



Jastrzębiec, 07.01.2021 r.

Dr hab. Agnieszka Korwin-Kossakowska, profesor IGBZ
Zakład Genomiki i Bioróżnorodności Zwierząt
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu
ul. Postępu 36A, 05-552 Jastrzębiec

Recenzja pracy doktorskiej mgr Igora Jasielczuka

pt. "Wykorzystanie markerów SNP do identyfikacji przynależności rasowej bydła"

pod kierunkiem

dr hab. Tomasza Ząbka oraz dr hab. Artura Gurguła,

Formalny opis rozprawy

Rozprawa liczy 102 strony maszynopisu i posiada typowy układ dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów. Wstęp (28 stron) zawiera 7 rozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. W dalszej kolejności, po przedstawieniu celów badań rozpoczyna się opis materiału i metod (6 stron). Następny rozdział „Wyniki” (41 stron) jest podzielony na 5 rozdziałów i kilkanaście podrozdziałów, po których następuje dyskusja licząca 17 stron. Rozprawa kończy się przedstawieniem wniosków oraz spisem literatury zawierającym 127 pozycji. Praca uzupełniona jest przez 21 tabel i 25 rysunków. Do manuskryptu dołączone zostały materiały uzupełniające w formie elektronicznej.

Podsumowanie rozprawy

Praca poświęcona jest poszukiwaniu metod selekcji markerów oraz metod statystycznych umożliwiających stworzenie panelu markerów typu SNP, dzięki któremu możliwe byłoby przypisanie indywidualnego genotypu osobnika do konkretnej rasy bydła. Do tej pory opublikowano co najmniej kilkanaście prac na temat opracowania metod umożliwiających rozróżnienie ras w oparciu o markery molekularne. Główny problem w opracowaniu takich metod stanowił wybór odpowiednich zbiorów markerów umożliwiających efektywne rozróżnianie ras, w tym spokrewnionych genetycznie ras lokalnych. W przedłożonej mi do oceny pracy przebadano 1659 losowo wybranych osobników przynależnych do dziesięciu ras bydła utrzymywanego w Polsce. Badane rasy to zarówno rasy lokalne, objęte programami ochrony zasobów genetycznych jak i rasy wysoko produkcyjne o ogólnosiwiatowym zasięgu. Z materiału biologicznego pobranego od tych osobników np. krwi, nasienia lub fragmentu ucha wyizolowano DNA, które poddano analizie z wykorzystaniem dwóch rodzajów mikromacierzy: Illumina BovineSNP50v2Bead chip oraz Illumina BovineSNP50v3. Następnie przefiltrowano dane otrzymane po skanowaniu. Wykorzystano próbki od zwierząt, dla których ustalono więcej niż 95% genotypów oraz wybrano SNP o współczynnikach jakości GenCall powyżej 0.7 i GenTrain powyżej 0.4. Usunięto markery, dla których procent poprawnych genotypów był niższy niż 90%, a frekwencja rzadszego allelu była niższa niż 1% oraz te, dla których stwierdzono odstępstwo od równowagi Hardyego-Weinberga. Przeprowadzono redukcję markerów sprzężonych. Ostateczny panel markerów wspólnych dla wszystkich badanych ras obejmował genotypy dla 41276 markerów SNP, stanowiącą podstawę do dalszych obliczeń. Do identyfikacji markerów najbardziej



różnicujących badane rasy wykorzystano trzy metody statystyczne: delta (D), współczynnik F_{ST} (dystans genetyczny Wrighta) między parami ras (F) oraz F_{ST} pomiędzy jedną rasą względem pozostałych (G). Dodatkowo do wszystkich metod zastosowano dwa podejścia metodyczne wyboru markerów. Dla każdej zastosowanej metody selekcji stworzono 3 panele o różnej wielkości, liczące odpowiednio 96, 192, 288 markerów. W ten sposób stworzono 18 różnych zbiorów markerów najbardziej różnicujących badane rasy. Spośród wszystkich markerów 10 było wspólnych dla wszystkich 18 paneli markerów. W pracy opisano ich nazwy, lokalizacje chromosomowe i pozycje w genomie. Opracowane w niniejszej pracy podejście metodyczne doboru markerów umożliwiło identyfikację SNP-ów o większej sile dyskryminacji analizowanych ras bydła niż w dotychczas stosowanych.

Ocena merytoryczna pracy

Wstęp

W rozdziale tym Doktorant pomieścił skondensowaną wiedzę leżącą u podstaw zagadnień będących przedmiotem rozprawy, podkreślając tylko istotne problemy. Dzięki temu czytelnik zostaje gładko wprowadzony w dalsze części pracy. Tę część oceniam bardzo wysoko.

