

## ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук, профессора РАН Косовского Глеба Юрьевича на диссертационную работу Тюлькина Сергея Владимировича по теме: «Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний», представленную 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 избранной темы диссертации.** В XXI веке заметно изменились приоритетные направления селекционной работы со специализированным молочным крупным рогатым скотом, сместившись от поисков генетических основ количества молочной продукции к выявлению молекулярно-генетических основ его качества. В этих целях широко используются методы селекционной работы с помощью маркеров (Marker Assisted Selection – MAS). Однако до сих пор такие исследования, в большинстве случаев, ограничивались относительно небольшим количеством ДНК маркеров без учета их специфических биохимических функций. В работе же Сергея Владимировича Тюлькина разработан качественно новый подход, позволяющий одновременно выяснять ассоциации с характеристиками молочной продуктивности коров разных генотипов по генам, кодирующим системные регуляторы (гормоны), белки молока, участвующие в формировании мицелл молока (казеины), сывороточные белки молока (альфа и бета глобулины), а также ацил-СоА диацилглицерол ацилтрансфераза 1 (DGAT1), ключевой фермент синтеза насыщенных жирных кислот. Такой комплексный подход к разным уровням молекулярно-генетического контроля не только количественных, но и качественных характеристик молочной продуктивности выполняется впервые и его актуальность трудно переоценить. В связи с этим исследования Тюлькина Сергея Владимировича являются актуальными, и имеющими практическое значения для лабораторий по ДНК-диагностике и племенных скотоводческих предприятий.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Материалы, изложенные в диссертационной работе Тюлькина С.В., свидетельствуют об актуальности и чёткости поставленной цели и соответствующих ей задач, корректности используемых способов и методов для их решения, соответствия выводов и рекомендаций полученным результатам экспериментальных исследований.

Обоснованность результатов основывается на согласованности экспериментальных данных и научных выводов. В основу методологии реализации цели и задач научного исследования положено научное

обоснование и экспериментальное изучение ассоциаций отдельных и комплексных генотипов белков молока, гормонов, ключевого фермента синтеза насыщенных жирных кислот с характеристиками молочной продуктивности коров чёрно-пёстрой голштинизированной и холмогорской пород в условиях Республики Татарстан.

Выводы и рекомендации логично вытекают из большого фактического экспериментального материала, полученного с использованием современных молекулярно-генетических методов, в том числе некоторых разработанных при непосредственном участии автора, являются существенным дополнением к сложившимся представлениям о технике проведения генотипирования крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента DGAT1, позволяющих использовать полученные результаты для прогноза показателей молочной продуктивности коров с разными отдельными и комплексными генотипами изучаемых генов.

Основные научные положения и практические рекомендации прошли необходимую научную экспертизу на научных и научно-практических конференциях и являются обоснованными. Достоверность подтверждается большим объёмом исследований и статистической обработкой полученного материала.

**Научная новизна и практическая значимость выводов и рекомендаций.** Прежде всего, научную новизну составляет разработка и совершенствование способов выделения ДНК из биоматериала крупного рогатого скота и проведения ПЦР, ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента DGAT1 и наследственных заболеваний, позволяющих эффективно идентифицировать генотипы путём корректной интерпретации специфичных ПЦР-продуктов. Выполненная работа позволяет определить возможное использование исследованных ДНК-маркеров и их ассоциаций с характеристиками молочной продуктивности в качестве дополнительных показателей, увеличивающих эффективность племенной работы с крупным рогатым скотом исследованных пород и помесей. Использование таких подходов имеет существенное практическое значение для получения стад с относительно повышенными характеристиками молочной продуктивности животных у высокоспециализированного молочного скота, своевременное выявление и в дальнейшем исключение из воспроизводства особей – носителей генетических заболеваний. Основные выводы диссертационной работы экспериментально обоснованы. Исследования выполнены с применением современного оборудования и молекулярно-генетических методов исследования, полученные результаты исследований проанализированы, их достоверность подтверждается статистической обработкой.

**Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы.** Судя по материалам диссертации и автореферата, экспериментальные исследования и их анализ выполнены лично Тюлькиным С.В., также как и разработка способов

выделения из биоматериала крупного рогатого скота, проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота, биометрическая обработка данных, реализация практических предложений и рекомендаций.

