

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Блохиной Нины Васильевны на тему

«Использование ДНК-маркеров для идентификации, сохранения и развития генетических ресурсов коневодства Российской Федерации», представленной на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 06.02.07 — разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

Актуальность темы для разработки современных аспектов и приёмов разведения лошадей бесспорна. Проведённые исследования расширяют круг и вовлекают новые факторы, которые характеризуют генетическую изменчивость. Они охватили как широко распространённые, так и локальные породы, обобщённые по классификации направлений использования. По всем странам мира продолжают исследования генома животных. Международные стандарты и требования на рынке продукции коневодства обеспечили приоритет этих исследований в коневодстве Российской Федерации.

Вместе с тем, сокращение поголовья большинства пород, экономика конных заводов потребовала расчёта оптимальных данных по числу структурных единиц, а также определения круга проблем, связанных с инбридингом, объективной оценкой генетиками степени допустимой гомозиготности по контролируемым локусам. При этом конкуренция, а с нею и совершенствование племенных качеств, продолжает оставаться главной задачей в спортивном коневодстве. Разрабатываются программы по сохранению генофонда локальных отечественных пород.

Определение ресурсов в отдельных породах уже не обходится без использования генетических параметров, которые определяются, в том числе, по ДНК-технологиям. Это касается данных эволюции признаков при взаимодействии популяций и пород лошадей. База исследований уже сегодня предполагает возможность управления движением поголовья, применением новых способов воспроизводства под генетическим контролем.

Основной целью исследований являлось проведение комплексного анализа пород лошадей Российской Федерации с использованием молекулярно-генетических маркёров, определение уровня разнообразия и генетической структуры популяций, их эволюционных характеристик с дальнейшим раскрытием возможности масштабного улучшения полезных признаков у лошадей при выполнении Программы их селекции.

Достоверность и обоснованность научных положений и рекомендаций, приведённых в диссертации.

Исследования выполнены сотрудником лаборатории генетики Всероссийского научно-исследовательского института коневодства, а также сертифицированной лаборатории «Изоген» г. Москва с использованием реагентов «ExtraGene DNA Prep 200» и набора праймеров отечественного производства Equine-STR (ООО «Гордиз», г. Москва). Лаборатория оснащена амплификатором Biosystems USA и программами GeneMapper™ V.4.0. Стандартизация

STR-профиля осуществлялась в сравнительных международных испытаниях (Horse Comparison Tests), аллели обозначали и сверяли по стандартизированному международному алфавитному коду. Используемые показатели рассчитаны по формулам генетико-популяционного анализа, используемого в мировой и отечественной практике с помощью программ для компьютеров MS Excel 2010; FSTAT ver. на достаточном поголовье (n=20559). Определение новых гаплогрупп в мт ДНК проводили с использованием программ BioEdit Sequence Mega 7. Генотипы миостатина, DMRT3 проводили по апробированным авторским методикам.

Это позволяет заключить о высоком научно-методическом уровне и достоверности проведённых исследований. Объектом исследований являлся генетический материал лошадей из племенных хозяйств по документально оформленным описям, использовались в анализе данные от достоверного по родословным поголовья.

Теоретическая и практическая обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций производству подтверждается результатами анализа таблиц, рисунками, сопровождающими генетико-популяционный анализ. Полученные результаты внедрены в конных заводах, разводящих данное поголовье исследованных лошадей, соблюдалась репрезентативность выборок.

Автором интегрированы зоотехнические, генетические и физиолого-биохимические анализы в единую методологию исследований.

Научная новизна исследований выделена в диссертации и в соответствующей позиции автореферата. Впервые в Российской Федерации проведена сравнительная оценка полиморфизма лошадей 30 пород по 17-ти микросателлитным локусам ДНК. Одновременно осуществлялась паспортизация животных, подтверждены родословные и рассчитаны филогенетические связи между породами различного направления разведения. Выявлены приватные аллели по микросателлитам и гаплотипы мт-ДНК. Проведена структуризация поголовья по семействам, показаны пути генетической сертификации и идентификации лошадей с неизвестными родословными.

Впервые изучен полиморфизм генов MSTM и DMRT3, а также распространение GYS1 — мутации гликогенсинтазы, нарушающей работу мышц.

