

Jastrzębiec, 21 kwietnia 2017 roku

Dr hab. Jolanta M. Oprządek prof. IGHZ
Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN
05-552 Jastrzębiec
tel.: (22) 7367118
j.oprzadek@ighz.pl

R E C E N Z J A
rozprawy doktorskiej mgr PAULINY DANUTY PUCKOWSKIEJ
wykonanej w Katedrze Genetyki Zwierząt
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie,
pod kierunkiem prof. dr. hab. Stanisława Kamińskiego
oraz promotora pomocniczego dr. Pawła Brym
nt. "Polimorfizm genów *IGFL1*, *PGLYRP1*, *SIGLEC5* a wartość
wybranych cech użytkowych bydła rasy polskiej holsztyńsko-
fryzyjskiej"

Recenzja została wykonana na podstawie Uchwały Rady Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UWM w Olsztynie, zgodnie z wymogami Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz.U. z 2014 r. pozycja 1852 z późn. zmianami).

Identyfikacja genów warunkujących fenotypowe przejawianie się cech ilościowych jest trudna względu na dużą liczbę genów zaangażowanych w powstanie cechy, co w efekcie daje niewielki efekt addytywny. W ciągu ostatnich lat wiele uwagi poświęcono na identyfikację w obrębie całego genomu bydła *loci* cech ilościowych (QTL - ang. Quantitative Trait Loci), istotnych z ekonomicznego punktu widzenia. QTL to dające się łatwo zlokalizować markery genetyczne, które są najczęściej jedynie ściśle sprzężone z genami kontrolującymi interesujące nas cechy. W idealnych warunkach QTL mogą być włączane do programów selekcji wspomaganých markerami genetycznymi (MAS - ang. Marker Assisted Selection), jednakże większość QTL ma bardzo niewielki, stąd trudny do oszacowania wpływ. Do

końca 2016 zdeponowano ponad 99,7 miliona SNP u *Bos Taurus*. Szanse na urzeczywistnienie w/w koncepcji dają tzw. mikromacierze (chipy DNA), które pozwalają na genotypowanie osobników jednocześnie w tysiącach miejsc polimorficznych danego genomu. Za przykład może posłużyć mikromacierz BovineSNP50 v3 BeadChip obejmująca około 53,7 K SNP zebranych na podstawie wieloletnich badań asocjacyjnych bydła mlecznego i mięsnego. Umożliwiło to szybki rozwój wiodącego obecnie prym kierunku badań polegającym na wskazywaniu całych regionów genomu istotnie związanych z daną cechą. Technikę, która umożliwia równoczesną identyfikację tysięcy SNP oraz określenie ich związku z daną cechą określa się badaniem asocjacyjnym całego genomu (genome-wide association study). Poszukiwanie *loci* cech ilościowych jest kosztowne i jak dotąd nie przyniosło spektakularnych rezultatów u bydła mlecznego. Dotychczas potwierdzono jedynie znaczenie kilkunastu genów, przy czym powtarzalne wyniki dla biosyntezy tłuszczu w mleku opisuje się dla substytucji aminokwasu K232A warunkowanej mutacją w genie kodującym Acyl CoA acylotransferazę diacylglycerolową 1 (*DGAT1* na BTA14), zaś dla wydajności mlecznej i białka wskazywana jest najczęściej substytucja aminokwasu w pozycji F279Y w wyniku mutacji w genie kodującym receptor hormonu wzrostu (*GHR*) zlokalizowanym na BTA20. Pomimo wielu niekwestionowanych zalet, technika GWAS daje tylko orientacyjne wskazówki co do potencjalnych QTL, lecz nie wyjaśnia mechanizmu przyczynowo-skutkowego danego procesu biologicznego. Liczba znanych genów, mających wpływ na poszczególne cechy ilościowe nie jest do końca ustalona, stąd konieczne jest ciągle powtarzanie szacowania ewentualnych związków pomiędzy polimorfizmem potencjalnych genów a cechami użytkowości. Ważne jest genotypowanie zwierząt w oparciu o nowo odkryte SNP, połączone z gromadzeniem informacji umożliwiających ich powiązanie z użytkowością. Stanowi to element strategii określanej jako poszukiwanie genów kandydujących (ang. candidate genes) danej cechy ilościowej. Podejście to opiera się na wyborze genów, których produkty białkowe biorą bezpośredni udział w konkretnych procesach fizjologicznych

1/3

Recenzowana rozprawa wpisuje się dokładnie w ten właśnie obszar badań i uważam, że Autorka podjęła się niezwykle ambitnego zadania wymagającego ogromnej pracy związanej z przeprowadzonym badaniem, generującymi wiele danych wymagających żmudnej obróbki związanej z analizą. Rozprawa liczy 72 strony, zawiera 11 tabel, 15 rysunków. Na początku zamieszczony jest wykaz jednostek, wzorów odczynników i niektórych skrótów, dzięki czemu praca jest bardziej czytelna.

Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera wszelkie elementy, które z formalnego punktu widzenia powinny być uwzględnione w rozprawie doktorskiej w tym wstęp połączony z przeglądem literatury zakończony celem pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawę przedstawiono w formie książkowej, w zawartym maszynopisie.

WSTĘP i PRZEGLĄD LITERATURY

We wstępie i przeglądzie piśmiennictwa, opartym na najnowszych pracach autorów, zarówno krajowych jak i światowych, omówione zostały najważniejsze zagadnienia związane z użytkowością opasowa i rzeźną oraz jakością mięsa wołowego. W dalszych częściach znajdujemy bogaty przegląd na temat markerów SNP zlokalizowanych w chromosomie 18 i ich związku z cechami funkcjonalnymi (płodność, liczba komórek somatycznych) oraz cechami produkcyjnymi. W dalszej części Autorka bardzo szczegółowo omawia badane geny i polimorfizmy.

CEL

Cel pracy jest jasny i przejrzysto napisany. Celem było ustalenie zależności pomiędzy polimorfizmem genu *IGFL1*, *PGLYRP1*, *SIGLEC5* na cechy użytkowości mlecznej krów phf oraz określenie związku pomiędzy polimorfizmem tych genów a wartością hodowlaną buhajów rasy phf odmiany czarno-białej.

Mo³

MATERIAŁ I METODY

Dobrze opracowany rozdział, opisujący zarówno rejestrację cech fenotypowych oraz metody molekularne. Przyjęta metodyka jest poprawna i właściwa dla tego rodzaju badań. Badaniami objęto 876 krów i buhajów rasy phf odmiany czarno-białej. Należy podkreślić, że jest to bardzo liczny, w niewielkim stopniu spokrewniony materiał badawczy, gwarantujący osiągnięcie zamierzeń naukowych sformułowanych w celu pracy. Badane krowy były objęte systematyczną kontrolą użytkowości mlecznej prowadzoną przez PFHBiPM. Dane potrzebne do badań zostały udostępnione przez właściciela stada. W tym przypadku niezbyt trafne jest określenie „*analizując kartę jałówki-krowy*” raczej powinno być analizując dane dotyczące użytkowości. Czy badaniami objęto tylko krowy-pierwiastki? Tak wynika z rozdziału 3.3.2 (Badania asocjacyjne).

W opisie materiału i metod badawczych są jednak pewne niejasności: w badaniach Autorka ograniczyła się do techniki RFLP –LP zastanawiam się, dlaczego np. nie wykorzystano metody HRM: High Resolution Melt” czyli dyskryminacji różnych alleli za pomocą różnic we wzorze krzywej topnienia matrycy po reakcji PCR.

W przypadku analiz statystycznych wdało się pewne zamieszanie w opis analize statystycznej danych można było opracować wykorzystując procedurę ANOVA lub MIX pakietu statystycznego SAS. Procedura UNIVARIATE służy między innymi do badania czy badane cechy mają rozkład normalny. Autorka pisze, że w przypadku odrzucenia hipotezy o zgodności rozkładów zastosowano testy nieparametryczne. Które cechy nie miały rozkładu normalnego? oraz co można było zrobić, aby cechy te miały zbliżony rozkład do normalnego? Czy wtedy można zastosować testy parametryczne? Czy genotyp ma wpływ stały czy losowy na badane cechy? Czy w modelu uwzględniono tylko czynniki środowiskowe?

Brakuje także informacji na temat spokrewnienia badanej populacji. W modelu uwzględniono losowy wpływ ojca, zatem rodzi się pytanie ilu było ojców?

Podsumowując, należy stwierdzić, że ten rozdział rozprawy został

dobrze i logicznie zaplanowany.

WYNIKI

W rozdziale WYNIKI szczegółowo przedstawiono uzyskane rezultaty zamieszczając je w przejrzystych i prawidłowo opisanych tabelach, ułatwiając interpretację uzyskanych wyników. Sposób omówienia i prezentacji wyników jest przejrzysty i kompletny. Po zakończeniu analiz Autorka drobiazgowo przedyskutowała zaobserwowane prawidłowości starając się za każdym razem dotrzeć do mechanizmu tłumaczącego omawiane zjawiska. Wykazała się tym samym umiejętnością interpretacji wyników, ale także erudycją nieodzowną do tak dogłębnej analizy.

