

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу

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 Надежды Юрьевны Оюн посвящена вопросам анализа комплексного внутривидового полиморфизма яка (*Bos grunniens*) России и Монголии по трем различным молекулярным маркерам, поддержание которого является условием сохранения данного вида в Саяно-Алтайском регионе. Своевременность и актуальность подобных работ очевидна как в фундаментальном, так и в прикладном плане. В настоящее время изучение *Bos grunniens* вызывает большой интерес во всем мире. Як – уникальное по морфо-физиологическим характеристикам домашнее животное, дикая форма которого обитает в высокогорье Цинхай-Тибетского нагорья. Считается, что предок современного дикого яка обитал на территории Китая, Непала, Сибири, Монголии и Аляски около 2,5 миллионов лет назад. Доместикация яка на территории Восточного Цинхай-Тибетского нагорья произошла в пределах 7,3 тысяч лет тому назад. Высочайшая адаптационная способность яков к низким температурам и высотной гипоксии, способность значительную часть года существовать на скудных кормах, добываемых из-под снега, позволяет разводить яков в районах, где содержание другого скота невозможно. На данный момент в мире насчитывается около 14 миллионов голов одомашненного всех 12 пород яка. Его разводят в Китае, Монголии, России, Непале, Индии, Бутане, Киргизии,

Казахстане, Пакистане, Афганистане, Таджикистане, а в последние годы - на Аляске и в Канаде. В современной России яководство развивается главным образом в Туве, а также на Алтае, в Бурятии и на Северном Кавказе.

В настоящее время изучение одомашненного и дикого яков вызывает большой интерес во всем мире. Проводятся различные исследования по дифференциации популяций, оценке генетического разнообразия, геногеографии и филогенетических взаимоотношений одомашненного и дикого яков. Большое количество исследований по изучению генетического разнообразия яка уже проводилось на популяциях, обитающих на территории других стран. В России же основные исследования посвящались гибридизации яка и крупного рогатого скота, а не оценке популяционной структуры. Также важнейшим свойством яка является его адаптация к гипоксии в высокогорных условиях, поэтому знание молекулярно-генетических основ этой адаптации имеет важное фундаментальное значение. В настоящее время известны гены-кандидаты, которые могут играть ключевую роль в высотной адаптации яка. Таким является ген VEGF-A, влияющий на непосредственный ответ организма на гипоксию, стимулирующий образование новых кровяных телец и повышающий проницаемость кровеносных сосудов. В связи с этим представляет интерес поиск ассоциаций гена VEGF-A в популяциях яка Саяно-Алтайского региона России и Монголии. Работа имеет высокую теоретическую и практическую значимость в связи с комплексным подходом к изучению генетического разнообразия яка *Bos grunniens* в России и Монголии, поддержание которого является условием сохранения данного вида в Саяно-Алтайском регионе.

Диссертационная работа представлена на 103 страницах, иллюстрирована 23 рисунками, включает 15 таблиц и построена по общепринятому плану, содержащему следующие разделы: введение, 3 главы (обзор литературы; материалы и методы; результаты и обсуждение), заключение, выводы и список литературы, насчитывающий 135 наименований, из которых 125 на иностранных языках.

Во введении автор раскрывает актуальность исследования, которая не вызывает ни малейшего сомнения. Описана степень изученности проблемы с упором как на общебиологические данные, так и на данные о дифференциации популяций, генетическом разнообразии, геногеографии и филогенетических связях изучаемого вида. Подобные исследования очень важны для работ по сохранению биоразнообразия, которое является одной из наиболее актуальных проблем современности. В своем исследовании автор не ограничился каким-либо одним биологическим направлением, но попытался решить целый ряд разноплановых задач – от зоогеографии до генетических исследований популяционной структуры и математического моделирования динамики миграционных потоков. Анализ предыдущих исследований позволил автору четко определить пробелы, существующие в данном направлении, сформулировать цель и поставить необходимые задачи для её достижения.

