

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **ІВАЩЕНКО Оксани Юріївни**
на тему: **«Генетичне різноманіття популяцій великої рогатої худоби
за асоційованими з резистентністю ДНК-маркерами»,**
подану до разової спеціалізованої вченої ради РСВР 033
у Національному університеті біоресурсів і природокористування України
на здобуття ступеня доктора філософії
з галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство»
та спеціальності 204 «Технологія виробництва
і переробки продукції тваринництва»

Актуальність теми. Сучасні досягнення молекулярної генетики дали можливість ідентифікувати гени, пов'язані з якісними та кількісними ознаками великої рогатої худоби. Ідентифікація бажаних варіантів алелів таких генів дозволить здійснити традиційні методи відбору тварин за допомогою ДНК-маркерів. За допомогою ПЛР-діагностики генотип тварин визначається незалежно від статі, віку та фізіологічного стану, що є важливим та ефективним етапом в селекційно-племінній роботі з великою рогатою худобою. Найбільш інформативними в цьому плані є ДНК-маркери на основі аналізу поліморфізму структурних генів, що беруть участь у формуванні та функціонуванні господарсько-корисних ознак. Висока продуктивність корів обумовлена багатьма структурними генами і залежить певною мірою від резистентності організму тварини.

З огляду на це, дисертація, присвячена дослідженню впливу поліморфізму алелів генів асоційованих з резистентністю на продуктивність корів двох вітчизняних молочних порід є актуальною і своєчасною.

Мета і завдання досліджень. Для розкриття теми наукових досліджень чітко сформульовано мету, визначено завдання, якими передбачалося провести аналіз ефективності запропонованих методів визначення поліморфізму локусів толл-подібного рецептору 1 (*TLR1*); толл-подібного рецептору 4 (*TLR4*); мембранного білка A1 (*SLC11A1*), фактора некрозу пухлини α (*TNF\alpha*), манозозв'язувального лектину 1 (*MBL1*) і гамма-рецептора інтерферону 2 (*IFNGR2*) за використання біоінформаційних підходів; визначити поліморфізм генів толл-подібних рецепторів 1 і 4, мембранного білка A1, фактора некрозу пухлини α , манозозв'язувального лектину 1, гамма-рецептора інтерферону 2 в дослідних популяціях корів; провести порівняльний аналіз генетичної структури популяцій за дослідними локусами; визначити параметри молочної продуктивності корів з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами та розробити формули перспективних комплексних генотипів для популяцій корів досліджуваних порід.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у тому, що дисертанткою вперше визначено особливості генетичної структури та генетико-популяційних показників вітчизняних популяцій корів української чорно-рябої молочної і української червоно-рябої молочної порід за генами *TLR1*, *TLR4*, *SLC11A1*, *TNF α* , *MBL1* та *IFNGR2*.

Вперше визначено показники молочної продуктивності корів вітчизняної селекції з різними генотипами за маркерними мутаціями у локусах толл-подібного рецептора 1 (1596G>A), мембранного білка A1 (7400C>G і 7808A>T), фактора некрозу пухлини α (-824A>G), манозозв'язувального лектину (2651G>A) та інтерферону гамма-рецептора 2 (1008A>G). Розроблено формули бажаних комплексних генотипів за виявленими поліморфними локусами для кожної з порід корів.

Практичне значення роботи. За результатами дисертації визначено перспективні гени-кандидати для популяцій корів української чорно-рябої молочної і української червоно-рябої молочної порід: *SLC11A1* (7400C>G і 7808A>T в одинадцятому екзоні); *TNF α* (-824A>G у промоторному фрагменті гена) та *IFNGR2* (1008A>G в сьомому екзоні). Отримані експериментальні дані щодо особливостей генетичної структури корів української селекції та продуктивних ознак великої рогатої худоби з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами доцільно використовувати в селекційних програмах молочного скотарства та у програмах збереження вітчизняного генофонду корів.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, є достатнім, що демонструється сукупністю експериментального матеріалу, обґрунтованим теоретичним обговоренням власних і літературних даних. Якість досліджень, викладених у дисертації, підтверджується ретельно розробленими методиками, сучасними методами, застосованими для отримання експериментальних даних, репрезентативністю вибірок, грамотно застосованим статистичним аналізом. Логіка викладення матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертації.

