

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Тюлькина Сергея Владимировича «Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний», представленную к публичной защите в диссертационный совет Д.220.034.02 при 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 диссертации. Молекулярно-генетические исследования в животноводстве постоянно расширяются, вовлекая в селекционный процесс новые гены (SNPs). Однако успешность их применения зависит от хорошо разработанных методик, пригодных для массовых анализов на всех её этапах: качество выделения ДНК, амплификация и идентификация конечных результатов. При этом особое внимание обращается на снижение ручного труда, что особенно важно для рутинных анализов. Безусловно, разработанная или модифицированная методика, должна быть достаточно хорошо апробирована в лабораторных условиях и легко воспроизводиться в дальнейшем. Кроме того, использование молекулярно-генетических исследований в практической селекции зависит от корреляционных отношений генотипов и аллелей с определёнными хозяйственно ценными признаками животных в конкретных стадах. В связи с этим, исследования Тюлькина Сергея Владимировича, направленные на совершенствование методик при проведении реакций, выявление генов, связанных с количественными и качественными признаками молочной продуктивности, наличие вредных рецессивных мутаций у быков-производителей выполнены на актуальную тему и имеют большое научно-практическое значение.

Цель и задачи четко поставлены и дают полное представление о направлении и характере проведенной работы.

Новизна исследований заключается в пополнении банка данных четырёх групп генов: 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*), их аллельного соотношения в породах молочного крупного рогатого скота. Безусловными признаками новизны являются разработанные и усовершенствованные способы экстракции ДНК из крови и спермы крупного рогатого скота, проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ по некоторым генам. Получены новые данные по генотипической структуре быков-производителей, коров черно-пёстро х голштинских и татарстанского типа холмогорской породы. Изучены ассоциативные связи отдельных и комплексных генотипов с молочной продуктивностью коров в условиях Республики Татарстан.

Степень обоснованности научных положений, выводов и предложений производству, сформулированных в диссертации базируется на обширных экспериментальных данных, полученных за период с 2006 по 2018 гг., за который было исследовано 158 голштинизированных чёрно-пёстро коров, 164 – холмогорской породы татарстанского типа и 70 быков-производителей в племенных хозяйствах и племенных предприятиях Республики Татарстан.

Обоснованность и достоверность основных научных положений, выводов и практических предложений, сформулированных автором на основе проведенных исследований не вызывает сомнений, подтверждается значительным их объёмом, полученным в лабораторных и производственных условиях, статистической обработкой результатов. Работа спланирована методически правильно.

Оценка содержания, завершённости работы и качество её оформления. Диссертация написана на 349 страницах, содержит 70 таблиц, 52 рисунка и 7 приложений. Список литературы включает 425 источников, из них 229 – на иностранных языках. Диссертация построена по традиционной структуре и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований, заключение, предложение производству и список используемой литературы. Каждый раздел довольно полно раскрывает содержание в соответствии со своим названием. Диссертация хорошо иллюстрирована рисунками и таблицами.

В главе «Общая характеристика работы» обоснована актуальность темы исследований, степень разработанности проблемы, сформулирована цель и задачи исследований, представлена научная новизна и практическая значимость работы, методология и методы исследований, описаны основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация материалов диссертации, личное участие автора, публикации результатов исследований, объем и структура диссертации.

Анализ обзора литературы свидетельствует о достаточной осведомленности автора в теоретических и практических аспектах разработанной темы и актуальности ее выполнения.

При этом автор обращает особое внимание на полиморфизм взятых на исследование генов в других породах, а также ассоциированность генотипов с важнейшими селекционно-значимыми признаками.

В разделе «Материалы и методы исследований» подробно описаны все использованные автором методы исследований, включая как общепринятые зоотехнические методы, так и молекулярно-генетические, в частности полимеразная цепная реакция с электрофоретической и гибридационно-флуоресцентной детекцией. Исследования проведены на современном оборудовании. Обработка экспериментальных данных проведена с использованием методов статистического анализа.

