

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Долматовой И.Ю. на диссертационную работу **Тюлькина Сергея Владимировича** «Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний», представленную в диссертационный совет Д 220.034.02 на базе ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

Актуальность темы диссертационной работы

Актуальность темы исследования Тюлькина С.В. определяется тем, что в настоящее время наряду с экстенсивным путем увеличения производства молока за счет увеличения численности скота все большее значение приобретает и интенсификация отрасли за счет улучшения генетического потенциала разводимых животных, что позволит не только научно-обоснованно обеспечить прирост производства, но и перейти на отечественный племенной материал. При этом наиболее удобными и современными молекулярно-генетическими маркерами, прямо или косвенно влияющими на формирование и функционирование молочной продуктивности крупного рогатого скота, являются ДНК-маркерные системы. Благодаря многочисленным исследованиям последнего времени в отношении возможного использования молекулярно-генетических маркеров, эффективность их применения в животноводстве в качестве дополнения к традиционной селекции является несомненной.

При этом в качестве потенциальных маркеров молочной продуктивности у крупного рогатого скота могут рассматриваться аллели генов белков молока (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *BLG* и *LALBA*), гормонов (*PRL*, *GH* *TG5* и *LEP*) и ферментов (*DGAT1*). Для оздоровления стад от рецессивных мутаций также желательно исследовать племенное поголовье на носительство мутантных аллелей по генам *CD18*, *SLC35A3*, *F11*, *PYGM*, *UMPS*, *ASS*.

Работа Тюлькина С.В. посвящена исследованию полиморфизма генов белков молока, гормонов, фермента и наследственных мутаций у разных пород крупного рогатого скота усовершенствованными им способами проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ, а также выявлению ассоциации отдельных и комплексных генотипов с молочной продуктивностью коров и в этой связи является актуальной.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Тюлькина С.В. написана с соблюдением традиционной структуры и состоит из введения, обзора литературы и основного содержания работы, включающего разделы, в которых описаны материалы, методы и условия проведения работы, а также результаты собственных исследований, заключения с обсуждением результатов,

выводами и практическими предложениями и списка цитированной литературы. Материал диссертации изложен на 349 страницах компьютерного текста, содержит 70 таблиц, 52 рисунка. Список использованной литературы включает 426 источников (в том числе 230 на иностранных языках). Имеется 7 приложений.

Во введении чётко определены цели и задачи исследования, проведён очень обоснованный анализ степени разработанности темы, что позволило автору логично сформулировать актуальность проблемы, её новизну, теоретическую и практическую значимость.

Обзор литературы изложен на 55 страницах и состоит из 4 разделов. Все они посвящены подробному анализу многочисленных публикаций о влиянии полиморфизма изучаемых автором генов на продуктивные качества коров разных пород.

В кратком заключении, обобщающем обзор литературы, автор отмечает, что, несмотря на достигнутые результаты в области маркерной селекции, в литературе относительно вопросов комплексного влияния генотипов различных генов на продуктивные показатели сельскохозяйственных животных имеются порой противоречивые сведения.

Однако сложилось общее мнение, что аллельные варианты генов гормонов и белков молока являются перспективными маркерами молочной продуктивности и технологических свойств молока коров, а поиск и использование новых маркеров в селекции молочного скота продолжает оставаться актуальной задачей современного животноводства.

Материал и методы исследований описаны во втором разделе (2.1) «Основное содержание работы» (стр. 70-108). В данном разделе приводятся сведения об объёме выполненных работ, объектах и методах исследования, которые соответствуют поставленным задачам. Эксперименты выполнены на достаточно большом материале с использованием зоотехнических, генетических, биохимических и статистических методов, как хорошо апробированных практикой, так и новоизобретенных и впервые использованных автором. Аллельный полиморфизм молочных белков, гормонов и фермента изучен у 322 коров двух породных групп (чёрно-пестрой×голштинской и холмогорской татарстанского типа) и 70 чистопородных и помесных по голштинской породе быков.

При ознакомлении с данным разделом сформировалось мнение, что значительная его часть могла быть перенесена в следующий раздел, где описываются результаты собственных исследований, поскольку практически все описываемые методики апробированы автором впервые.

