

ВІДГУК

на дисертаційну роботу **ШЕЛЬОВА Андрія Володимировича** «**Поліморфізм генетичних ресурсів тварин за мікросателітними локусами ДНК**», представлену на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

У тваринництві будь-якої країни генетичні ресурси є одним із найдорожчих і стратегічно найважливіших багатств, адже інтенсифікація систем виробництва має тенденцію до зменшення кількості порід та звуження їхнього різноманіття. Раціональне використання племінних ресурсів сільськогосподарських видів тварин України безпосередньо пов'язано з розробкою і впровадженням комплексної системи молекулярно-генетичної оцінки тварин. Вітчизняні генофонди порід свійських тварин різних видів залишаються майже недослідженими відносно особливостей генетичної структури за мікросателітними локусами. Виходячи з цього, теоретичне обґрунтування та експериментальне відпрацювання системи використання поліморфізму мікросателітних локусів ДНК з метою оцінювання і прогнозування мікроеволюційних процесів в популяціях різних видів тварин в рамках програм збереження їх біорізноманіття, а також дослідження генетичної структури популяцій на різних рівнях організації геному мають суттєве теоретичне та практичне значення і безумовно є актуальними.

Робота виконувалась з 2010 по 2020 роки, як складова частина науково-дослідних робіт відділу молекулярно-діагностичних досліджень Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України та лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН.

Метою дослідження було теоретичне обґрунтування і експериментальне відпрацювання системи використання поліморфізму мікросателітних локусів ДНК з метою оцінювання генетичних ресурсів різних видів тварин в рамках програм збереження їх біорізноманіття.

Об'єктом досліджень була мікросателітна мінливість в популяціях тварин різних видів, а предметом – поліморфізм та інформативність мікросателітних локусів ДНК, особливості генетичної структури мікропопуляцій свійських видів в системі збереження біорізноманіття та раціонального використання генофондів тварин.

У дисертаційній роботі використані молекулярно-генетичні, популяційно-генетичні та біометричні методи.

У вступі викладено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, наведено дані про особистий внесок здобувача, узагальнені дані про апробацію результатів дисертації та публікації, обсяг та структуру дисертації, а саме: рукопис викладено на 396 сторінках комп'ютерного тексту, містить 120 таблиць та 106 рисунків, список використаних джерел налічує 697 посилань. Роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із вступу, восьми розділів, висновків, рекомендацій виробництву, списку використаних джерел та додатків. На початку роботи наведено анотацію українською та англійською мовами є перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень і термінів.

У огляді літератури, **розділ 1**, висвітлено сучасне бачення біологічного різноманіття як складової біосфери, генетичного різноманіття в системі збереження генетичних ресурсів та окреслене значення та методи оцінки генетичного поліморфізму. Окремий підрозділ описує сучасний стан розвитку генетичних маркерів їхніх властивостей та області застосування. Значна частина огляду літератури присвячена характеристиці мікросателітних локусів в дослідженнях генофондів свійських тварин: великої рогатої худоби, коней, собак та курей. Закінчується огляд літератури обґрунтування напряму власних досліджень. Об'єм розділу склав 51 аркуш.

У **розділі 2** «Загальна методика та основні методи досліджень» зазначено час та місце проведення досліджень. Експериментальну частину робіт виконано у 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. Для проведення досліджень використовували біологічний матеріал від свійських тварин 4 видів, 9 порід, 5 кросів загалом 901 особина. А саме: 133 голови великої рогатої худоби, порід українська червоно-ряба молочна (45 голів), українська чорно-ряба молочна (43 голови) та сіра українська (45 голів) (підприємство релігійної організації «Підсобне господарство Свято-Успенської Києво-Печерської лаври», с. Вороньків, Київська обл. та Банку генетичних ресурсів Інституту розведення і генетики тварин імені М.В. Зубця НААН України); 281 голова коней, порід гуцульська (ПФГ «Полонинське, Закарпатська обл., ПР ТзОВ «Варто», ПР СФГ «Заріччя», СОК «Сільський господар», Івано-Франківська обл., 78 голів), чистокровна верхова (приватні власники, 51 голова) та українська верхова (приватні власники, члени АСРКУ, 152 голови); 79 голів собак, порід німецька вівчарка (приватні власники, члени ФСССУ, 39 голів), німецький дог (приватні власники, члени ФСССУ, 20 голів) та російський той-тер'єр (приватні власники, члени ФСССУ, 20 голів); 408 голів курки свійської спеціалізованих яєчних кросів, найбільш поширених в Україні, а саме «Ломанн ЛСЛ» (ВАТ «Птахофабрика «Україна», Васильківський р-н, Київська обл., ЗАТ «Птахофабрика «Київська», Броварський р-н, Київська обл., 100 голів), «Ломанн коричневий» (ЗАТ «Птахофабрика «Київська», Броварський р-н, Київська обл., 83 голови), «Хайсекс білий» (ВАТ «Птахофабрика «Україна», Васильківський р-н, Київська обл., ВП НУБіП України НД ППЗ ім. Фрунзе, АР Крим, 122 голови), «Хай-Лайн W-98» (ВАТ «Птахофабрика «Україна», Васильківський р-н, Київська обл., 22 голови), «Хайсекс коричневий» (ВП НУБіП України НД ППЗ ім. Фрунзе АР Крим, 81 голова). Також представлено загальну схему досліджень. У цьому ж розділі зроблено перелік приладів з використанням яких здійснено дослідження. Надано вичерпну інформацію щодо мікросателітних маркерів використаних у роботі, а саме: хромосомна локалізація, можливий розмір алелів, структура мікросателітної послідовності