Первая глава работы, посвящена обзору литературы. В ней автор подробно освещает общую характеристику и систематику *Bos grunniens*. Описаны проблемы, связанные с современной классификацией яка, который принадлежит роду *Bos* трибы *Vovini* подсемейства *Vovinae* семейства *Bovidae*. Автор отмечает, что включение яка в род *Bos* достаточно спорно, поскольку по анатомическим признакам (количество рёбер, грудных, поясничных и копчиковых позвонков) он сильно отличается от других его представителей, что вызывает дискуссии о выделении яка в отдельный род *Poephagus*. Делается заключение о том, что на основании результатов современных исследований определенная часть научного сообщества склоняется к классификации дикого и одомашненного яков как двух подвидов *Bos grunniens*, рассматривая дикого яка в качестве предковой формы. В результате одомашненный як получил название *Bos grunniens grunniens*, а дикий як – *Bos grunniens mutus*. Подробно описывается время и место происхождения дикого яка и его предшественника и особенности миграционных процессов. Упоминается, что предок современного дикого яка

обитал на территории Китая, Непала, Сибири, Монголии и Аляски. По-видимому, дикий як обитал в Сибири, Монголии и Казахстане до XIII-XVIII веков, а domestикация дикого яка произошла на Цинхай-Тибетском нагорье пределах 10 тысяч лет тому назад.

Также рассказывается о распространении *Bos grunniens* и современной численности яка, оцениваемой в 14 млн голов. Описывается количество пород яка и упоминается о породе Datong, которая не обладает официальным статусом породы в связи с ограниченным количеством особей и получена путем гибридизации одомашненного и дикого яков. Говорится о разведении яков в России, представленных такими породами, как сарлык и окинская. Приводится подробное описание пород по данным Госреестра селекционных достижений, допущенных к использованию 2015 года.

Исследования *Bos grunniens* с использованием генетических маркеров содержит важные описания оценки генетического разнообразия, дифференциации популяций, географии, филогенетических связей между популяциями и систематического положения яка *Bos grunniens*. Приводятся работы по изучению межпопуляционных и межпородных связей, основанных на применении метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, анализа AFLP, VNTR, SSCP, анализа спектра межмикросателлитных повторов (ISSR) в популяциях яка и гибридов.

Хорошо описаны филогенетические исследования яка на основе мтДНК. Подробно говорится об особенностях митохондриальных геномов дикого яка и породах одомашненного яка со всеми необходимыми ссылками на соответствующие источники. На основании данных полной митохондриальной ДНК описывается время расхождения линий яка с указанием различных датировок. Также приводятся два возможных объяснения разделения на линии и время их разделения. Предложено два возможных объяснения наличия давно разделившихся линий. Отсутствие связи с географическим распределением можно объяснить тем, что як используется в качестве транспортного животного и, следовательно,

перемещается на большие расстояния, что размывает географические границы. Описываются причины более низкого разнообразия гаплотипов у одомашненного яка по сравнению с диким.

Хорошо расписаны данные по генетическому полиморфизму на основе микросателлитных локусов. Приведены примеры многочисленных работ по изучению популяций яка при помощи микросателлитных маркеров. Интересным представляется факт разведения яков в Швейцарии.

На основании представленного и хорошо написанного обзора литературы соискатель делает вывод, что имеющиеся данные говорят о высоком генетическом разнообразии одомашненного яка, происхождении современной популяции яка от предковой популяции с большой эффективной численностью, а также относительно недавнее разделение на породы и локальные популяции.

Прекрасно изложена глава о молекулярно-генетических основах адаптации яка к условиям высокогорья. Сообщается о длительной эволюции в геноме яка и механизмах адаптации к условиям высокогорья. В связи с этим человечество стремилось получить гибриды яка и домашнего скота в целях повышения выносливости последнего. Приводится пример об исторической интрогрессии, в ходе которой домашний скот из южного Китая и Тибетского плато быстро достиг необходимого уровня адаптации, приобретая ~ 2.93% и ~ 1.22% геномов бантенга и яка, соответственно. Говорится об одном из важнейших генов сигнального - *VEGF-A* (Vascular endothelial growth factor-*A*) - фактора роста эндотелия сосудов, участвующего в таких процессах, как ангиогенез, васкулогенез и деление сосудистых эндотелиальных клеток.

Следует отметить, что и к подготовке данной главы автор подошел весьма основательно, искусно объединив разрозненные литературные данные.

Во второй главе подробно описываются материалы и методы, используемые в работе. Говорится, что исследования выполнены в

лаборатории сравнительной генетики животных Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН с 2015 по 2018 годы. На базе лаборатории осуществлялось выделение тотальной ДНК, амплификация исследуемых фрагментов, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, электрофоретическое разделение ПЦР-фрагментов в агарозном геле и очистка ПЦР-продуктов, статистическая обработка данных и анализ полученных результатов. Секвенирование нуклеотидных последовательностей проведено в ЗАО «Евроген». Амплификация микросателлитных локусов и фрагментный анализ проводились в ООО «Гордиз». Автор информирует о том, где и когда собирались исследованные образцы, а также особенности их хранения. На рисунке 8 показаны районы исследования на карте России и Монголии. В таблице 2 приводится подробная характеристика 10 исследованных выборок из яководческих хозяйств с общим количеством образцов – 540. Что интересно и очень важно для понимания работы - для каждого района подробно описываются географические и климатические условия.