**Апробация, внедрения и публикация основных положений результатов исследований.** Исследования проведены на достаточном по численности материале согласно программе и схеме исследований. Основные результаты исследований достаточно полно опубликованы в 58 научных работах, в том числе 35 в журналах, включённых в список ВАК (из них 4, включены в базы данных Scopus и/или Web of Science), монографии, 2 патентах РФ, 2 научно-методических рекомендациях, в которых отражены основные положения и результаты диссертационной работы.

**Оценка содержания и оформления диссертации и автореферата.** Диссертационная работа Тюлькина С.В. написана в традиционной форме, соответствует требованиям объёма докторских диссертаций, имеет достаточный список отечественной и иностранной литературы.

Диссертация изложена на 349 страницах компьютерного текста, состоит из введения и глав: введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, а также заключения с выводами, предложений производству, перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы, приложений. Диссертация содержит 70 таблиц и 52 рисунка. Список литературы включает 425 источников, в том числе 229 на иностранных языках.

В главе «Обзор литературы» представлены данные о частоте встречаемости генотипов и аллелей генов белков молока, гормонов, фермента и наследственных мутаций у крупного рогатого скота разных пород в России и за рубежом. Описано влияние аллельного полиморфизма белков молока, гормонов, фермента и наследственных мутаций крупного рогатого скота на его продуктивные качества.

В главе «Материалы и методы исследований» отображена методология проведения исследований и описаны основные методики исследований.

В главе «Разработка способов экстракции ДНК из биологического материала крупного рогатого скота» представлены три разработанных способа выделения ДНК из различного биоматериала (кровь, сперма) крупного рогатого скота, рассмотрены их преимущества и главное – недостатки.

В главе «Апробация и разработка способов проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для идентификации аллельных вариантов генов белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний крупного рогатого скота» приведены новые и усовершенствованные известные способы определения полиморфизма ДНК-маркеров крупного рогатого скота.

В главе «Изучение аллельного полиморфизма генов белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний у крупного рогатого скота» описана работа по распределению трёх популяций крупного рогатого скота голштинской, чёрно-пёстрой и холмогорской пород на опытные



группы животных с разными отдельными и комплексными генотипами генов белков молока (CSN1S1, CSN2, CSN3, BLG, LALBA), гормонов и фермента (GH, PRL, LEP, TG5, DGAT1). Также в этих популяциях скота проведены исследования по выявлению у них наследственных мутаций в генах CD18, SLC35A3, F11, PYGM, UMPS, ASS, MSTN.

В главе «Характеристика племенных быков с разными генотипами белков молока, гормонов и фермента по происхождению» приведена оценка по происхождению чистопородных и помесных по голштинской породе быков-производителей с отдельными и комплексными генотипами вышеперечисленных генов, которая позволила вычленил быков с более высокой молочной продуктивностью ближайших женских предков.

В главе «Оценка молочной продуктивности коров с разными генотипами белков молока, гормонов и фермента» приводятся результаты исследований диссертанта о влиянии отдельных и комплексных генотипов белков молока, гормонов, фермента DGAT1 у чёрно-пёстро × голштинских и холмогорских татарстанского типа коров на их молочную продуктивность. Наиболее важна оценка молочной продуктивности первотёлок с комплексными генотипами, которая показала, что животные с комплексными генотипами белков молока (CSN1S1, CSN2, CSN3, BLG, LALBA) ВВ/АА/АА/АВ/АВ, ВВ/АА/АВ/АА/АА, ВВ/АА/АВ/ВВ/АВ (по чёрно-пёстро × голштинской породе), ВВ/АВ/АВ/АВ/АА, ВВ/АВ/АВ/АВ/АВ, ВВ/АВ/АВ/АВ/ВВ (по холмогорской породе татарстанского типа) и с комплексными генотипами гормонов и фермента (GH, PRL, LEP, TG5, DGAT1) LL/АА/СС/СС/АК, LL/АА/СТ/СТ/АК, VL/АА/СС/СС/АК (по чёрно-пёстро × голштинской породе), LL/АА/СС/СС/АА, VL/АА/СС/СС/АА, VL/АА/СТ/СТ/АА (по холмогорской породе татарстанского типа) выгодно отличались по молочной продуктивности.

В главе «Экономическая эффективность использования коров с разными генотипами по гену каппа-казеина» на экспериментальном материале рассматривается влияние генотипа коров по гену каппа-казеина на их молочную продуктивность. Выполнен расчёт экономической эффективности производства молока с учётом генотипа гена каппа-казеина у коров, который показал, что экономически обосновано получение молока от первотёлок изученных пород, несущих в своём геноме В аллель гена каппа-казеина.