Рассмотрены аспекты внутривидового инбридинга, связанного с уровнем гомозиготности по ДНК микросателлитам и влияния линейного (по родословной) инбридинга у лошадей орловской рысистой, чистокровной верховой пород, определены коэффициенты корреляции этих показателей. Подробно изучена структура микросателлитов у лошадей чистокровной верховой породы за три десятилетия, сохранение генофонда в условиях интенсивной интродукции форм генов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследований расширили теоретическую базу аспектов использования резерва гетерозиготности при совершенствовании работоспособности и спортивных показателей лошадей.

Генетический мониторинг позволяет увеличить поголовье с желательными генотипами, идентифицировать потомство по линиям и семействам,

максимально нивелировать формы мутантных генов. Данные диссертанта подтвердили факты истории выведения пород, перемещения поголовья. Предпринята попытка более точного освещения эволюционных аспектов и взаимодействия пород и предположений о географических точках одомашнивания лошадей. В условиях ограничения поголовья рассмотрен вариант разведения с использованием генетического мониторинга при отдалённом и комплексном инбридинге. Созданы предпосылки детального изучения роли форм генов в онтогенезе и гомозиготности генотипов в условиях направленных векторов селекции, сохранения здоровья и репродуктивных функций и др.

Доказаны различия в генеалогической структуре пород и генетические особенности по исследованным локусам, рассчитаны общий уровень полиморфизма, величины генетических дистанций. Подчёркнута эффективность разведения по линиям и возможность мониторинга за микросателлитами на примере лошадей чистокровной верховой породы.

Представлены приватные митотипы по контрольному участку D-петли митохондриальной ДНК, которые подтвердили уникальность отдельных пород, разводимых на территории России.

В практической работе использован полиморфизм микросателлитов для определения достоверности происхождения, выявлена высокая встречаемость, по мнению автора, «негативной» мутации в гене гликогенсинтазы у тяжелоупряжных пород. Сравнительно высокий полиморфизм обеспечивает резерв для условий отбора лучших генотипов в конных заводах России и призовых лошадей за рубежом. Специалисты лаборатории генетики обеспечивают отрасль сравнимыми факторами, расчётами показателей для членов Евразийского Союза.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа изложена на 271 странице, включая библиографический список, состоящий из 509 источников, из них 280 на иностранных языках, 43 таблицы и 7 Приложений. Её содержание в полной мере соответствует теме, включает традиционные разделы.

К защите представлен завершённый научный труд, выполненный на высоком научно-методическом уровне. Диссертация хорошо оформлена, написана грамотным языком, легко читается, производит приятное впечатление.

Обзор литературы, содержащий 5 разделов всесторонне подводит к решению поставленных задач, охвачены проблемы исследования ДНК ядерной и митохондриальной. Рассмотрен современный подход специалистов к роли генетического мониторинга при совершенствовании племенных животных, в том числе в коневодстве по ликвидации наследственных болезней, по особенностям рабочих и спортивных качеств лошадей отдельных пород; дан перечень возможностей селекции по геному лошадей, однако использования практического примера ещё недостаточно.

Считаю необходимым отразить два негативных момента обзора литературы, а также логистики и методов генетико-популяционного анализа по породам лошадей. Ход текущих исследований генетического полиморфизма

подготовлен предшествующими учёными, в том числе из СССР и СНГ. Показаны работы А.М. Машурова, Н.С. Марзанова, Н.Г. Букарова, но нет ссылок на разработки доктора наук, сотрудницы института коневодства Р.М. Дубровской. Все они, в коллективе авторов, концептуально разработали не только определение и роль, но и практически внедрили основополагающие позиции генетического мониторинга в селекцию основных видов сельскохозяйственных животных (Премия Правительства РФ 2002 года). Соискателем указаны авторы работ 2004 – 2021 гг., которые дублируют разработанные ранее способы и постулаты в свои работы, не являясь авторами разработок по использованию генетических маркеров в селекции. Второе замечание: не вполне критически выглядит подход к публикациям, связанным с геномным анализом, а также его недостаточным использованием в практике селекции. Автором перечислены возможные пути т.н. «геномной селекции» без примеров. Например, предварительная геномная оценка быков-производителей (2008 г.) пока носит весьма низкий уровень достоверности (а нередко и отрицательный) по фактическим показателям их оценок по качеству потомства. Она пока неприемлема в практике их отбора для широкого использования в племенных хозяйствах. Это относится как к оценкам зарубежных учёных, так и отечественных.