Структура роботи побудована відповідно до чинних вимог і складається із анотацій українською та англійською мовами, списку опублікованих праць за темою дисертації, змісту, переліку умовних позначень, вступу, чотирьох основних розділів: огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів власних експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Дисертацію викладено на 206 сторінках,

що містить 42 рисунки та 26 таблиць. Список використаних джерел містить 220 джерел, у тому числі 179 латиницею.

В «Огляді літератури» у чотирьох підрозділах дисертанткою розглянуто маркер-асоційована селекція в розведенні великої рогатої худоби, поліморфізм генів родини Toll-подібних рецепторів (*TLR*), *SLC11A1*, *TNF α* , *MBL1*, *IFNGR2* та їх асоціативний зв'язок з параметрами продуктивності тварин, перспективи використання маркер-асоційованої селекції в молочному скотарстві та обґрунтування напряду власних досліджень.

У розділі «Матеріали та методи досліджень» наведено місце проведення і матеріал досліджень, загальна схема досліджень, перелік використаного обладнання. Ретельно розглянуто методики та методи досліджень, біоінформаційні методи аналізу нуклеотидних послідовностей, наведено формули обчислення біометричних і генетико-популяційних показників.

У розділі «Результати власних експериментальних досліджень» проведено аналіз ефективності генотипування за локусами кількісних ознак та оптимізація методів проведення ампліфікації за використання біоінформатики.

Досліджено поліморфізм гена *TLR1* за маркерною мутацією 1596G>A у першому екзоні в популяціях української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід корів. Встановлено високий рівень генетичного поліморфізму та достатньо високий рівень гетерозиготності, гетерозиготність, що спостерігалася, більш ніж на 10 % перевищувала очікувану.

Досліджено варіабельність гена *TLR4* за трьома мутаціями в третьому екзоні – *MspI*-поліморфізм (8732G>A), *RsaI*-поліморфізм (8834G>C) та *BsiHKA*I-поліморфізм (2021C>T). Доведено, що ген *TLR4* за кожною досліджуваною мутацією є мономорфним, це унеможливило подальше його використання в селекційних програмах з різними породами корів української селекції.

Досліджено поліморфізм гена *SLC11A1* за двома мутаціями – 7400C>G та 7808A>T в одинадцятому екзоні, кожна з яких представляє собою *Pst*I-поліморфізм. Встановлено, що для обох маркерних мутацій притаманний надлишок гетерозиготних особин у досить широкому діапазоні (від 13 до 39 %), що призвело до відхилень від генетичного рівноважного стану, це вказує на наявний аутбридинг.

Поліморфізм гена фактора некрозу пухлин альфа (*TNF α*) визначено за маркерною мутацією -824A>G у промоторному фрагменті. За результатами проведених досліджень визначено різні алельні варіанти гена *TNF α* в обох дослідних популяціях корів. Досліджені групи тварин характеризується високим рівнем генетичного поліморфізму та високим рівнем гетерозиготності. У обох

досліджених порід гетерозиготність, що спостерігалася, більш ніж на 10 % перевищувала очікувану.

Поліморфізм гена манозозв'язувального лектину (*MBL1*) досліджено за мутацією 2651G>A у другому екзоні, яка представляє собою StyI-поліморфізм. В обох популяціях переважав гетерозиготний генотип AG (0,57 та 0,76), генотип AA зустрічався з частотою 0,35 і 0,13 у корів української чорно-рябої молочної та української червоно-рябої молочної породи відповідно, а генотип GG є досить рідкісним.

Поліморфізм гена інтерферону гамма-рецептора 2 (*IFNGR2*) визначено за маркерною мутацією 1008A>G у сьомому екзоні гена. Отримані результати генотипування свідчать, що дослідний локус є поліморфним в обох популяціях корів. В популяції корів української чорно-рябої молочної породи наявні тварини зі всіма можливими генотипами: AA (0,39), AG (0,51), GG (0,1), тоді як у корів української червоно-рябої молочної породи присутні лише два з трьох генотипів: AA (0,47) і AG (0,53).

