



ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ, АГРАРЕН ФАКУЛТЕТ

РЕЦЕНЗИЯ

От проф. д-р Светлана Йорданова Георгиева,
Тракийски университет, Аграрен факултет;
Научна специалност - Генетика

Относно: Дисертационен труд за присъждане на научна степен **„Доктор“** по Докторска програма: **Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на размножаването, Професионално направление: 6.3. Животновъдство към ИЖН, Костинброд.**

Тема на дисертационния труд: **ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ И НУКЛЕОТИДЕН ПОЛИМОРФИЗЪМ НА ГЕНИ ЗА МЕСНА ПРОДУКТИВНОСТ ПРИ СВИНЕ**, с автор Радостина Петрова Стойкова-Григорова.

Представям рецензията в качеството си на член на научно жури, съгласно Заповед № РД05-14/20.01.2020 на Председателя на ССА.

1. Биографични данни за кандидата

Радостина Петрова Стойкова-Григорова е родена на 29.12.1978г. в град София. Завършила е висше образование – магистър в Софийски университет, специалност Молекулярна биология през 2002г. От 2003 до 2007г. е старши научен сътрудник 3-та степен в Институт по животновъдни науки – Костинброд. От 2007г. до сега е асистент в института. През 2016г. е зачислена като докторант на самостоятелна подготовка към ИЖН, Костинброд.

Има 38 научни публикации, участвала е в 13 научни форума и в 10 изследователски проекта.

Владее български и английски език.

2. Актуалност на темата

Опазването на генетичните ресурси в животновъдството е проблем от глобален и национален мащаб. На фона на постиженията свързани със създаването на високопродуктивни породи свине и подобряване на редица признаци от икономически интерес при производството на свинско месо се регистрира сериозно намаляване и

дори изчезване локални породи, които са по-слабо продуктивни, но за сметка на това по приспособени към конкретните условия на средата. Този факт е основна причина за загуба на генетичен ресурс и стесняване генетичното разнообразие при този вид животни.

Съгласно доклад на ФАО (2019) в света, приблизително 30% от породите са изчезнали или се считат в риск от изчезване, а 59 % са с неизвестен рисков статус, поради което са започнали действия с участието на Международно общество по генетика на животните (ISAG) за провеждане на изследвания за характеризиране на генетичната структура и оценка на вътре- и между- породното разнообразие в редица популации селскостопански животни, отглеждани в различни държави.

Познаването на генетичното разнообразие е важен елемент на модерното животновъдство и служи за подобряване на породите, увеличаване на техния адаптационен потенциал към условията на околната среда и най-важното получаване на качествена продукция.

Традиционното подобряване на продуктивните и репродуктивни признаци при популациите селскостопански животни, което се основава на стандартните селекционни методи, има своето значение, но с развитието на молекулярната биология, биотехнологиите и биоинформатиката се развиха нови възможности за усъвършенстване на селекцията. Секвенирането и картирането на генома при домашните животни позволява идентифициране на голям брой полиморфизми на ниво ДНК секвенции. Молекулните маркери са важен инструмент не само за определяне на идентичността на отделните индивиди, но и за характеризиране и оптимално използване и управление на генетичните ресурси, генетичното разнообразие и генофонда в популациите селскостопански животни .

Обект на изследване в дисертационния труд на Радостина Петрова Стойкова-Григорова са две български породи свине със статут на изчезващи и застрашени от изчезване - Източнобалканска и Дунавска бяла, което се явява заплаха за националните генетични ресурси в животновъдството. Анализът на генетичната структура на тези популации (чрез микросателитен анализ) и проучването на гени за количествени признаци (QTL – quantitative trait loci) идват навреме и детерминират актуалността на научната разработка .

3. Обща характеристика на дисертационния труд

Дисертационният труд е написан на 174 стр. и съдържа 34 таблици, 28 фигури. Литературната справка включва 245 източника, 44 на кирилица и 211 на латиница, 55 от които са публикувани в периода 2010 до 2019г. Структуриран е оптимално и съдържа целенасочен увод, аналитичен литературен обзор, материал и методи -17 стр., резултати и обсъждане 73 стр., изводи- 3 стр., приноси и препоръки, литература 28 стр.

