считает нежелательным. Безусловно, эта часть работы чрезвычайно важна. Детальное исследование, проведенное с набором микросателлитных локусов, позволило Н.Ю. Оюн получить достоверную картину изменчивости яка, как в отдельных популяциях, так и в Саяно-Алтайском регионе в целом, установить наличие/отсутствие уникальных аллелей, оценить уровень гетерозиготности, выявить признаки инбридинга и т.п. В частности было установлено более низкое аллельное разнообразие одомашненных яков тувинских популяций по сравнению с монгольскими и, что весьма

интересно, с яками алтайской популяции. Автору удалось оценить генетические дистанции между исследованными популяциями, оказавшиеся сравнительно небольшими, хотя и достоверными. Особо отмечу построенную в данной работе на основе рассчитанного числа мигрантов на поколение (Nm) модель направленных относительных миграций между тувинскими популяциями яков. Эта модель частично объясняет полученную с помощью программы Structure картину кластеризации микросателлитных аллелей.

Особый интерес представляет третий раздел данной главы, посвященный поиску ассоциаций функционально значимого гена *VEGF-A*, имеющего непосредственное отношение к генетической детерминации механизмов адаптации к гипоксии, с высотой горного рельефа у яков Саяно-Алтайского региона. На основании секвенирования двух целевых фрагментов гена *VEGF-A* автором были получены 24 нуклеотидные последовательности, при выравнивании которых были выявлены одиночные замены (SNP), позволившие генотипировать яков всех популяций методом ПДРФ. Весь процесс поисковой работы описан подробно и отлично иллюстрирован. Для каждой исследованной популяции по каждой из двух замен приводятся таблицы встречаемости генотипов, аллелей, и показатели генетического разнообразия – гетерозиготности (наблюдаемой и ожидаемой), коэффициент инбридинга. Все эти данные в дальнейшем рассматриваются в контексте поиска связи отдельных аллелей и генотипов с высотой мест обитания этих удивительных животных. Для решения этой сложной задачи автор применил линейную регрессионную модель с фиксированными эффектами. Н.Ю. Оюн дает подробное описание использованной модели. В результате автором были выявлены ассоциация и корреляция между высотой горного рельефа, где обитают яки отдельных популяций, и генотипом SNP *g.14853G>A* гена *VEGF-A* у яков Саяно-Алтайского региона России и Монголии. Подчеркну значимость этих выводов. Хотя в научной литературе для яков трёх пород, обитающих на разных высотах Цинхай-Тибетского нагорья, уже была отмечена тенденция увеличения частоты аллеля *A* в данной позиции гена с возрастанием высотности мест обитания,

Н.Ю. Оюн впервые провела специальное исследование по поиску ассоциаций и корреляций SNP-маркеров с высотой рельефа.

В Заключении автор кратко и четко суммирует наиболее важные результаты, полученные в ходе выполнения исследования.

Выводы диссертации сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам и их обсуждению в тексте диссертации.

Результаты, полученные Н.Ю. Оюн, отличаются высокой степенью **новизны**. Работа носит пионерский характер, поскольку это первое комплексное исследование генетического разнообразия яка Саяно-Алтайского региона, основанное на основе оценки полиморфизма молекулярных маркеров митохондриальной (D-петля) и ядерной ДНК (микросателлитные локусы, ген *VEGF-A*). Автором впервые описан гаплотипический состав яков Тувы, Бурятии, Алтая и ряда регионов Монголии, выявлено четыре неизвестных ранее гаплотипа, показано высокое гаплотипическое разнообразие и распределение основных гаплогрупп по исследованному региону, проведен филогенетический анализ всех имеющихся на сегодняшний день нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК яка, показавший присутствие общих или близких гаплотипов у яков дикой и одомашненной форм, а также у животных разных пород и разного географического распространения. Впервые проведена оценка информативности для яка различных микросателлитных локусов, разработанных для КРС. Впервые на единой панели 15 микросателлитов получены данные популяционно-генетического анализа десяти популяций яка России и Монголии, дана всесторонняя оценка их генетического разнообразия, выявлена слабо выраженная степень их дифференциации. Впервые с помощью молекулярно-генетического анализа и моделирования проведен поиск ассоциаций гена *VEGF-A* с высотой горного рельефа у яков, аргументировано установлена ассоциация гена *VEGF-A* с адаптацией к обитанию в высокогорье, выявлена тенденция повышения частоты аллеля *A* в позиции *g.14853* гена *VEGF-A*,

участвующего в механизмах адаптации к высокогорной гипоксии, с ростом высоты горного рельефа.