та олігонуклеотидних праймерів. На використанні методи досліджень та комп'ютерні програми зроблені відповідні посилання.

Розділ 3 «Результати власних експериментальних досліджень» присвячений оптимізації техніки ДНК-типування, яке полягало у виборі мікросателітних локусів ДНК, підборі та оптимізації умов ПЛР, розробленні мультиплексів для STR-PCR. Закінчується розділ висновками. Матеріали досліджень розділу викладено у 8 наукових публікаціях.

Наступні розділи дисертаційної роботи присвячені аналізу отриманих експериментальних даних.

Так у **розділі 4** «Алелофонд та генотиповий поліморфізм генетичних ресурсів тварин різних видів за мікросателітними локусами ДНК» за однією схемою описані структури алелофонду та генотипова мінливість 4х видів тварин. Трьох порід великої рогатої худоби – українська червоно-ряба молочна, українська чорно-ряба молочна та сіра українська з використанням 10 мікросателітних локусів. Трьох порід коня свійського – гуцульська, британська чистокровна та українська верхова з використанням 11 мікросателітних локусів. Трьох порід собаки свійської – німецька вівчарка, німецький дог та російський тойтер`єр з використанням 5 мікросателітних локусів. П'яти промислових кросів курки свійської – Ломанн білий, Ломан коричневий, Хайсекс білий, Хайсекс коричневий та Хайлайн білий з використанням 5 мікросателітних локусів. Вісімнадцять висновків підсумовують розділ. Матеріали досліджень розділу викладено у 29 наукових публікаціях.

Наступний **розділ 5** «Популяційно-генетичні особливості формування генофондів досліджених видів» побудований теж з використанням однієї схеми викладення результатів дослідження для 4х видів тварин. Підсумовують розділ тринадцять висновків. Матеріали досліджень розділу викладено у 25 наукових публікаціях.

У **розділі 6** «Аналіз мікроеволюційних процесів у популяціях представників видів *Bos taurus*, *Equus caballus*, *Canis familiaris*, *Gallus*

domesticus» викладено результати аналізу генетико-автоматичних процесів в популяціях різних порід великої рогатої худоби, коней, собак та курки свійської. Підсумовують розділ десять висновків. Матеріали досліджень розділу викладено у 2 наукових публікаціях.

Розділ 7 «Аналіз і узагальнення результатів досліджень, порівняльний аналіз внутрішньовидових та міжвидових особливостей генетичного поліморфізму на різних рівнях організації геному» присвячений визначенню особливості внутрішньо-таксономічного поліморфізму різних видів свійських тварин та аналізу особливостей генетичного поліморфізму у різних видів свійських тварин. Підсумовуючи дослідження цього розділу дисертант робить висновок, що за всіма дослідженими нами видами мала місце подібність генетичних процесів в породах, про що свідчать однакові діапазони та межі розмаху спектрів алельного і генотипового поліморфізму та практично однакові, профілі індивідуальної гетерозиготності. Показано, що для усіх досліджених видів розподіл частот виявлених алельних варіантів відповідав покроковій мутаційній моделі (SMM), вона була більш адекватною для апроксимації рівня алельного різноманіття за всіма, без виключень, дослідженими мікросателітними локусами, в порівнянні з моделлю IAM ($p < 0,001$).

Останній розділ 8 присвячений оцінці інформативності різних мікросателітних маркерів та визначенні можливості їх застосування у молекулярно-генетичних дослідженнях різних видів тварин. Дисертант робить узагальнюючий висновок, що серед досліджених 26 мікросателітних локусів ДНК з динуклеотидною структурою найвищий рівень інформативності було зафіксовано за локусами з основними коровими мотивами (AC) та (TG). Серед 5 досліджених тетрануклеотидних послідовностей які досліджувались у представників *Canis familiaris* найвищий рівень інформативності демонстрували локуси з послідовностями (GAAA) та (CTTT), причому піримідинові послідовності мали більший розмір ампліконів (222-248 пн.) ніж пуринові (174-202 пн.). Виявлені відмінності на думку Андрія

Володимировича є характерними особливостями мікросателітів з терануклеотидною структурою корового мотиву. Матеріали досліджень розділу викладені у одній науковій публікації.