Литературния обзор е обширен и дава достатъчно информация, както за достиженията на молекулярната генетика при изучаване и управление на генетичното разнообразие и опазването на генетичните ресурси, така и за фенотипната оценка на месната продуктивност при свинете и влиянието на генотипа върху количествените признаци. От представеният литературен обзор, както и цитираните 245 източника е видно че авторът е широко осведомен и компетентен по темата на дисертационния труд. Представянето на литературните данни е направено коректно и показва, че докторантът борави свободно и аналитично с научната информация.

Заглавието на дисертацията е точно и ясно. Целта е правилно формулирана и задачите изцяло обслужват поставената цел. Представените резултати са съпроводени от компетентно обсъждане.

Дисертантката е използвала подходящи класически и съвременни методи за изследване на генетичното разнообразие, като микросателитен и PCR - RFLP анализ за установяване на полиморфизми по проучваните локуси. Обект на изследването са автохтонната Източнобалканска свиня и Дунавската свиня, които са със статут на застрашени от изчезване породи. Дисертационният труд е много добре онагледен с качествени електрофореграми, които показват прецизност при работата с ДНК.

За статистическа обработка на резултатите от ДНК анализа са използвани модерни софтуерните програми GENAlex 6.501 и PowerMarker V. 3.25, а за построяване на дендрограмите - програмата R/v.3.2.3 (<http://www.R-project.org>). Данните за величината на изследваните фенотипни признаци са обработени по метода на вариационната статистика. Достоверността на разликите между групите е определена по Fisher и t-тест по Student.

Избраните методи за анализ и статистическа обработка напълно обслужват поставените задачи и показват умението на докторантката за боравене с тях.

4. Оценка на получените научни и научно-приложни резултати

Разделът Резултати и обсъждане на дисертационният труд е обширен и съдържа 3 основни компонента, както и анализ на всеки раздел. Първият компонент включва характеристика на генетичното разнообразие чрез микросателитни маркери на Дунавска бяла и Източнобалканска породи свине, вторият - изследване на локуси за количествени признаци (QTL) – рианодин рецепторен (RYR1), миостатинов (MSTN), калпастатинов (CAST) ген, а третият - проучване на фенотипните параметри на контролираните признаци за месна продуктивност при свинете.

За характеризиране на генетичното разнообразие при двете породи свине са използвани 8 микросателитни маркера, както следва :

SOO70, SO107, SOO68, SW353, SW24, SW936, SO218, SW72. Генетичната структура на изследваните породи/стада е определена на база на следните параметри: брой и честота на алелите по изследваните локуси, информационен коефициент на Shannon (ShI) и PIC – индекс на полиморфизъм, очаквана (He) и наблюдавана (Ho) хетерозиготност, F – индекс.

При **Източнобалканска порода** са генотипирани 32 животни от две стада отглеждани в два агро-екологични района в България: Шуменска област – стадо 1 (n=20) и Бургаска област – стадо 2 (n=14). Чрез микросателитния анализ дисертантката установява (посредством индекса на полиморфизъм - PIC), че и в двете стада най-ниски стойности са установени за маркер SO218 (0.365) за стадо 1 и (0.067) за стадо 2. Най-висока е стойността на PIC за маркер SOO 68 (0.720 и 0.748), което потвърждава високата му информативност. Средните стойности на PIC са 0.546 и 0.473, съответно за първото и второто стадо.

Средните стойности за Ho са съответно 0.600 в стадо 1 и 0.580 в стадо 2, а за He те са 0.595 и 0.516, респективно за стадо 1 и 2. При 5 от маркерите (Ho) превишава (He), а при три маркера е наблюдавано обратното (He>Ho). Тези резултати се потвърждават и от F-индекса, който е показател за родствените отношения между индивидите в една група. И при двете стада са установени отрицателни средни стойности на F-индекса, което указва, че при направеното проучване с избрания панел от микросателитни маркери в стадата от автохтонната Източнобалканска порода не се наблюдава хетерозиготен дефицит. Освен това, средните стойностите на He и на ShI (близки до единица) са индикатор за средното ниво на генетично разнообразие по избраните микросателитни маркери и при двете проучени стада. Изчислените стойности на χ^2 критерия, са показали, че изследваните стада са в състояние на HWE-равновесие, като изключение правят само микросателитите SO218, (** P<0.01) и SOO68 (* P<0.05) в стадо 1, което от своя страна означава, че по тези двата маркера стадото е в хетерозиготен дефицит. Тези данни са в съответствие с изводите от проучването на Dies-Tascon et al. (2000), че причината да не се констатира равновесие по закона на Харди – Вайнберг е именно хетерозиготния дефицит и инбридинга по даден локус.

