

Dr hab. Urszula Kaczor
Katedra Biotechnologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
ul. Rędzina 1b, 30-248 Kraków

RECENZJA

rozprawy doktorskiej magistra inż. Tomasza Szmatoły
pt. „Charakterystyka ciągów homozygotyczności u wybranych ras bydła”

*Praca powstała pod kierunkiem dr hab. inż. Tomasza Ząbka, prof. IZ
w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu
Badawczego w Krakowie*

Temat przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej dotyczy charakterystyki i struktury ciągów homozygotyczności (ROH) w genomach 11 ras bydła występujących w Polsce. Analiza ciągów homozygotyczności w populacjach ludzkich czy zwierzęcych jest zagadnieniem stosunkowo niedawno rozpatrywanym w piśmiennictwie i przede wszystkim dotyczy badań filogenetycznych czy ocenie chowu wsobnego. Jest ona nieodłącznie związana z rozwojem wysokoprzepustowych metod analizy genomu, w szczególności sekwencjonowaniem nowej generacji oraz mikromacierzami genotypowymi.

Doktorant obrał sobie za cel identyfikację ROH w genomach krajowych ras bydła zróżnicowanych pod względem typu użytkowego tj. mlecznego: holsztyńsko-fryzyjska odmiany czarno-białej i czerwono-białej, rasa simentalska, oraz montbeliarde; mięsnego: limousine, hereford, charolaise; dwukierunkowego: bydło białogrzbięte, polskie czerwone, polskie czerwono-białe i polskie czarno-białe. Autor przedstawił regiony genomu o wysokiej częstości występowania ROH tzw. „hotspots” i podjął się określenia wzorców ROH w zależności od rasy i typu użytkowego. Wyniki te zostały wykorzystane do oszacowania stopnia inbredu (F_{ROH}) badanych populacji zwierząt. Celem zasługującym na uwagę, a nie mającym odzwierciedlenia w tytule pracy, było zidentyfikowanie genów kandydujących w regionach genomów o wysokiej częstości występowania ciągów i powiązanie ich z procesami metabolicznymi istotnymi z punktu widzenia selekcji.

Zważywszy na obecny stan wiedzy, podjęcie badań przedstawionych w niniejszej dysertacji jest ze wszech miar zasadne. Co więcej, użycie bardzo nowoczesnych metod analizy genomu umożliwiło uzyskanie wiarygodnych i wysoce oryginalnych wyników. Tematyka przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest zatem aktualna, a podjęte przez Doktoranta badania wpisują się w intensywne poszukiwania w obszarze szeroko pojętej genomiki, zarówno na poziomie badań podstawowych jak i potencjalnie użytkowych.

Rozprawa doktorska liczy 102 stron maszynopisu. Jej układ i podział na rozdziały w pełni odpowiada przyjętym standardom. Znajdujące się w rozprawie rozdziały: cel z sześcioma celami szczegółowymi, dyskusja z podsumowaniem oraz wnioski prowadzą

czytelnika od odpowiedzi na postawione cele, poprzez argumenty na ich weryfikację aż do siedmiu konkluzji wysuniętych na podstawie przeprowadzonych badań.

Na początku rozprawy zamieszczono *Wykaz skrótów* i *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, co dodatkowo ułatwia precyzyjne poruszanie się w tematyce rozprawy. Zebranie informacji w rozdziale *Metodyka* nt. materiału i stosowanych metod w jednej tabeli i 5 podrozdziałach, a także przejrzysta prezentacja *Wyników* (5 wykresów, 12 tabeli oraz wykresu i tabeli w Suplemencie S1) to niewątpliwe zalety rozprawy. Spis literatury zacytowanej w rozprawie znajdujemy w rozdziale *Piśmiennictwo* zawierającej 95 publikacji, głównie anglojęzycznych.

Zawarty na 8 stronach rozdział *Wstęp*, będącym zarazem przeglądem literatury, stanowi doskonale wprowadzenie do tematyki rozprawy. Autor uzasadnia celowość podjęcia badań tzn.: kryteria identyfikacji ciągów homozygotyczności, wykorzystanie ich do oceny poziomu inbredu, wzorce ROH. Na kolejnych 3 stronach dysertacji Doktorant omawia piśmiennictwo związane z samymi badaniami ciągów a cytowane prace, z których najstarsza pochodzi z 2006 roku przedstawiają identyfikację ciągów homozygotyczności w genomach ludzkich i zwierzęcych. Opisuje pierwsze badania prowadzone w różnych populacjach bydła europejskiego i bizona europejskiego z uwzględnieniem ras transgranicznych jak i lokalnie występujących w różnych rejonach świata. W omawianym rozdziale Doktorant podaje przykłady wyjątkowo homozygotycznych populacji utrzymywanych bez „dolewu genów”, u których pokrycie genomu przez ROH wynosiło 95% co wskazuje na minimalną zmienność genetyczną i skrajną homozygotyczność.