Результаты собственных исследований (раздел 2.2) излагаются автором на 130 страницах. Раздел построен логично, исходя из целей и задач, и состоит из шести подразделов. В подразделе 2.2.1 изложены разработанные автором способы (аммиачный и комбинированный щелочной) экстракции ДНК из биологического материала.

Описанию апробаций и разработок способов проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для идентификации аллельных вариантов генов белков молока,

гормонов, фермента и наследственных заболеваний крупного рогатого скота посвящен подраздел 2.2.2 (стр.109-151). Автором усовершенствованы протоколы проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *BLG*, *LALBA*, *GH*, *PRL*, *LEP*, *TG5*, *CD18*, *SLC35A3*, *F11*, *PYGM*, *UMPS*, *ASS* и показано, что они являются оптимальными в плане точной идентификации аллельного полиморфизма изученных генов. Также автором разработаны способы проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам *CSN3*, *MSTN* и *DGAT1* и показано, что они позволяют корректно интерпретировать экспериментальные данные, в связи с чем являются эффективными приёмами идентификации анализируемых генотипов. Раздел подробно проиллюстрирован электрофорограммами результатов ПЦР-ПДРФ, АС-ПЦР анализа генов молочных белков, гормонов и рецессивных летальных мутаций. Также имеется иллюстрация к разработанному автором методу гибридизационно-флуоресцентной детекции аллелей *A* и *K* гена *DGAT1* в режиме «реального времени».

В подразделе 2.2.3 (стр. 152-181) описывается аллельный полиморфизм генов белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний изучаемых породных группах крупного рогатого скота. По данным автора, преобладающими по частоте аллелями и генотипами являются: *B* и генотип *BB* гена *CSN1S1*; *A* и *AA* генов *CSN2* и *CSN3*; *B* и *BB* гена *BLG*; *A* и *AA* гена *LALBA*; *L* и *LL* гена *GH*; *A* и *AA* гена *PRL*; *C* и *CT* гена *LEP*; *C* и *CC* гена *TG5*; *A* и *AA* (*AK*) гена *DGAT1*.

Носительства рецессивных летальных мутаций по генам *CD18*, *SLC35A3*, *F11*, *PYGM*, *UMPS*, *ASS*, а также по гену *MSTN* автором не выявлено.

Следующий раздел (2.2.4, стр. 182-198) посвящен оценке родословных индексов быков-производителей с разными отдельными и комплексными генотипами генов белков молока, гормонов и фермента. Наиболее высокие индексы по удою и жиру имеют быки с генотипами *BC* гена *CSN1S1*, *AA* гена *CSN2*, *AB* и *BB* гена *CSN3*, *AA* и *AB* гена *BLG*, *AA* гена *LALBA*, *LL* гена *GH*, *AA* гена *PRL*, *TT* и *CT* гена *LEP*, *CT* и *CC* гена *TG5*, *KK* и *AA* гена *DGAT1*.

В разделе 2.2.5 (стр.198-229) автором проведена оценка молочной продуктивности первотёлок чёрно-пёстро×голштинских и холмогорской породы татарстанского типа с разными отдельными и комплексными генотипами белков молока, гормонов и фермента. Установлено, что наибольшие показатели по молочности, количеству молочного жира и белка имели генотипы *AB* гена *CSN2*, *AB* и *BB* гена *CSN3*, *AA* и *AB* гена *BLG*, *AA* и *AB* гена *LALBA*, *LL* и *VL* гена *LALBA*, *AA* гена *PRL*, *CC* и *CT* гена *LEP*, *CT* и *TT* гена *TG5* соответственно; тогда как генотипы *AA* и *AK* гена *DGAT1* имели превосходство только по удою и количеству белка, а по количеству жира наибольшие показатели отмечены у аналогов с генотипами *AK* (чёрно-пёстро×голштинская порода) и *KK* (холмогорская порода татарстанского типа). Также выявлены коровы с комплексными генотипами белков молока и

гормонов, характеризующиеся наибольшими показателями молочной продуктивности.