Результаты диссертационной работы Н.Ю. Оюн имеют существенное **теоретическое значение** для понимания процессов микроэволюции, генетических основ доместикации, закономерностей формирования адаптаций крупных млекопитающих к экстремальным условиям высокогорья. Не подлежит сомнению и практическая значимость работы для сохранения генетического разнообразия уникального домашнего животного – яка, являющегося важнейшим источником существования многих народов Центральной Азии. Практическое значение также имеют методические разработки автора, в частности, результаты отбора микросателлитных локусов, разработанных для КРС, отличающихся максимальной информативностью для оценки генетического разнообразия популяций яка. Они могут быть с успехом использованы в различных яководческих хозяйствах. Методы генотипирования яков по SNP гена *VEGF-A*, установленная ассоциация определенных аллелей и генотипов с устойчивостью к гипоксии может найти применение в селекционных работах. Результаты и методические разработки автора могут быть использованы в курсе лекций и практических занятий по генетике животных для студентов биологических факультетов ВУЗов.

Диссертационная работа Н.Ю. Оюн производит очень хорошее впечатление. Результаты соответствуют поставленным цели и задачам, выводы отражают важнейшие результаты работы. Рукопись оформлена в соответствии с правилами оформления кандидатских диссертаций, хорошо иллюстрирована. Диссертация написана хорошим литературным языком. Рукопись достаточно хорошо выверена, в ней практически нет опечаток. Выводы следуют из полученных результатов и соответствуют поставленным задачам. Автореферат полно отражает содержание диссертации. Основные результаты работы опубликованы в научных

изданиях. Проведенное исследование выполнено на высоком научном и профессиональном уровне.

Тем не менее, к работе есть некоторые замечания:

1. На основании описания гаплотипического состава D-петли мтДНК и распределения гаплотипов по популяциям Н.Ю. Оюн делает вывод о «довольно высоком» (с.50) гаплотипическом разнообразии исследованного региона. Отмечу, что стоило бы привести конкретные значения коэффициентов гаплотипического (генного) (h) и нуклеотидного (π) разнообразия по выборкам из отдельных популяций и региона в целом, что существенно усилило бы это утверждение. Программа Arlequin, использованная автором для обработки данных микросателлитного анализа, легко справляется с этой задачей.
2. Стоит объяснить выбор модели для анализа в программе Structure. Не совсем понятно, почему использована модель независимых частот аллелей (Allele frequencies independent)? Наиболее вероятно, что исследованные популяции имеют общее происхождение, поэтому стоило бы использовать модель скоррелированных частот аллелей. Не совсем понятно, почему автор ограничился такими малыми значениями предварительного отжига марковской цепи (Length of Burnin Period, 5 000 шагов) с последующим прогоном (Number of MCMC Reps after Burnin) в 50 000 шагов. Возможно, увеличение в 15-20 раз значения этих показателей позволило бы выявить более четкую кластеризацию.
3. Не совсем удачен рисунок 14 «Графическое представление распределения аллелей в исследуемых выборках». Для этой цели более подходящими были бы гистограммы, построенные в программе GenAlex, которую автор использовал для обработки данных.

Следует отметить, что перечисленные замечания в целом не являются принципиальными и не влияют на общее положительное впечатление о работе Н.Ю. Оюн, как о профессионально выполненном научном исследовании.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертация Н.Ю. Оюн «Генетическое разнообразие яка (*Bos grunniens*) Саяно-Алтайского региона» соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Надежда Юрьевна Оюн, достойна присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07. – «Генетика».

Главный научный сотрудник,

Руководитель Кабинета методов молекулярной диагностики

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

доктор биологических наук

Марина Владимировна Холодова

Москва 119071 Ленинский проспект, 33, Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

mvkholod@mail.ru

Тел/Факс 495 952 77 97/495 954 55 34

03/12/2018

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (ИПЭЭ РАН)

Доктор биологических наук



Н.Ю. Феоктистова