Висновки роботи Шельова Андрія Володимировича, обґрунтовані, логічно витікають з експериментальних даних. Вони викладені досить чітко, лаконічно та ясно.

Пропозиції виробництву стосуються лабораторій, що використовують молекулярно-генетичні методи досліджень тварин, яких у нашій державі на превеликий жаль дуже мало. На мою думку, матеріали дисертації можуть використані у освітньо-професійних програмах «Генетика з основами селекції» при підготовці фахівців в профільних установах.

Суттєвих зауважень щодо наукової частини рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. Проте, не можу не зробити деякі зауваження та задати ряд запитань.

Зауваження стосовно загальноприйнятих правил написання слів та речень:

1. На сторінці 71 фрагмент тексту має ознаки невідредагованого комп'ютерного перекладу: «Загальна ймовірність виключення 17 мікросупутникових локусів становила 0,9999, або 99,99%»;
2. Слова латинською мовою слід писати курсивом: «*Bos indicus*» ст. 65, «*Aves*», «*in situ*» ст. 78;
3. На сторінці 75: «А. Радко та Є. Слота повідомили про поліморфізм польської популяції хортів породи Борзая, оцінений за 19 мікросателітними локусами [500]». На українській мові хорт на російській – борзая.
4. Сторінка 89: «1. Відбирали і маркірували необхідну кількість пробірок об'ємом 0,2 мл;» і «2. По 10 мкл готової реакційної суміші (табл. 2.2) розносять в чисті пробірки;» Неузгоджені в часі речення порядку проведення досліджень.

Зауваження стосовно оформлення дисертаційної роботи:

5. В огляді літератури зустрічаються фрагменти тексту, які мають вигляд набору цитат, наприклад стор. 36: «Управління генетичним різноманіттям всередині популяції є ключовим фактором будь-якої програми збереження породи з метою захисту генетичних ресурсів тварин [10]. Визначення генетичних варіацій в межах видів є важливим кроком в напрямку збереження генетичних ресурсів [11]. Розуміння того, як генетична варіація розподіляється в межах популяції, є важливим і корисним для розробки стратегій розмноження та програм збереження [38]. Основна мета захисту генетичних ресурсів у рамках національної програми полягає у підтримці необхідного неспорідненого зв'язку та максимально можливого генного різноманіття [29]».

6. На одному рисунку 4.22 «Розподіл генотипів у великої рогатої худоби за 10-ма локусами мікросателітної ДНК» зображено 30 графіків розміщених на сторінках 128-130. Таблицю, малюнок або креслення, розміри якого більше формату А4, враховують як одну сторінку і розміщують у відповідних місцях після згадування у тексті або в додатках. Теж саме, рисунок 4.23 «Потенційний розподіл генотипів у дослідженого поголів'я великої рогатої худоби по 10-ом локусам мікросателітної ДНК за параметричним методом rarefaction-curves» займає об'єм сторінок 131-132. Теж саме рис. 4.48 «Розподіл генотипів у дослідженого поголів'я коней за 11-ма локусами мікросателітної ДНК» розміщений на сторінках 163-165 та рис. 4.49 «Розподіл генотипів у дослідженого поголів'я коней по 11 локусам мікросателітної ДНК (rarefaction-curves)» на стор. 165-167.

7. Графік на Рис. 7.1 «Інтенсивність потоку генів у різних видів свійських тварин» дублює Рис. 5.2 «Інтенсивність потоку генів в породах великої рогатої худоби», Рис. 5.8 «Інтенсивність потоку генів в породах коней», Рис. 5.14 «Інтенсивність потоку генів у породах собак» та Рис. 5.20 «Інтенсивність потоку генів в кросах свійської курки», а графік на Рис. 7.2 «Генотипова мінливість різних видів свійських тварин» дублює Рис. 5.3 «Генотипова

мінливість великої рогатої худоби», Рис. 5.9 «Генотипова мінливість коней», Рис. 5.21 «Генотипова мінливість свійської курки».

Зауваження стосовно вживання термінів, понять, назв:

8. У розділі на стор. 42 вказано: «Уже зникло 16 вітчизняних порід і породних груп (14,3% світового списку) 5-ти видів сільськогосподарських тварин, а саме: 4 породи коней — германо-бессарабська, ногайська, стрілецька та тарпан; 3 породні групи свиней — дніпровська, кролівецька, подільська та українська локальна популяція європейської коротковухої свині». Дисертант оперує застарілими даними, у серпні 2018 року єдине племінне стадо миргородської породи свиней було ліквідовано через спалах АЧС.