Hipoteza i Cele

Cele pracy zostały sformułowane w oparciu o przyjętą przez Doktoranta **hipotezę** badawczą: która zakłada, że wdrożenie do praktyki hodowlanej metody umożliwiającej określenie rasy osobnika w oparciu o markery SNP oraz jednocześnie metody oceny prawidłowości parametrów genetycznych populacji, może być wykorzystane jako narzędzie zrównoważonej pracy hodowlanej oraz ochrony bioróżnorodności.

Autor wyznaczył dwa główne **cele** przeprowadzonych badań:

Cytuję. „*Celem niniejszych badań było wykorzystanie wybranych metod selekcji markerów oraz metod statystycznych umożliwiających przypisanie osobnika do rasy pochodzenia w oparciu o dane genotypowe, w celu utworzenia panelu markerów SNP obejmującego jak najmniejszą liczbę SNP zawartych na mikromacierzy Illumina BovineSNP50 niezbędnych do efektywnego i pewnego przypisania indywidualnych genotypów do wybranych ras bydła utrzymywanych w Polsce.*

Dodatkowym aspektem badań było określenie przydatności stworzonego panelu markerów do oceny struktury i zmienności genetycznej w obrębie analizowanych ras”.

Według mnie zarówno hipoteza na str. 23 jak i cel na str. 24 są źle sformułowane i zbyt zawile. Hipoteza jest jednym długim zdaniem, w trakcie czytania już w połowie traci się jego sens. Cel podobnie - niepotrzebnie długie i skomplikowane zdania. Proponuję uproszczenie hipotezy jak powyżej, a celu w następujący sposób:

Celem niniejszych badań było:

1. utworzenie panelu markerów SNP obejmującego jak najmniejszą liczbę markerów zawartych na mikromacierzach Illumina BovineSNP50, niezbędnych do efektywnego i pewnego przypisania indywidualnych genotypów osobnika do ras bydła utrzymywanych w Polsce. W tym celu wykorzystano odpowiednie metody selekcji markerów oraz metody statystyczne.
2. określenie przydatności stworzonego panelu do oceny struktury i zmienności genetycznej w obrębie analizowanych ras.



Material i metody

Materiał do badań jest liczny i dobrze dobrany, różnorodność dostępnych ras robi wrażenie, również ważne są równe liczebności w grupach rasowych. Zaproponowane metody są odpowiednie do założonych zadań.

Pragnę jednak podkreślić, że przedstawiona praca doktorska obejmuje wyjątkowo rozbudowany eksperyment i bardzo bogaty panel badanych parametrów. Tak rozbudowany plan doświadczenia stawia szczególnie wysokie wymagania odnośnie sposobu jego prezentacji. Bardzo ważnym elementem w ocenie pracy doktorskiej jest ocena zakresu wykonanych analiz, w tym liczby zwierząt, grup doświadczalnych, zastosowanych metod selekcji markerów, metod ich alokacji i ocena efektywności. Ponieważ autor nie przedstawił kompleksowego schematu przeprowadzonych badań z włączeniem wszystkich wątków i procedur, zrozumienie układu doświadczenia wymagało ode mnie kilkakrotnej analizy rozdziału Materiał i Metody.

O ileż prostsze byłoby załączenie poglądowej ryciny lub choćby schematu w punktach.

Wyniki

Stworzone panele markerów wykorzystano do przyporządkowywania wszystkich czystorasowych osobników do ras ich pochodzenia, za pomocą trzech różnych algorytmów alokacji, a ich efektywność oceniono pod kątem wskaźników tj.; czułość, średnie prawdopodobieństwo przypisania, specyficzność. Z uwag szczegółowych do tego rozdziału: mam wątpliwości co metod szacowania efektywności metod alokacji. Z zastosowanych tu trzech wskaźników, zaproponowanych na podstawie literatury, Negrini i wsp. 2007, dwa wydają się odzwierciedlać dokładnie to samo - wskaźnik C, czyli czułość wydaje się odzwierciedlać dokładnie to samo co wskaźnik S, czyli specyficzność a $N_p + N_b$ to to samo co $N_p + N_b$. Zresztą autorzy w dyskusji przyznają, że są to wskaźniki „pokrewne”.

W dalszej części wyników stwierdzono, że w stosunku do polskich ras zachowawczych rasy wysokoprodukcyjne były sprawniej przydzielane do rasy pochodzenia i osiągały wyższe wartości wszystkich zastosowanych wskaźników oceny efektywności alokacji, a chromosom 6 bydła (BTA6) charakteryzował się zdecydowanie największą liczbą markerów SNP o największej sile dyskryminacji. Analiza wyselekcjonowanych paneli/zbiorów markerów do określenia zróżnicowania genetycznego populacji wskazała na ich wysoką przydatność.