Niewątpliwie najciekawszą częścią wyników była analiza wpływu badanych polimorfizmów na wybrane cechy użytkowości mlecznej i cechy funkcjonalne. W tabeli nr 6 podano ogólną charakterystykę zmienności badanych cech. Jak Doktorantka odnosi się do informacji, że minimalny wiek pierwszego wycielenia wynosi 359 dni? Czy taka sytuacja jest w ogóle możliwa?

Doktorantka stwierdza, że przeprowadzone analizy statystyczne dowiodły, że wytypowane polimorfizmy badanych genów wykazują słaby związek z cechami użytkowymi krów.

Interesującym było wykazanie przez Autorkę istotnego związku pomiędzy polimorfizmem genów *PGLYRP1* i *SIGLEC5* a wartością hodowlaną buhajów. W przypadku genu *PGLYRP1* stwierdzono, że allel T a w przypadku genu *SIGLEC5* allel G są istotnie powiązane z wartością hodowlaną wydajności białka.

Moja drobna uwaga dotyczy tabel z wynikami, proponuję podawać skorygować przy opublikowaniu pracy. Wyniki związane dniami jak np. wiek pierwszego ocielenia bez miejsc po przecinku np. 847 dni podobnie w przypadku liczby inseminacji, gdzie autorka podaje wyniki z dokładnością do 4 miejsc po przecinku (1,8002).

Czy w tabela z wynikami (8, 9, 10) podane wartości to wartości średnie, czy jak by wynikało z tytułu to LSM (średnie najmniejszych kwadratów)?

DYSKUSJA

Dyskusja wyników została przeprowadzona bardzo dobrze i przekonywująco. W zakończeniu tego rozdziału autorka jeszcze raz umotywowwała podjęcie wybranej tematyki badawczej oraz narzędzi metodycznych. Po zakończeniu analiz Autorka drobiazgowo przedyskutowała zaobserwowane prawidłowości starając się za każdym razem dotrzeć do mechanizmu tłumaczącego omawiane zjawiska. Wykazała się tym samym umiejętnością interpretacji wyników, ale także erudycją nieodzowną do tak dogłębnej analizy.

WNIOSKI

Zakończeniem pracy było sformułowanie przez Autorkę ośmiu wniosków, wynikających bezpośrednio z przeprowadzonych analiz. Nie cytując ich w pełnym brzmieniu chciałabym zwrócić uwagę na jeden z nich, bowiem resztę traktuję raczej, jako podsumowanie. Bardzo wartościowym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest ostatni, w którym Autorka stwierdza, że badane polimorfizmy wykazują związek z cechami płodności. A w związku z ich niską odziedziczalnością może znaleźć praktyczne zastosowanie w selekcji bydła mlecznego.

W podsumowaniu autorka jeszcze raz podkreśla, że liczebność zbadanych genotypów pozwala na przeprowadzenie tego typu badań i wyciągnięcie prawidłowych wniosków

Moim zdaniem praca powinna być zakończona działem PODSUMOWANIE I WNIOSKI, ponieważ większość punktów odnosi się do podsumowania wyników.

W przedstawionej do oceny pracy odniesiono się do 89 publikacji z aktualnego światowego piśmiennictwa.

REASUMUJĄC

Układ pracy jest prawidłowy i przejrzysty, numeracja rozdziałów logiczna a całość jest napisana przejrzysto i z zachowaniem dobrego stylu i poprawnego języka. Praca charakteryzuje się dużą potencjalną wartością

aplikacyjną. Nieliczne niejasności, na jakie natknęłam się w treści opracowania w niczym nie umniejszają wartości tej pracy i traktuję je, jako dyskusyjne lub redakcyjne i nie mają znaczenia dla oceny pracy. Drobne uwagi natury redakcyjnej, mogą być pomocne w przygotowaniu pracy do druku.

Zakres badań, będących podstawą recenzowanej rozprawy, opracowanie i właściwa interpretacja uzyskanych wyników oraz ich znaczenie dla nauki i hodowli, upoważniają mnie do stwierdzenia, że omawiana praca spełnia warunki stawiane rozprawie doktorskiej określone w art. 13 Ustawy o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach Naukowych i Tytule w Zakresie Sztuki z 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz. 595). Wnoszę więc do Rady Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr **inż. Pauliny Danuty Puckowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Gładki