Предстоит длительная работа по совершенствованию оценок по геному, а насаждение терминов «геномная оценка», «геномная селекция» является поспешным. Утверждение, что они «весьма значимы» с позиции совершенствования признаков животных и экономики отрасли допустимо с приставкой «возможно».

Раздел «Материал и методы исследований» представлен в безупречной форме. На мой взгляд, единственной помаркой является схема, в части отсутствия её выхода на апробацию в конезаводстве, то есть предполагались исследовательские работы для «Программ селекции». Или конечным итогом исследований являлись «не генетические методы совершенствования лошадей», а больше теоретические программы.

Раздел «Результаты собственных исследований» изложен в логической последовательности. Анализ частотных характеристик аллелей интегрирован с эволюционным аспектом по породам, представлено убедительное мнение Н.В. Блохиной об истории и центрах одомашнивания, показано взаимодействие центров разведения с позиции наличия микросателлитов и мт-ДНК отечественных и зарубежных пород. Материалы проиллюстрированы 44 рисунками и фотографиями, отражающими объективность «Заключения», «Выводов» и «Предложений автора».

Существенной научной новизной является не только вскрытие дрейфа форм генов, но и выделение 5 новых гаплотипов редко встречающихся групп K и F для дикой лошади Пржевальского, у бурятской лошади — T, Y, Z-гаплогрупп, которые не входили в стандартные перечни; то же в матричной структуре хакасской лошади. В филогенетическое древо мировых пород автором внесены гаплогруппы мт-ДНК лошадей, разводимых в России.

Важное внимание уделено генетико-популяционному анализу по комплексу локусов, где центральное внимание уделено общей гомозиготности и линейному инбридингу, а также сохранению генофонда. Анализ ясно показал необходимость дальнейшей глубокой проработки кибернетиками базы данных с позиции гомозиготности по STR-локусам, которая достигала 30% и более.

На примере системы разведения чистокровных верховых лошадей, искателем показана первостепенная роль сохранения генофонда с участием линий. Рост степени инбридинга ассоциировали с показателями воспроизводства, сроками их «плодовой деятельности». Автор убеждён, что в будущем гомозиготность по STR-локусам может служить критерием среди факторов селекции.

Следует отметить подход диссертанта к определению «дефектности генов», когда в культурных породах, например, першеронской, PSSM1 имел частоту 0,900, а в башкирской — 0,016.

Как неизбежное рассматривается подбор с использованием комплексного инбридинга при обязательном слежении за уровнем гомозиготности в локусах микросателлитов. Аналогичное предполагалось скотоводами в локальных популяциях костромской, сучёвской, ярославской, чёрно-пёстрой и в других породах, но здесь в роли контроля инбридинга выступали аллели EAB-локуса. Различия линий лошадей по спектру аллелей гомозиготных локусов структурных генов проводилось Л.А. Храбровой (2011 г.).

Заключение и научные выводы вытекают из доказанных положений в разделах диссертационной работы. Они объективно отражают суть экспериментального материала. Досадно, что выводы 1, 2, 4 и 5 не подкреплены цифровыми данными, которые остались в рамках таблиц и поэтому они носят несколько декларативный характер. Так, выявлено 16 новых аллелей в 17 микросателлитных локусах, которые не представлены в выводе 2 и др. Доказательством существенности и внедрения предложений в производство служат собственные исследования многочисленного поголовья пород. Однако в п. 4 не обозначены конкретные позиции того, что следует считать «генетическим грузом». Вполне можно предположить, что в их числе окажутся полезные аллели, в том числе, маркирующие генетическое многообразие, которое следует учитывать при расчётах уровней индивидуальной, либо групповой гетерозиготности. Факты свидетельствуют о необходимости исследований функций генов и активности во все периоды онтогенеза, определения оптимального числа одновременных признаков селекции, их взаимодействия.