В разделе «Заключение» Тюлькин С.В. обобщает выполненные исследования и приводит выводы, полностью вытекающие из проведённых исследований.

Список литературы оформлен по соответствующим требованиям и не вызывает возражений. Диссертация написана грамотно и оформлена в соответствии с положением ВАК Минобрнауки РФ.

В целом диссертационная работа является завершённой, имеет внутренне единство, написана грамотно, свободно читается и воспринимается.

Автореферат диссертации соответствует установленным требованиям и в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

Наряду с очевидной положительной оценкой диссертационной работы необходимо отметить ряд замечаний и задать автору следующие вопросы.

1. Следует отметить, что автор приводит большое количество литературных данных по исследованиям полиморфизма различных генов и их связей с изменчивостью характеристик молочной продуктивности, но не уделяет достаточного внимания работам Галины Ефимовны Сулимовой, которая с начала 90 годов XX века первой из отечественных исследователей и достаточно подробно разрабатывала направление MAS с использованием генотипирования большинства генов, включенных в анализ в рассматриваемой диссертации.
2. В текстах автореферата и диссертации постоянно используется для обозначения гена, кодирующего ацил-CoA диацилглицерол ацилтрансфераза 1 обозначение «фермент». Этого недостаточно, должно быть указано название либо кодируемого белка (*DGAT1*), либо гена (*dgat1*).
3. В главе «Материалы и методы исследований» стр. 78-105 достаточно подробно описан порядок и условия проведения усовершенствованных способов ПЦР и ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов и наследственных заболеваний. Логично было бы привести авторский вклад в их усовершенствовании и модификации.
4. Данные таблиц 37-42 (стр. 174-181), касающиеся встречаемости комплексных генотипов генов белков молока, гормонов и фермента в трёх популяциях крупного рогатого скота трудно воспринимаются. Работа несколько выиграла, если эти данные были также приведены в виде рисунков-диаграмм. Следует отметить, что было бы естественным, если бы были рассчитаны отличия частот встречаемости аллельных вариантов (по разным генам попарно) в экспериментальных исследованиях от ожидаемых случайных комбинаций.
5. В работе на наш взгляд, в тексте встречаются стилистические погрешности и неудачные обороты, в основном технического характера.

Тем не менее, указанные замечания не снижают общую положительную оценку диссертационной работы, а носят дискуссионный характер.

### **Заключение**

Представленная диссертационная работа Тюлькина Сергея Владимировича на тему «Молекулярно-генетическое тестирование крупного рогатого скота по генам белков молока, гормонов, фермента и наследственных заболеваний», является законченным научно-исследовательским трудом, выполненный автором самостоятельно на высоком научно-методическом уровне, в котором получены новые данные о

способах выделения ДНК из биоматериала и проведения ПЦР и ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по генам каппа-казеина, диацилглицерол-О-ацилтрансферазы, миостатина. Решённая в диссертации актуальная проблема в области селекции животных на уровне ДНК вносит существенный вклад в решение задач по получению высокопродуктивных особей свободных от генетических мутаций, что имеет большое научно-социальное значение. Полученные автором результаты достоверны, заключение и выводы обоснованы. Работа базируется на достаточном количестве исходных данных. Она написана доходчиво и грамотно, аккуратно оформлена. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

По объёму проведённых исследований, анализу полученных результатов исследований, новизне и практической значимости, выводам и предложениям производству диссертационная работа соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК РФ, отвечает требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор Тюлькин Сергей Владимирович заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 06.02.07 – Разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных.

**Официальный оппонент:**

**Гражданин Российской Федерации**

**Доктор биологических наук,  
профессор РАН, ВРИО директора  
ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт пушного звероводства и  
кролиководства им. В.А. Афанасьева»**

**Косовский Глеб Юрьевич**

**«14» мая 2019 г.**

**Подпись Косовского Г.Ю. заверяю,  
Учёный секретарь ФГБНУ НИИПЗК,  
к.б.н.**

**А.Р. Мьяльзин**

**Глеб Юрьевич Косовский**

**Доктор биологических наук, профессор РАН, ВРИО директора ФГБНУ  
«Научно-исследовательский институт пушного звероводства и  
кролиководства им. В.А. Афанасьева». Почтовый адрес: 119618, г. Москва,  
ул. Главмосстроя, д. 10, кв. 177**

**Телефон: 89857614511**

**E-mail: gkosovsky@mail.ru**