У результаті порівняння частот генотипів за шістьма обраними маркерними мутаціями в обраних популяціях корів виявлено, що профілі розподілу генотипів у всіх дослідних групах тварин за дослідними об'єктами дуже схожі, за винятком локусів *TNFA*, *MBL1* та *IFNGR2*.

Проведено дослідження ознак молочної продуктивності корів із різними генотипами за локусами *TLR1*, *MBL1* та *IFNGR2* впродовж трьох лактацій (вміст білка і жиру в молоці, а також значення середнього надою за 305 днів лактації).

В популяції корів української чорно-рябої молочної породи за локусом *TLR1* продуктивність тварин за третю лактацію з гомозиготними генотипами AA та GG була більша на одну тонну порівняно з коровами, що мали гетерозиготний генотип. За локусом *TNFA* тварини з гетерозиготним генотипом AG не поступалися за величиною надою тваринам з гомозиготними генотипами за дві перші лактації, при цьому тільки гетерозиготи впродовж трьох лактацій продемонстрували чітку тенденцію зростання рівня надою.

За мутацією 1008A>G у локусі *IFNGR2* за значеннями надою виявлено вірогідні відмінності між тваринами з різними генотипами (AA<AG та AA<GG, $p<0,05$). Найвищий показник надою характерний для корів з генотипом GG.

У корів української червоно-рябої молочної породи за локусом *TLR1* продуктивність за три лактації спостерігалася у тварин з гомозиготними генотипами.

За локусом *SLC11A1* за показниками молочної продуктивності найбільшими надоями відзначилися корови з гаплотипом CG-AA порівняно з тваринами з іншими гаплотипами (різниця достовірна на рівні $p<0,05$). Водночас, максимальна різниця відмічена з гаплотипом CG-AT (772,9 кг).

За локусом *TNF α* (SacI-поліморфізм) за результатами досліджень з'ясовано, що упродовж трьох лактацій максимальні значення показнику надою притаманні тваринам з гетерозиготним генотипом AG. При цьому, з кожною наступною лактацією значення надою збільшувалося на 509,8 кг (порівняно з другою) та на 922,6 кг (порівняно з третьою).

За локусом *MBL1* встановлено, що для першої і третьої лактації максимальні значення показнику надою були притаманні для гомозигот за алелем G, найнижчі – для гетерозиготних особин. Водночас, на другу лактацію картина істотно змінилася – найбільші значення надою було у корів гомозиготних за алелем A. Різниця між показником надою за 305 днів для тварин з генотипами AA та AG сягала більш ніж одну тонну за другу лактацію.

За мутацією 1008A>G у локусі інтерферону гамма-рецептора 2 порівняння показників молочної продуктивності проводили тільки для двох генотипів AA та AG внаслідок незначної кількості особин з генотипом GG. За результатами досліджень встановлено, що максимальні значення надоїв характерні для тварин з гетерозиготним генотипом AG для всіх трьох лактацій. Так, різниця між першою і другою становила 559,7 кг, між другою і третьою – лише 43,7 кг (для особин з генотипом AG).

Було проведено порівняльний аналіз параметрів продуктивності дослідних популяцій корів із різними генотипами за виявленими поліморфними локусами. За результатами проведених досліджень встановлено, що загальний внесок здійснюють алелі фактора некрозу пухлин α , манозозв'язувального лектину та інтерферону гама-рецептора 2. Тільки алельні варіанти локусу *TLR1* характеризуються породоспецифічними властивостями.

У розділі «Аналіз та узагальнення результатів досліджень» дисертантка обґрунтовує отримані результати. Ґрунтуючись на даних щодо виявленого поліморфізму дослідних генів з показниками молочної продуктивності корів визначено бажані генотипи. Перспективними у напрямі підвищення молочної продуктивності є наступні комплексні генотипи: *SLC11A1^{CG}SLC11A1^{AA}*, *TNF α ^{AG}*, *IFNGR2^{AG}* (українська червоно-ряба молочна); *TNF α ^{AA}* та *IFNGR2^{GG}* (українська чорно-ряба молочна).