Расчёты экономической эффективности исследований, приведенные в разделе 2.2.6 показали, что в условиях Республики Татарстан экономически обоснованно получение молока от первотёлок, несущих в своём геноме *B* аллель гена каппа-казеина.

В разделе «**Заключение**» Сергей Владимирович достаточно подробно обсуждает полученные результаты, сравнивает их результатами других исследователей, работающих в данном направлении и формулирует 8 выводов, которые вытекают из результатов собственных исследований и логично отвечают на поставленные автором задачи.

Все разделы диссертации построены вдумчиво и каждый последующий тематически логично связывается с предыдущим. Стиль изложения ~~всех~~ разделов грамотный, доступный и интересный.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

По результатам проведённых исследований соискателем на защиту выдвинуты 7 положений, основными, практически наиболее значимыми из которых, с моей точки зрения, являются разработка и усовершенствование способов проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных мутаций. Как показали проведенные автором апробации, предложенные им методики являются результативными инструментами ДНК-анализа аллельного полиморфизма и по сравнению с ближайшими прототипами не уступают по эффективности идентификации искомых генотипов.

Предлагаемые усовершенствованные способы экстракции ДНК из биологического материала и проведения ПЦР-ПДРФ и АС-ПЦР анализов определения полиморфизма генов успешно будут использованы молекулярно-генетическими лабораториями, входящими в государственный племенной регистр Минсельхоза РФ.

Обоснованность результатов проведённых исследований определяется их методологией. Эксперименты выполнены на достаточно большом материале. Аллельный полиморфизм молочных белков, гормонов и фермента изучен у 322 коров двух породных групп (черно-пестрой×голштинской и холмогорской татарстанского типа) и 70 чистопородных и помесных по голштинской породе быков.

Аналитическая работа проведена на базе ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» с использованием как классических, достаточно хорошо известных общепринятых методов (аналогии, наблюдения, моделирования, сравнения), так и специальных молекулярно-генетических методов, в частности ПЦР с электрофоретической и гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Исследования проведены на современном оборудовании. Экспериментальные данные статистически обработаны с использованием

компьютерной аналитической программы Microsoft Excel, что обосновывает получение достоверных результатов, а следовательно, и выводов, также как и практических рекомендаций.

Обоснованность и достоверность положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется также полнотой их освещения в научных публикациях и апробацией на конференциях различного уровня. Всего по теме диссертации автором опубликовано 58 научных статей, в том числе 35 в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ (из них 4 включены в базы данных Scopus и/или Web of Science), 1 монография, 2 научно-методические рекомендации, получено 2 патента РФ на изобретение.

В период проведения исследований, с 2007 по 2018 гг., их результаты широко апробированы на 9-ти региональных, всероссийских и международных научно-практических конференциях.

Рукопись автореферата в целом соответствует содержанию рассматриваемой диссертации и полученным результатам.

Степень новизны, научная и практическая значимость результатов

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что:

- Разработаны способы экстракции ДНК из биологического материала;
- Разработаны и усовершенствованы способы проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам белков молока (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *BLG*, *LALBA*), гормонов (*GH*, *PRL*, *LEP*, *TG5*) и фермента (*DGAT1*), а также генам наследственных мутаций (*CD18*, *SLC35A3*, *F11*, *PYGM*, *UMPS*, *ASS*, *MSTN*);
- Представлена характеристика аллелофонда популяций крупного рогатого скота (чистопородные и помесные по голштинской породе быки-производители, коровы черно-пёстро×голштинские и холмогорской породы татарстанского типа) по вышеуказанным генам.
- Проведена количественная оценка влияния отдельных и комплексных генотипов изучаемых ДНК-маркеров на молочную продуктивность коров разных пород в условиях Республики Татарстан.

Практическая значимость заключается в том, что разработанные и усовершенствованные способы выделения нуклеиновых кислот и проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных мутаций позволяют осуществлять достоверную оценку их генотипов и могут быть успешно использованы молекулярно-генетическими лабораториями.

По результатам исследований разработаны и изданы две практические рекомендации.