9. На сторінці 62 у тексті: «Незважаючи на високу популярність SSRP-методу, він має певні недоліки», вочевидь мова йде не про довідкову, або референсну панель конкретного дослідження (англ. *Study-specific reference panel* – SSRP), що стає зрозумілим тільки після ознайомлення з посиланням – дисертацією Дубініна Олексія Вікторовича «Генетична диференціація геномів за маркерами ISSR-PCR та RAPD-PCR».

10. В дисертаційній роботі існує певний дуалізм у характеристиці мікросателітів: «Однак, деякі мікросателіти перебувають під впливом штучного відбору і, отже, не є повністю нейтральними» сторінка 68, та «Оскільки мікросателітні локуси є селективно-нейтральними, вони не піддаються дії природнього відбору» сторінка 74.

11. На стор. 76 читаємо, «Це зменшення було особливо вираженим у породи хорт [503]». Хорти не порода, а група порід мисливських собак, для полювання на звірів без рушниці. У згаданій статті мова йдеться про породу грейгаунд (англ. *Greyhound*).

12. Невдало термін частота алелів замінено на такі слова, як «наймасовіший», «найменш масовим», «найпоширенішим» та «найрідкіснішим».

13. В дисертації не вірно названо термін Ефективна кількість алелів (A_e) (англ. *Effective number of alleles*). Так на сторінках 4, 24, 98, 308 цей термін визначається, як «кількість ефективних алелів».

14. Терміни «Ефективна чисельність різних порід», «Ефективна чисельність популяції (N_e)» названі невірно, вірно Ефективний розмір популяції (англ. *Effective population size*).

Запитання по темі дисертаційної роботи:

15. У чому полягає запропонована комплексна система використання поліморфізму мікросателітних локусів ДНК в системі оцінювання генетичних ресурсів популяцій різних видів свійських тварин?

16. Нуклеотидна послідовність якого олігонуклеотидного праймера з 52 використаних у дисертаційній роботі, відрізняється від послідовностей Панелі маркерів рекомендованих ISAG для перевірки батьківства (англ. *Recommended ISAG panels of markers for parentage verification*) [https://www.isag.us/Docs/consignmentforms/02_PVpanels_LPCGH.doc]?

17. Що таке вага ампліконів, що таке низька вага, а що таке велика вага, що таке «найлегші» та «найважчі» амплікони та чи правомірно вживати таку оцінку нуклеотидних послідовностей у наукових публікаціях?

18. Доцільним було б оцінити адекватність IAM та SMM окремо для мікросателітних локусів з досконалою та недосконалою структурою.

19. «Вибірка особин кросу Ломан білий (ЛБ) знаходиться в стані близькому до стану генетичної рівноваги, свідченням чого є значення індексу фіксації ($F=0,135$) та виявляє тенденції до подальшої стабілізації». З таблиці 5.33 «Популяційно-генетичні характеристики досліджених локусів свійської курки кросу Ломан білий (ЛБ)» стор. 253 видно, що тільки завдяки одному мікросателітному локусу MCW248 з індексом фіксації ($F=0,912$) досягнуто стан близький до генетичної рівноваги. При виключенні з обрахунків локусу MCW248 індекси фіксації набуває від'ємного значення ($F=-0,059$), що вказує на інбридинг. З чим пов'язане надзвичайно велике значення індексу фіксації ($F=0,912$) локусу MCW248 серед вибірки особин кросу Ломан білий?

Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною одержаних експериментальних даних і достовірністю та новизною висновків.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді 39 наукових праць, з них, 1 монографія, 19 публікацій у фахових виданнях України, 3 публікації у закордонних виданнях або які включені до міжнародних наукометричних баз, робіт апробаційного характеру – 5, праць, що додатково відображають наукові результати дисертації – 11 (з яких 5 методичних рекомендацій та 1 каталог).

За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та наведеним ілюстраціями дисертаційна робота «Поліморфізм генетичних ресурсів тварин за мікросателітними локусами ДНК», заслуговує позитивної оцінки. Вона відповідає сучасному рівню генетичних досліджень і вимогам постанови КМУ України від 24 липня 2013 року №657 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор – Шельов Андрій Володимирович заслуговує присудження йому пошукового наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика.

Завідувач відділу фізіології та здоров'я тварин

Інституту свинарства і агропромислового

виробництва НААН України,

доктор сільськогосподарських наук  К.Ф. Почерняєв

Я, Смыслов С.Ю. заступник директора з наукової роботи,
Інституту свинарства і АПВ НААН України,
засвідчую справжність підпису Костянтина Федоровича Почерняєва,
який зроблено у моїй присутності.

29 квітня 2021 року  С.Ю. Смыслов /