Обобщени и анализирани фиксирани индекси (F индекси): Fis – вътрепопулационен коефициент на инбридинг, Fit - междупопулационен коефициент на инбридинг, Fst - коефициент на генетична диференциация и Nm - поток на гени показват, че 18.5 % от общото на генетично разнообразие е резултат от различия между изследваните стада свине, а останалите 81.5 % е вътрепородно генетично разнообразие, което се обуславя от различията между индивидите в стадата. Двете стада от автохтонната порода са достатъчно

разграничими със средно нивото на генетична диференциация. В локусите на маркерите SO218, SW936 и SW353 е наблюдавано най-високо ниво на генетична диференциация между стадата, като установената средна стойност за двете стада (0.185) е показател за ниско ниво на хетерозиготен дефицит. Чрез средната стойност на Nm (1.967) авторът установява, че процесът на съешаване и/или миграция между двете стада е ограничен. Анализът на дендрограмата потвърждава отчетлива генетична дистанция между индивидите от двете стада.

При породата Дунавска бяла са генотипирани 52 прасета (в т.ч. 11 нерезчета), минимум по 5 животни от 8 основни линии в стадото. Всички изследвани 8 локуса са полиморфни, като броя на алелите варира от 4 (SO218, SW353) до 9 (SOO70, SOO68). Общият брой установени алели за 8-те маркера е 58, със среден брой алели на локус – 6. Значително вариране е установено и при броя на ефективните алели от 1.771 за маркер SO218 до 4.657 и 5.287 за най-полиморфните локуси SW68 и SOO70. Средната стойност за броя на ефективните алели за популацията като цяло е 3.718, като този показател е един от основните даващи информация за генетичното разнообразие.

Средните стойности на коефициента на Shannon (1.461) и индекса на полиморфизъм PIC (0.664) при Дунавската бяла са по-високи от тези при автохтонната порода, което е индикатор за по високо генетичното вариране по избрания панел микросателитни. При тази порода нивото на наблюдаваната хетерозиготност (H_o) варира от 0.353 за маркер SO218 до 0.902 за маркер SO107, средна стойност – 0.760, докато очакваната хетерозиготност е в границите 0.435 за маркер SO218 до 0.811 за маркер SOO70 и средна стойност - 0.700. Сравнявайки стойностите на двата показателя (H_o и H_e) авторът установява, че по-високи стойности на H_e се наблюдават само при един от изследваните маркери - SO218, и прави заключение, че хетерозиготен дефицит се регистрира само при този маркер. Отрицателната средната стойност на F (-0.072) води до извода, че в изследваното стадо хетерозиготен дефицит не се наблюдава. При изследване на генетичното равновесие по закона на Харди – Вайнберг е установено, че липсва HWE-отклонение в локусите на избраните маркери.

На база стойността на Dst (N_{ei}) е конструирано филогенетично дърво, което не се състои от обособени клъстери и показва високото ниво на консолидиране в чистопородното стадо от Дунавската бяла порода .

Вторият пакет включва изследване на локуси за количествени признаци (QTL): RYR1, (MSTN), CAST.

PCR-RFLP анализа на RYR1 е извършен при двете породи. При **Източнобалканската порода** се наблюдават само генотип NN – 494 bp и 166 bp. Тестваните 32 животни са мономорфни и негативни за porcine stress syndrome.

При **Дунавска бяла порода** са наблюдавани 2 генотипа NN – 494 bp и 166 bp и Nn – 660 bp, 494 bp и 166 bp. Честота на доминантния алел N е 0.981, а на рецесивния n - 0.019. Според автора наличието на рецесивния алел (n) в Дунавска бяла порода се дължи вероятно на участието на породите Пиетрен и Ландрас в породообразователния процес.