В тексте имеются ошибки и неудачные (жаргонные) выражения на страницах 37, 48, 50, 164, 176, 182, 188, 195, а также неоднообразное написание знака уровня достоверности.

Считаю необходимым высказать ряд замечаний.

1. При характеристиках генотипов культурных, распространённых пород привлечён термин «дефект» в гене PSSM1 (стр. 173), который повторен в выводе №18. На стр. 189 автором замечено противоречие по содержанию

MSTN C и T у спортивных лошадей и, таким образом, подтверждена (осталась незамеченной) общебиологическая значимость и, главное, — превосходство по некоторым параметрам гетерозигот. Предполагаю, что это не «дефект», а нормальная структура в геноме лошадей этих пород. Докажите обратное, или аллели с частотой 0,016 – 0,9000 действительно следует элиминировать отбором как «дефект»!?

2. Практикой животноводства всесторонне показаны пути и факты отрицательной роли инбридинга и его положительных сторон при направленном подборе пар. Расчёт корреляций между коэффициентами, индексами, повторяемостью, разнонаправленных по сути вычисления, ведёт объяснение фактов в тупик, а не к совершенствованию продуктивных и племенных качеств лошадей. Он удобен лишь для «Программ» и маскировки проблемы малочисленности популяции и, таким образом, оправдания близких степеней инбридинга из-за обстоятельств, возникающих в определённых условиях?

3. Выполнение исследований и достижение, собственно, цели исследований диссертанта было направлено на внесение в пункты Программ селекции пород и отдельных популяций уровней показателей или наименований генетических факторов, обязательных к выполнению. Приведите примеры интеграции зоотехнических и генетических методов по совершенствованию Вами животных.

4. В соответствии с обзором литературы, собственными данными, предложениями производству п.3 и п.4, раскройте примерами последние два положения, выдвигаемые на защиту: *«методов детекции наследственных аномалий лошадей»*; *«методов повышения эффективности использования молекулярно-генетических маркеров в селекции лошадей»*.

Данные замечания не снижают ценности проведённых исследований, которые в нашей стране носят пионерский характер. Возникшие вопросы и поставленные задачи, в полной мере, будут решены с участием соискателя в дальнейшей работе.

Соответствие содержания автореферата диссертации, уровень отражения полученных результатов в печати

Основные научные положения, выводы и практические рекомендации, приведённые в диссертации, нашли достаточно полное и объективное отражение в 57 опубликованных работах, в том числе 10 в журналах, индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science, в зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Кроме того, в соавторстве издано «Практическое руководство по использованию микросателлитов ДНК при генотипической оценке лошадей» (Л.А. Храброва, В.Н. Блохина, 2012). Оно носит теоретический и прикладной характер и заняло достойное место для подготовки специалистов по изучению полиморфизма ДНК лошадей. В соавторстве получено два свидетельства о регистрации базы данных RU 2016621345 (2016) и RU 2016620649 (2016) «Результаты молекулярно-генетического анализа лошадей».

Результаты исследований в 2018 – 2021 гг. апробированы на 8 Международных научно-практических конференциях, проходивших в Российской Федерации.

Ознакомление с содержанием автореферата даёт основание предположить, что теоретическое и практическое обоснование материала, представленного в диссертации, нашло в нём достаточное отражение.

Заключение

Считаю, что представленная к защите диссертационная работа по актуальности темы, научно-практической значимости, объёму и глубине проведённых исследований отвечает требованиям пунктов 8, 9, 10, 12 и 13 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями от 01 октября 2018 г.), а её автор Блохина Нина Васильевна заслуживает присвоения учёной степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 06.02.07 — разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных.

Доктор биологических наук (06.02.01),
профессор, главный научный сотрудник
отдела генетики, разведения
сельскохозяйственных животных и
технологий животноводства
ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
гражданин Российской Федерации

Николай Александрович Попов

Подпись главного научного сотрудника Попова Н.А. заверяю.

Учёный секретарь Учёного Совета
ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
кандидат сельскохозяйственных наук



Н.В. Сивкин

Попов Николай Александрович,
142132, Московская область,
Г.о. Подольск, п. Дубровицы, д. 60,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста» (ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста),
телефон +7 (916) 682-99-84,
E-mail: genetic-pna@yandex.ru
04 апреля 2022 года