Четко прописаны методы: выделение ДНК, электрофоретическое разделение и очистка ПЦР-продуктов, анализ полиморфизма D-петли мтДНК, амплификация фрагмента D-петли мтДНК, секвенирование последовательностей D-петли мтДНК. Упомянуты пакеты программ для выравнивания исследуемых последовательностей, подсчёта частот гаплотипов, построения дерева гаплотипов, выбора модели молекулярной эволюции. Подробно описываются 15 микросателлитных локусов, собранных в мультиплексы. В таблице 3 указана характеристика всех микросателлитных локусов в составе мультиплексной панели. В разделе «Амплификация и фрагментный анализ» приводятся праймеры и их характеристики при амплификации, представленные в таблице 4. В разделе «Популяционно-генетический и математико-статистический анализ» описываются пакеты программ для анализа аллельного и генетического разнообразия, расчёта индексов фиксации и инбридинга, анализа генетической структуры

(кластерный анализ), графическое представление распределения аллелей среди выборок, математическая модель возможных миграций. Также говорится о методах генотипирования SNP g.8430T>C и g.14853G>A в гене *VEGF-A*, секвенирования целевых фрагментов гена *VEGF-A*, типирования SNP методом ПДРФ, типирования T>C в g.8430 и типирования G>A в g.14853 с протоколами проведения рестрикции. Отражено, что статистический анализ данных, подсчёт показателей гетерозиготности, индексов фиксации и инбридинга, тест на дифференциацию, а также тест на нейтральность Эванса-Ваттермана проводились в программе Arlequin 3.5.2.2., а поиск ассоциаций и корреляций SNP маркеров проводили в R- среде.

В целом, все используемые методы соответствуют поставленным автором задачам, описаны четко, подробно и обеспечивают возможную воспроизводимость полученных автором результатов другими исследователями.

Главу 3 «Результаты и обсуждение» можно считать ключевой в данной работе, в которой представлены собственные исследования соискателя. Насколько я понимаю, автором впервые был проведен анализ нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК и оценено гаплотипическое разнообразие у яков Саяно-Алтайского региона России и Монголии в сравнительном аспекте с гаплотипами из базы данных GenBank (дикий як, одомашненный як пород Tianzhu, Jiulong, Maiwa и Jinchuan). Правильность выводов автора относительно распределения гаплогрупп контрольного региона мтДНК, сделанных на основании собственных зоогеографических исследований, подтверждается сходством с результатами предшествующих работ.

Проведена оценка генетического разнообразия и сформировано представление о генетической структуре популяций яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона на основе полиморфизма микросателлитных локусов. Подробно и четко описан выбор панели наиболее информативных для настоящей работы микросателлитных маркеров и их возможная локализация

в пределах локусов количественных признаков. Для каждого локуса представлены все необходимые показатели (показатели аллельного и генетического разнообразия, индексы полиморфности, фиксации и инбридинга). Практически по всем заявленным в работе образцам получены результаты по всем микросателлитным локусам. Обнаружено низкое генетическое разнообразие у Яков из Республики Тыва, при сравнении с алтайской и монгольской популяциями. Стоит отметить, что результаты, полученные по микросателлитным локусам, сходны с результатами, полученными по данным полиморфизма фрагмента контрольного региона мтДНК. Проведен кластерный анализ на основании данных полиморфизма микросателлитных локусов, который выявил наличие трех генетических кластеров. Полученные результаты биологически обоснованы. Также рассчитана модель направленных относительных миграций между выборками, которая в целом согласуется и в определенной мере объясняет наблюдаемую генетическую структуру популяций.

Впервые исследован полиморфизм гена *VEGF-A*, индуцируемого высотой горного рельефа в ответ на гипоксию, у яков Саяно-Алтайского региона России и Монголии на основе SNP  $g.8430T>C$  и SNP  $g.14853G>A$ . Проведен анализ полиморфизма двух полиморфных сайтов (SNP) в гене *VEGF-A*. В результате автором генотипированы 477 яков из России и 120 из Монголии по позиции  $g.8430$  в гене *VEGF-A*. Показано, что частоты аллелей *T* и *C* в исследованных выборках значимо не отличаются. Для SNP  $g.14853G>A$  показано, что частота аллеля *A* в российских выборках в среднем значимо выше (0.39), чем в монгольских (0.31). Автор предполагает, что нуклеотид в данной позиции ассоциирован со стабильностью мРНК этого гена и обеспечивает лучшую защиту от гипоксии у яка. В данном разделе автор подробно и четко со всеми расчетами описывает возможное влияние полиморфизма гена *VEGF-A* на адаптацию яка к условиям высокогорья и приходит к логичному заключению, что существуют ассоциация и

корреляция между высотой горного рельефа и генотипом SNP *g.14853G>A* гена *VEGF-A* у яков Саяно-Алтайского региона России и Монголии.