Результаты диссертационной работы позволяют пополнить теоретические данные о полиморфизме генов *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *BLG*, *LALBA*, *GH*, *PRL*, *LEP*, *TG5*, *DGAT1*, *CD18*, *SLC35A3*, *F11*, *PYGM*, *UMPS*, *ASS*, *MSTN*. Получены важные доказательства о количественном влиянии отдельных и комплексных (*CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *BLG*, *LALBA* и *GH*, *PRL*,

LEP, TG5, DGAT1) генотипов на молочную продуктивность коров разных пород, разводимых на территории Республики Татарстан. Мониторинг наследственных болезней у племенного скота позволяет исключить из системы крупномасштабной селекции особей, которые являются потенциальными распространителями генетических мутаций.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

1. Имеется замечание к структурно-композиционному построению диссертационной работы. В основных разделах слишком много подразделов, которые, в свою очередь, тоже делятся на подразделы, состоящие из одной – двух страниц. Все их следовало бы объединить в более крупные блоки.

2. Имеет ли практический смысл получать препараты ДНК (аммиачный способ экстракции), которые стабильны в течение 20-30 минут?

3. С какой целью определяли интенсивность молокоотдачи коров с разными генотипами по изучаемым генам? На основании каких предполагаемых биохимических и физиологических процессов в организме дойной коровы Вы предполагали наличие такой зависимости и может ли быть она вообще?

4. Вам выявлены комплексные генотипы как по молочным белкам, так и гормонам, которые являются наиболее желательными с точки зрения молочной продуктивности. Почему же оценка экономической эффективности проведенных исследований сделана только по каппа-казеину, причём не приведен уровень рентабельности производства молока от коров с разными генотипами по каппа-казеину?

5. Почему в автореферат не включён раздел о характеристикае родословных индексов племенных быков с разными генотипами белков молока, гормонов и фермента, тем более что это одна из задач исследований и одно из положений, выносимых на защиту? Этот раздел является достаточно интересным с точки зрения практического использования в племенной работе, поскольку выявлены животные с высокими РИБ по удою и жиру.

6. Предложения производству (особенно 2 и 3) сформулированы слишком обобщенно. Следовало бы конкретно указать, каким именно генотипам отдавать предпочтение в селекционно-племенной работе.

7. В тексте встречаются стилистически неудачные выражения, например: «наследственная мутация» (стр.11), «генное равновесие находится в сбалансированном состоянии» (стр.154), «встречаемость аллеля не выявлена» (стр.259) и некоторые другие.

Все высказанные замечания и заданные вопросы не умаляют актуальность, теоретическую и практическую значимость оппонируемой диссертации Тюлькина С.В. и носят дискуссионный характер.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Тюлькина Сергея Владимировича
«Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по

генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний» является законченной научно-квалификационной работой, в которой соискатель изучал полиморфизм генов белков молока, гормонов, фермента и наследственных мутаций у разных пород крупного рогатого скота разработанными и усовершенствованными им способами проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ, а также выявил ассоциации отдельных и комплексных генотипов с молочной продуктивностью коров.

Оценивая докторскую диссертационную работу С.В. Тюлькина в целом, считаю, что она соответствует паспорту специальности 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных и является актуальной, цельной, законченной научной работой, выполненной на высоком профессиональном уровне.

По своей научной новизне, практической значимости и объему полученных данных диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 N 842 (ред. от 02.08.2016), а ее автор, Тюлькин Сергей Владимирович, заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных.

Официальный оппонент:

Зав. лабораторией молекулярной генетики, профессор кафедры пчеловодства, частной зоотехнии и разведения животных ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет», доктор биол. наук, специальность 06.02.07 - разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных

 Долматова Ирина Юрьевна

Адрес:

450001, г. Уфа,
ул. 50-летия Октября,
тел.(347) 228-91-77
Web-сайт: www.bsau.ru
E-mail: bgau@ufanet.ru, dolmat@list.ru

Подпись И.Ю. Долматовой заверяю:

Учёный секретарь ФГБОУ ВО
Башкирский ГАУ, доктор
сельскохозяйственных наук

22.05.2019 г.





Султанова Рида Разибовна