Висновки відповідають меті і завданням, змісту виконаних досліджень та містяться у 10 пунктах, також запропоновано пропозиції виробництву.

Повнота викладення основних положень дисертації в опублікованих працях. За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, з яких стаття у науковому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та/або Web of Science Core Collection, 3 статті у наукових фахових виданнях України, колективна монографія, 9 тез наукових доповідей.

Загалом позитивно оцінюючи дисертацію О. Ю. Іващенко, слід вказати і на окремі недоліки, висловити **зауваження та побажання**:

1. Дисертація має назву: «Генетичне різноманіття популяцій великої рогатої худоби за асоційованими з резистентністю ДНК-маркерами», тому в меті і завданнях логічно було б зазначити разом з продуктивними якостями тварин, ще і показники резистентності.

2. В розділі 3 «Результати власних експериментальних досліджень» не бажано назву підрозділу 3.1 починати зі слова «Аналіз», підрозділ 3.8 – «Порівняльний аналіз».

3. С. 44. «...до внутрішньоклітинних патогенів, зокрема *M. bovis*». Вважаю не коректно називати *M. bovis* внутрішньоклітинним патогеном.

4. Ефективність виділення ДНК (перевірку її чистоти і кількості) у вертикальному електрофорезі бажано розписати більш ретельно.

5. Рис. 3.9, 3.13, 3.15, 3.17, 3.19, 3.25, 3.29, 3.33. Для інформативності рисунків на електрофореграмах продуктів рестрикції дослідних фрагментів генів бажано зазначити розміри патернів рестрикції як в дослідних зразках, так і на маркерах.

6. С. 70. Якщо у формулах 2.1. і 2.4 значення N тотожні, то достатньо привести пояснення « N – загальний об'єм вибірки» один раз у ф-лі 2.1. У протилежному випадку необхідно показати відмінність у позначеннях.

7. Породи великої рогатої худоби необхідно зазначати повністю: українська чорно-ряба молочна, українська червоно-ряба молочна.

8. С. 126. Не зрозуміло вислів: «...різниця між показником **стандартного** надою для тварин з гомозиготними генотипами AA та GG становить практично одну тонну за третю лактацію...». Можливо, стандартною для даної породи?

9. При аналізі літературних даних асоціацій досліджених маркерів з соматичними клітинами молока і захворюванням молочної залози було б дуже цікаво дослідити і проаналізувати ці асоціації на двох досліджених вітчизняних породах.

10. С. 157. В роботі написано: «В результаті проведеного аналізу асоціативних зв'язків виявлених генотипів за маркерними мутаціями з показниками молочної продуктивності корів встановлено вірогідну кореляцію між певними алелями та показниками молочного надою корів української чорно-рябої та червоно-рябої порід». Говорити про вірогідну кореляцію не доречно, бо її не визначали.

11. Перший та другий висновки мають декларативний (узагальнюючий характер).

12. Чи доречно зараз використовувати посилання на російські та російськомовні наукові джерела (№ 6, 9, 11, 13, 22, 23, 28, 171, 174, 188, 189, 190, 191, 192).

Вказані зауваження і побажання є дискусійними і не зменшують наукової цінності роботи, її актуальності та практичної значимості.

Загальний висновок. Враховуючи актуальність теми, обсяг досліджень, наукову новизну, кваліфікаційний рівень, аналіз одержаних результатів, оформлення, апробацію, зміст висновків і пропозицій виробництву, вважаю, що дисертація на тему: «Генетичне різноманіття популяцій великої рогатої худоби за асоційованими з резистентністю ДНК-маркерами» відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та Постанові Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а її авторка ІВАЩЕНКО Оксана Юріївна заслуговує присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 204 «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва» з галузі знань 20 «Аграрні науки та продовольство».

Офіційний опонент
завідувач кафедри гігієни тварин
та ветеринарного забезпечення
кінологічної служби
Національної поліції України
Закладу вищої освіти
«Подільський державний університет»,
доктор сільськогосподарських наук,
професор



Тетяна СУПРОВИЧ

Учений секретар ЗВО ПДУ,
кандидат сільськогосподарських наук,
доцент



Олена КОБЕРНЮК