В Заключении автор резюмирует полученные результаты и формулирует выводы диссертации, соответствующие поставленным соискателем задачам, которые полностью отражают содержание основных результатов исследований. Надеюсь, что данные исследования будут продолжены в целях сохранения генетического разнообразия уникального домашнего животного – яка, являющегося важнейшим источником существования многих народов Центральной Азии.

Несмотря на высокий уровень работы, имеются некоторые замечания.

На с. 4 в списке используемых сокращений «ПДРФ» расшифровывается 2 раза.

Также список сокращений необходимо полностью по возможности переводить на русский язык:

Например: FAO – Food and Agricultural Organization of United Nations «Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН»

Необходимо было перевести: DAD-IS – Domestic Animal Diversity Information System; EPAS1 - Endothelial PAS domain protein 1; ISAG – International Society for Animal Genetics; MCTP1 – Multiple C2 and transmembrane domain containing protein 1.

С. 5 строка 9 – не дописано слово противостоят «противостоят».

С. 8 строка 9 – нет точки в конце предложения.

С. 30 - не выровнен текст.

С. 42 – таблица 5, в которой оценены частоты нуль-аллелей, оказалась в главе «Методы и материалы», вместо главы «результаты».

С. 70 - нарушен порядок нумерации рисунков в работе. В тексте два раза встречается рисунок 16.

В данном подразделе неправильно сформулировано предложение: «На основании данных полной митохондриальной ДНК, а не только D-петли, называют другие цифры: около 420 000 лет назад разделились две главные

линии, а третья отделилась от них 580 000 лет назад». Первоначально отделяются более древние линии, а потом уже более молодые.

С. 46 - замечания к главе 3: почему не были генотипированы по участку D-петли все используемые в работе образцы, а только по 10 из каждой выборки, что сокращает возможность оценить гаплотипическое разнообразие и статистически верно сравнить выборки между собой?

С. 46 Для сравнительного анализа гаплотипов из базы данных GenBank NCBI были использованы последовательности D-петли мтДНК дикого яка – приводятся номера. К сожалению, не указано точное число использованных последовательностей D-петли для каждой породы. Эти данные должны быть представлены в главе «Методы и материалы». Не понятно, какое итоговое количество животных участвовало в расчётах.

Замечание к разделу 3.1.1.: нет сети гаплотипов, которая отражает исторические взаимосвязи гаплотипов в популяции и микроэволюционные процессы.

Почему исследовали по микросателлитным маркерам только 8 выборок, а не 10 как представлено в таблице 2? В работе не представлены данные по выборкам из Монголии и Бурятии.

Автор утверждает на странице 55, что в породе «Сарлык» в Республике Тыва не обнаружено гаплогруппы С, что, по моему мнению свидетельствует о снижении гаплотипического разнообразия, поэтому фраза на странице 65: «... этот эффект (имеется ввиду снижение разнообразия) не был замечен на материале D-петли мтДНК...» - вызывает сомнение.

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

Автореферат адекватно отражает содержание диссертации.

В целом, нет сомнений в чрезвычайно высокой оценке работы. По своему уровню работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям. В этом убеждает глубокий анализ материала, высоко профессиональное и подробное описание как применяемых методик так и биологии изучаемого вида. Выполненная работа по содержанию, объему фактического материала, научной и практической значимости представляет собой фундаментальное исследование в изучении пространственной популяционно-генетической организации яка. Исходя из научной и практической значимости поставленных задач, методологических подходов к их решению и полученных результатов работа Н.Ю. Оюн полностью соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискания ученой степени кандидата наук, а сам её автор, Надежда Юрьевна Оюн, достойна присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Ведущий научный сотрудник  
Отдела молекулярной генетики  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО»)  
кандидат биологических наук

Светлана Юрьевна Орлова

107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, д.17, тел. +7(499)2649110  
Вебсайт <http://www.vniro.ru>  
Email: [kordicheva@rambler.ru](mailto:kordicheva@rambler.ru)

03.12.2018

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО»)  
Кандидат технических наук



М.В. Сытова