Раздел «Результаты собственных исследований» имеет 6 логично обоснованных подразделов с дроблением на подпункты, где детально изложены апробация способов проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для идентифика-

ции аллельных вариантов генов белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний крупного рогатого скота с сопровождающими рисунками и таблицами. Используя собственные методики и заимствованные из литературных источников, диссертантом проведен анализ полиморфизма 17 отдельных генов и их комплексных генотипов у быков-производителей, помесных первотёлок чёрно-пёстрых х голштинских и холмогорской породы татарстанского типа. Это позволило Тюлькину С.В. установить особенности генетического профиля изучаемых пород. Показано, что из возможных 243 комплексных генотипов 17 генов белков молока, гормонов и фермента выявлено 26, 21, 19 и 33, 37, 57 в породах чёрно-пёстрой и холмогорской породы татарстанского типа соответственно. При этом среди комплексных генотипов белков у голштинской породы и помесей чёрно-пёстро × голштинской лишь 3 генотипа встречались с частотой от 10 до 21%, а в холмогорской породе выявлено 4 комплексных генотипа с частотой 11,0-13 %. Несколько ниже частота 4 комплексных генотипов наблюдалась по генам гормонов и фермента (8,3 - 11,6 %).

Принимая во внимание, что главная цель всех исследований диссертации заключается в повышении эффективности селекционно-племенной работы путём использования молекулярно-генетических маркёров, автор провёл анализ их ассоциативных связей с молочной продуктивностью и качественным составом молока, на основании которого были выявлены желательные генотипы. Показано, что среди обследованных голштинизированных чёрно-пёстрых первотёлок наиболее высокой молочностью (4753 кг) отличались животные с комплексным генотипом LL/AA/CC/CC/AK, тогда как среди холмогорских первотёлок татарстанского типа приоритет по этому показателю был у животных с комплексным генотипом LL/AA/CC/CC/AA (5914 кг). Животные отличались только генотипом гена *DGAT1*. Также выявлены наиболее желательные генотипы по содержанию жира и белка в молоке, носители которых превосходили показатели по белку средние по выборке на 0,19-0,21 % (холмогорская и чёрно-пёстрая соответственно, а по содержанию жира на 0,34 (холмогорская) и 0,16 % (чёрно-пёстрая).

Учитывая, что высокая интенсивность селекции на современном этапе приводит к возникновению вредных рецессивных мутаций, формирующих генетический груз в популяциях, Сергеем Владимировичем предприняты исследования по скринингу 7 мутаций (*CD18*, *SLC35A3*, *F11*, *PYGM*, *UMPS*, *ASS*, *MSTN*), у быков-производителей чёрно-пёстрой и голштинизированной пород. Показана низкая частота мутированных аллелей. Среди 70 обследованных животных выявлено 2 быка голштинской породы со скрытым носительством SVM мутации, принадлежащих к линии Элевейшан и О. Айвенго. По остальным генам повреждённых аллелей мутацией не выявлено.

Ключевым моментом всей селекционной работы является её эффективность, поэтому в представленной диссертации приведены расчеты по стоимости дополнительно полученной продукции от коров чёрно-пёстрой и холмогорской пород татарстанского типа с желательными генотипами АВ и ВВ

CSN3 гена, уровень которой находится в пределах 6-8 тысяч рублей на голову.

Значимость полученных результатов исследования для науки и практики.

Развитие биотехнологии, в частности изучение генетических особенностей сельскохозяйственных животных разных пород, предполагает усовершенствование способов выделения ДНК, её химической чистоты из малого количества биологического материала, надёжности и долговременности хранения. Предлагаемые автором способы, направленные на достижение этих целей, безусловно, имеют большое значение для науки и практического применения в лабораториях. Кроме того, ряд усовершенствованных методик ПЦР-ПДРФ, подтверждённых протоколами исследований и патентами, также займут достойное место в других лабораториях России.

Несомненную значимость имеют результаты исследований по генетической характеристике по 17 генам чёрно-пёстрой и холмогорской пород, разводимых в Республике Татарстан. Исследования по генетически обусловленным заболеваниям быков-производителей внесли определённый вклад в теоретические основы мутагенеза. Данные по ассоциативным связям отдельных генов и комплексных генотипов будут использоваться при отборе и подборе пар в разработке селекционных планов и программ совершенствования молочного скота Республики.

Материалы диссертации, безусловно, могут использоваться в лекционных курсах и практических занятиях для студентов сельскохозяйственных ВУЗов.

Результаты проведенных исследований были представлены для научной общественности в 58 научных статьях, в том числе 35 в ведущих рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ (из них 4, включённые в базы данных Scopus и/или Web of Science), 1 монография, 2 научно-методические рекомендации. Кроме того, получено 2 патента РФ на изобретение.

Автором сделано логичное заключение по данным полученных исследований.