PCR-RFLP анализ на (MSTN) е извършен само при **Дунавска бяла порода**. Генотипирани са 52 ремонтни прасета (10 мъжки и 42 женски), като са използвани 3 рестрикционни ендонуклеази TaqI за MSTN/exon 3, DraI и MnlI за MSTN/promoter. Резултатите са показали, че в стадото по локуса на MSTN/promoter/DraI ген се наблюдава едно хетерозиготно животно с генотип AT и 51 животни с генотип TT, честотата на алел T е 0.99, а на алел A – 0.01. За MSTN/promoter/MnlI всички тествани животни са хомозиготни по алел T (генотип TT), а за MSTN/ exon3/TaqI – по алел C (генотип CC). Според автора получените резултати при генотирането на стадото по локуса на RYR1 и MSTN ген вероятно са свързани с участието на породите Пиетрен и Ландрас в породообразователния процес.

CAST е анализиран при свине от **Дунавската бяла порода**. Авторът установява, че в стадото Дунавска бяла порода, в CAST/HinfI участъка на гена се наблюдават два генотипа, като хомозиготния по алел B генотип (BB) е със сравително по-висока честота от хетерозиготния AB генотип. При тестираните животни в другите два полиморфни участъка от локуса на гена CAST/MspI и CAST/RsaI се наблюдават три генотипа. Рестрикцията с ензим MspI показва най-висока честотата на генотип DD и най-ниска на генотип CC, докато при CAST/RsaI най-висока е стойността за хомозиготните по алел E животни и най-ниска за другия хомозиготен генотип FF.

В третия раздел на резултати и обсъждане авторът проучва фенотипните параметри на контролираните признаци за месна продуктивност на ремонтни прасета от Дунавската бяла порода - интензитет на растеж, качество на кланичния труп, качествена характеристика на месото, физикохимичен състав и технологични характеристики на m. Longissimus dorsi и m. Semimembranosus на прасета от Дунавска бяла порода. Изчислени са основни статистически величини, определени са фенотипните корелационни коефициенти между угоителните и кланични признаци при ремонтни прасета от Дунавска бяла порода.

Важен акцент в изследването е влиянието на полиморфизма в локуса на RYR1 гена върху появата на стрес синдром. При прасета от Източнобалканската порода отсъства алел n, свързан с появата на синдрома. Въпреки това е установена фенотипна проява на бледо, меко, ексудативно месо в m. Longissimus dorsi при Източнобалканската порода свине след предизвикан стрес, който е с негенетичен произход.

Физикохимичният състав на m. Longissimus dorsi и на m. Semimembranosus при прасета с NN и Nn генотип от Дунавска бяла порода е в нормални граници за този вид месо. Установено е по-високо съдържание на интрамускулните мазнини (над 2%), което е благоприятно за вкусовите качества на месото.

Анализирано е влиянието на полиморфизма в локуса на CAST върху някои угоителни и кланични качества на свинете в стадото Дунавска бяла порода, като е установено достоверно по-високо живо тегло при раждане на хомозиготните животни по алел D в CAST/MspI участъка от локуса на гена в сравнение с хетерозиготните прасета.

Напълно приемам изводите представени от дисертантката които са формулирани въз основа на експерименталните данни и анализи.

Оценявам препоръките, свързани с превенцията на проявата на стрес синдрома при свинете и негативните последици от него, както и използването на генетичния маркер CAST/MspI в селекцията, като важни за свиневъдната практика.

5. Оценка на автореферата и научните публикации

В автореферата синтезирано са представени всички раздели на дисертацията, като в него е включено и резюме на английски език. Публикациите във връзка с научната разработка са четири и три от тях са публикувани в научното списание «Животновъдни науки», а една в Сборник доклади от конференция с международно участие «Животновъдната наука – предизвикателства и иновации» 2017г.

В заключение бих искала да подчертая, че научния труд „Генетично разнообразие и нуклеотиден полиморфизъм на гени за месна продуктивност при свине“ отговаря по обем и съдържание на изискванията за придобиване на ОНС „Доктор“, съгласно Закона за развитието на академичния състав в РБ и Правилника за неговото приложение. Чрез извършените експерименти са постигнати оригинални научни резултати със значим научен принос в областта на генетичното разнообразие и нуклеотидния полиморфизъм по маркери за количествени признаци (QTL) при свине. Убедено препоръчам на членовете на уважаемото научно жури да гласуват положително и да присъдят ОНС „ДОКТОР“ на Радостина Петрова Стойкова-Григорова.

16.03.2020
Стара Загора

проф. С. Георгиева