To co napisano powyżej to krótkie podsumowanie wyników, w rzeczywistości rozdział ten jest ogromnie rozbudowany a mnogość otrzymanych wyników, w tym danych liczbowych robi ogromne wrażenie. Z drugiej jednak strony jest to bardzo trudne do ogarnięcia i zweryfikowania ich poprawności pomimo, że wyniki te są zestawione zgodnie z sekwencją przeprowadzonych doświadczeń. Ten nadmiar ratują użyte do ilustracji wyników tabele i wykresy, które są bardzo przejrzyste. Szczególnie podoba mi się pomysł barwnego podkreślania danych liczbowych w tabelach 4, 5, 8, 13-16, 18-21, co pozwala na szybsze zorientowanie się w ogólnej tendencji wynikającej z wartości liczbowych. Nie wiem tylko dlaczego w podpisie do tabeli 4 opisano kolory odwrotnie – zielony – najwyższe wartości, czerwony – najniższe. To pomyłka czy zabieg celowy ?

Dyskusja

Dyskusja obejmuje kilka zagadnień przedstawionych na tle literatury lub wcześniejszych badań, m.in. wybór metod selekcji markerów i ich efektywność, wybór metod alokacji, ocena ich efektywności. Jest też rzetelne omówienie znaczenia uzyskanych wyników, bardzo dobre, jasne i czytelne ich podsumowanie. Szczególnie ciekawy rozdział to omówienie



otrzymanych wyników na tle wcześniejszych badań, w tym podkreślenie trudności przeprowadzenia takich porównań. Szeroko omówiono ocenę przydatności wyselekcjonowanych paneli markerów do badań z zakresu genetyki populacyjnej, wymieniając takie parametry jak: zmienność genetyczna wewnątrz populacji, heterozygotyczność, współczynnik inbredu, PCA, dystans genetyczny, analiza admiksji.

Wnioski

Wnioski są właściwie podsumowaniem pracy (np. pkt 6,7,9). Rzeczywiste wnioski powinny być odpowiedzią na postawiony cel pracy. Dopiero punkt 10-y odnosi się do postawionego w celu pytania tzn. który z paneli będzie najbardziej przydatny do rozróżnienia analizowanych ras i pkt 12-y, dający odpowiedź na drugą część celu. Pozostałe punkty są wg mnie podsumowaniem metod selekcji markerów i metod statystycznych zastosowanych aby osiągnąć w/w cele.

Ostatni wniosek jest źle sformułowany, trudno zrozumiały. Czy *wyselekcjonowane zbiory markerów* to nie to samo co *zredukowane panele markerów*? Jeśli tak, to są tu powtórzenia i wyszło z tego tzw. masło maślane

Za oryginalny wkład ocenianej rozprawy uważam :

1. zaproponowanie po raz pierwszy metody selekcji markerów G (dystans genetyczny pomiędzy jedną rasą względem pozostałych), dzięki czemu w stworzonych zbiorach markerów znajduje się pula SNP różnicująca daną rasę od wszystkich innych analizowanych ras, nawet tych najbardziej podobnych genetycznie.
2. dużą różnorodność ras, zaangażowanych do badań, zarówno w zakresie ras rodzimych, jak i wysokoprodukcyjnych.
3. zidentyfikowanie dużej liczby markerów przydatnych w wyselekcjonowanych zbiorach umiejscowionych na chromosomie 6 (BTA6), co może się wiązać, jak wspominają autorzy z umiejscowieniem na tym chromosomie właśnie licznych QTL-i dla cech produkcyjnych bydła, takich jak mleczność, mięsnosc, cechy produkcyjne.

Podsumowanie

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska pana magistra Jasielczuka pt. „Wykorzystanie markerów SNP do identyfikacji przynależności rasowej bydła” ma charakter nowatorski i w istotny sposób poszerza dotychczasowy stan wiedzy na temat wykorzystania danych genotypowych do rozróżniania ras i analizy ich struktury genetycznej. Imponujące spektrum badanych parametrów, zaawansowane procedury badawcze oraz jakość uzyskanych wyników sprawiają, że bez wątplenia będą one publikowane w renomowanych czasopismach. Pomimo kilku krytycznych uwag, w tym m.in. dotyczących sposobu prezentowania układu doświadczalnego, czy zbyt mało skonkretyzowanych wniosków uważam, że przedstawiona do recenzji praca zawiera oryginalne dane weryfikujące postawione hipotezy i całkowicie spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Zakończenie

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule



naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) oraz przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki PIB w Balicach o dopuszczenie mgr Igora Jasielczuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę bardzo szerokie ujęcie tematu, mnogość uzyskanych wyników, bardzo dobre ich przedstawienie oraz potencjał publikacyjny pracy wnioskuję do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.


Dr hab. Agnieszka Korwin-Kossakowska