Несомненным достоинством диссертации является глава «Обсуждение результатов», где автор сравнил данные собственных экспериментов с результатами исследований других учёных, включая зарубежных, приводя доводы и обоснованные рассуждения по каждому пункту выполненных работ.

В заключении автор формулирует 8 выводов и даёт практические предложения производству, которые вытекают из объективного содержания экспериментальных данных.

Список использованной литературы оформлен в соответствии с требованиями ГОСТ и сопоставим с литературным обзором.

Работа носит завершённый характер, изложена четким и ясным научным стилем.

Данная работа оставляет хорошее впечатление по сущности проведенных экспериментов, логичности изложения, результативности и прикладному значению.

Основные положения диссертационной работы доложены, получили положительную оценку и широко апробированы на российских и международных научно-практических конференциях.

Степень соответствия содержания автореферата диссертации и уровень отражения основных положений работы в научных публикациях. Полученные Тюлькиным Сергеем Владимировичем экспериментальные данные, выводы и предложения производству, приведённые в автореферате, полностью соответствуют содержанию диссертации и опубликованным работам.

Вместе с тем по диссертации имеются замечания и вопросы, на которые хотелось бы получить ответы.

1. Чем была вызвана необходимость разрабатывать свой способ выделения ДНК? Удешевлением процесса или качеством конечного результата? Какая при этом ставилась цель? Во введении или методической части работы не дано пояснение по этому поводу.

2. На с. 182-198 повторяется выражение «Оценка быков по родительскому индексу позволила выявить, что используемые быки с разными генотипами ...не равноценны по происхождению». Что автор имел ввиду?

3. Перечень оборудования и необходимые реактивы это излишняя информация, достаточно было сослаться на имеющееся свидетельство о регистрации в государственном племенном регистре.

4. Методы выделения ДНК обязательно прописываются в инструкции, прилагаемой к набору. Эта информация также излишняя, за исключением применения собственной модификации метода.

5. Таблица 55 называется «Молочная продуктивность коров с разными генотипами *CSN1S1*», однако ввиду мономорфности коров по этому гену анализ проведён в целом между породами, а не по генотипам, соответственно интерпретация этой таблицы (с. 201) также неверная.

6. На с. 201 неточное выражение «Первотёлки чёрно-пёстро х голштинские и холмогорские уступали сверстницам с генотипом AA гена *CSN2* на 52 и 489 кг ($P < 0,001$) молока соответственно». Различие в 52 кг не является статистически значимой величиной.

6. При анализе таблицы 57 ввиду малочисленности животных с ВВ генотипом к-казеина (3 головы) определённых выводов сделать нельзя (с.205). Желательно продолжить исследования на большем поголовье.

7. По оформлению диссертации. Слишком большое дробление материала затрудняет его восприятие. Многие главы можно без ущерба логике изложения объединить.


Тем не менее, сделанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают основных положений диссертации и не влияют на значимость полученных результатов в разработке методических подходов для совершенствования молочного скота в Республике Татарстан.

Рекомендации по использованию результатов исследований. Выполненные исследования Тюлькина Сергея Владимировича на тему «Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний», решают важную задачу повышения эффективности селекционно-племенной работы в конкретных стадах и в целом по изученным породам путём использования генетических маркёров в прогнозировании продуктивных качеств коров. Полученный материал может использоваться для сравнительной оценки полиморфизма изученных генов молочных пород Республики Татарстан с другими породами России, а также при составлении перспективных планов и программ по их совершенствованию.

Считаем возможным рекомендовать результаты исследований, изложенные в диссертации к внедрению в высшие учебные заведения для использования их в учебном процессе при подготовке специалистов в области биологии и зоотехнии.

Заключение. Диссертация Тюлькина Сергея Владимировича «Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний», является целостной, законченной научно-квалификационной работой, выполненной на современном научном и методическом уровне, по актуальности, научной новизне и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях отвечает требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», предъявляемых ВАК Министерства образования и науки РФ к докторским диссертациям, а её автор Тюлькин Сергей Владимирович заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 06.02.07 – Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных.

Доктор биол. наук, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологий Сибирского научно-исследовательского и проектно-технологического института животноводства Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН).


Гончаренко Галина Моисеевна
630501 Новосибирская область Новосибирский район п. Краснообск,
зд. СибНИПТИЖ
(383)348-67-18, gal.goncharenko@mail.ru

Подпись Гончаренко Г.М. заверяю:
учёный секретарь СФНЦ РАН, канд. с.- х. наук
И.Н. Минина

06.05.2019 г.

