ОТЗЫВ

официального оппонента **Калашниковой Любови Александровны** на диссертационную работу **Гильманова Хамида Халимовича** на тему «Генотипирование крупного рогатого скота по генам, определяющим устойчивость к лейкозу, и геноидентификация его этиологического агента», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных и 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Лейкоз является одним из наиболее частых инфекционных заболеваний в молочном скотоводстве. Особенно подвержены заболеванию высокопродуктивные животные. Высокая инфицированность стад крупного рогатого скота в ряде регионов Российской Федерации придает использованию генетических маркеров, связанных с выявлением инфицированных животных и устойчивостью к развитию лейкоза, особую **актуальность.**

Цель диссертационной работы Гильманова Х.Х. – оценка полиморфизма генов iNOS и BoLA-DRB3, определяющих устойчивость к лейкозу, определение ассоциаций генотипов iNOS и BoLA-DRB3 с хозяйственно-полезными признаками, и геноидентификация вируса лейкоза.

Исследования проводились с использованием современных методов молекулярно-генетического анализа, зоотехнической оценки и статистической обработки.

Объектом исследований являлись быки-производители молочных и мясных пород, принадлежащие ГУП ГПП «Элита» Республики Татарстан (68 голов).

Автором **впервые** разработан метод ПЦР-ПДРФ для генотипирования крупного рогатого скота по аллелям А и В полиморфного маркера AH13-1 гена iNOS, оптимизированы условия ПЦР локуса экзона 2 гена BoLA-DRB3 для дальнейшего секвенирования. Определены частоты встречаемости аллелей и генотипов и изучена их связь с племенной ценностью животных.

Идентифицированы генетические варианты вируса бычьего лейкоза, выявленные в стадах крупного рогатого скота Республики Татарстан.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные автором данные вносят вклад в разработку основ генетической устойчивости к вирусным заболеваниям.

Практическая значимость работы основана на возможности использования разработанных автором методов для мониторинга инфицированности стад крупного рогатого скота и развития способов маркерной селекции на повышение генетической устойчивости к развитию заболевания.

Структура диссертации соответствует требованиям ВАК. Диссертация изложена на 163 страницах и состоит из введения, литературного обзора, описания объекта и методов исследований, результатов собственных исследований, заключения, практических предложений, списка использованной литературы. Работа содержит 18 рисунков и 29 таблиц. Список использованной литературы включает 196 источников, в том числе 123 – на иностранных языках.

Автореферат в краткой форме отражает основные положения диссертационной работы.

В первом разделе собственных исследований показаны результаты выявления аллельных вариантов А и В полиморфного маркера AH13-1 гена iNOS. У чистопородных и помесных быков-производителей голштинской породы (60 голов) чаще встречался аллель А (0,525) и гетерозиготный генотип АВ (58,3%). У быков мясных пород (8 голов) частота аллеля А достигла 0,75 с равной частотой генотипов АА и АВ (по 50%).

Изучение ассоциаций генотипов AH13-1 гена iNOS с племенной ценностью быков-производителей по показателям молочной продуктивности женских предков выявило преимущество быков с генотипом ВВ.

При оптимизации условий проведения ПЦР-амплификации локуса экзона 2 гена BoLA-DRB3 для последующего секвенирования установлено,

что наиболее оптимальным вариантом является применение в реакции буфера Encyclo GC из набора реактивов «Encyclo Plus PCR kit».

Оценка полиморфизма гена BoLA-DRB3 показала, что наиболее часто у быков-производителей встречается аллель *24 с частотой 24,26%, на втором месте по частоте встречаемости аллель *8 и *16 (по 12,5%). Все они связаны с чувствительностью к лейкозу. В целом статусом генетической устойчивости к лейкозу обладало 40 быков-производителей, в том числе 39 быков молочного направления продуктивности и 1 бык мясной породы обрак.

При изучении ассоциаций генотипов BoLA-DRB3 быков-производителей с их племенной ценностью по показателям молочной продуктивности женских предков выявлена взаимосвязь пониженной молочной продуктивности с генетической устойчивостью к развитию заболевания.

Автором идентифицированы 179 провирусных изолятов из 21 района Республики Татарстан, определена их генотипическая принадлежность к четырем кластерам генотипов вируса бычьего лейкоза – первому, четвертому, седьмому и восьмому.

Сравнительный анализ 505 нуклеотидных последовательностей фрагмента гена env вируса бычьего лейкоза позволил усовершенствовать стратегию ПЦР-ПДРФ генотипирования в соответствии с филогенетической классификацией возбудителя.

В целом необходимо отметить, что материал диссертационной работы Гильманова Х.Х. представляет научный и практический интерес. Выводы вытекают из результатов исследований. Основные положения диссертации опубликованы в соответствии с требованиями ВАК РФ и обсуждены на научных конференциях.

Выше изложенное позволяет дать рецензируемой работе высокую оценку. Вместе с тем по работе имеются некоторые вопросы и замечания:

1. Высокая частота аллелей BoLA-DRB3, связанных с чувствительностью к лейкозу, и наличие их ассоциации с высоким уровнем продуктивности свидетельствуют об их селекционной предпочтительности. Каким образом реализовать селекцию, ориентированную на «аллели устойчивости к лейкозу» без потери уровня продуктивности?

2. «Аллели устойчивости к лейкозу» снижают риск развития клинических признаков заболевания у инфицированных животных, но не влияют на стадию инфицирования.

3. Неясно, какие преимущества дает метод генотипирования гена BoLA-DRB3 с использованием секвенирования по сравнению с традиционным методом ПЦР-ПДРФ при выявлении аллельных вариантов, связанных с чувствительностью к лейкозу.

4. Апробацией разработанного способа генотипирования гена iNOS не может быть «обеспечена корректная процедура оценки его аллельного полиморфизма». Корректность процедуры генотипирования подтверждается секвенированием полиморфных вариантов гена.

5. В диссертации и автореферате отсутствует раздел «перспективы дальнейших исследований»

Приведённые замечания не снижают значимости полученных результатов для использования ДНК-маркеров в селекции на повышение генетической устойчивости к лейкозу крупного рогатого скота и для совершенствования методов выявления инфицированных животных в стадах. Представленная работа направлена на решение актуальных проблем отрасли.

Заключение. Работа Гильманова Х.Х. по актуальности, новизне, объему проведенных исследований, теоретической и практической значимости результатов отвечает требованиям ВАК Минобрнауки РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 06.02.07 – разведение, селекция и генетика сельскохозяйственных животных и 06.02.02 – ветеринарная микробиология,

вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Официальный оппонент:
зав. лабораторией ДНК-технологий
ФГБНУ ВНИИ племенного дела,
доктор биологических наук,
профессор Калашникова Любовь Александровна

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела» 141212 Московская обл., Пушкинский р-н, п. Лесные Поляны, тел. 8 (495) 515-95-57, lakalashnikova@mail.ru

Подпись Л.А. Калашниковой заверяю.
Ученый секретарь ВНИИплем, к.с.-х.н. Л.Н. Григорян

21 марта 2019 г.