Zakończenie rozdziału *Wstęp* stanowi podrozdział *Cel pracy*, w którym Autor w sposób bardzo szczegółowy przedstawił postawione do realizacji zadania, szczegółowo je uzasadniając. Dodatkowo na zakończenie podrozdziału sformułował 6 celów szczegółowych. Uważam, że właśnie krótko i jasno sprecyzowane cele byłyby wystarczające i zupełnie niepotrzebnie wprowadzono, na początku podrozdziału dodatkowe opisy dublujące treść.

W rozdziale *Metodyka* na 4 stronach przedstawiono opis materiału zwierzęcego oraz przyjętych metod analiz molekularnych i bioinformatycznych. Autor objął badaniami 1931 zwierząt należących do 11 ras bydła, z podziałem na 3 typy użytkowe. W tabeli 1 szczegółowo przedstawiono liczebności poszczególnych ras, jednak Autor nie sprecyzował jak wybierano osobniki, z jakich i ilu stad, czy też z którego regionu kraju pochodziły zwierzęta. W tabeli zamieszczono symbole ras, ale nie wprowadzono w legendzie rozwinięcia skrótów, co utrudnia odczyt informacji w niej zawartej. Brak dokładniejszej charakterystyki materiału skłania do pytania dlaczego do typu użytkowego mlecznego, obok obu odmian rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, zakwalifikowano rasę simentalską. Dlaczego Autor nie zakwalifikował tej rasy do grupy zwierząt o typie dwukierunkowym? Tym bardziej, że we wzorcach rasowych najczęściej prezentuje się bydło simentalskie jako typ kombinowany mięsno-mleczny.

Pan mgr Tomasz Szmatoła wykorzystał do badań genomowe DNA wyizolowane ze zróżnicowanych materiałów biologicznych: oraz przeprowadził proces genotypowania, z wykorzystaniem mikromacierzy Illumina BovineSNP50. Należy zwrócić uwagę na prawidłowość przyjętych wskaźników CallRate, GenCall, GenTrain oraz kategoryzację długości ROH, które są typowe dla większości tego rodzaju prac. Przyjęta metodyka obliczenia współczynnika inbredu zaczerpnięta z pracy McQuillana i in. (2008) również nie

budzi wątpliwości. Wprowadzenie kryterium 1% najwyższych wartości wystąpień SNPs w wyznaczaniu regionów genomu o wysokiej częstotliwości występowania ROH, należy przyjąć za uzasadnione w identyfikacji genów kandydujących podlegających selekcji w badanych populacjach.

W kolejnym rozdziale zostały przedstawione *Wyniki*, które zilustrowano 6 wykresami i zebrano w 11 tabelach, dodatkowo wprowadzając informacje uzupełniające w suplementach -tabela S1 i wykres S1. Uzyskane rezultaty stanowią efekt przeprowadzenia 3 rodzajów analiz:

- ✓ Identyfikacji i określenia wzorców ROH w genomach badanych zwierząt oraz porównanie ich z uwzględnieniem rasy i typu użytkowego.
- ✓ Szacowania współczynników inbrodu F_{ROH} w badanych populacjach.
- ✓ Wykrycia regionów ROH hotspots i identyfikację w nich genów kandydujących.

Opisane w pierwszej części pracy wyniki zostały przedstawione w odpowiedni sposób, adekwatnie do zamieszczonych wykresów i tabel. Prezentowane rezultaty uważam za wartościowe. Autor wykazał różnice i podobieństwa pomiędzy rasami z uwzględnieniem typu użytkowego, charakteryzując je pod względem liczby ROH i średniej sumy długości ROH przypadających na zwierzę (wykres 2 oraz tabela 2) Najwyższe średnie liczby ciągów zaobserwowano dla rasy hereford a najniższe dla ras zachowawczych białogrzbieta i polskiej czerwonej. Podobne wyniki uzyskał Autor dla średnich sum długości ciągów. Rasę hereford cechowały najwyższe wartości we wszystkich kategoriach długości ROH, nieco niższe wartości zaobserwowano dla montbeliarde i rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Jednak na szczególną uwagę zasługują niskie wartości uzyskane dla ras zachowawczych. Rasy mięsne oprócz hereforda prezentowały wartości pośrednie, przy czym Autor właśnie u tej rasy do analizy włączył najmniejszą liczbę zwierząt, co może budzić wątpliwości odnośnie reprezentatywności badanej próby. Porównując średnie liczby ROH pomiędzy rasami Doktorant wykazał różnice statystycznie istotne pomiędzy większością analizowanych populacji. Na uwagę zasługuje jednak brak różnic pomiędzy polską czerwoną i białogrzbieta oraz polską białą - czerwoną i białogrzbieta (tabele 3 i 4). Autor scharakteryzował także rozkład ilości ciągów w 3 kategoriach < 4 Mpz, 4-8 Mpz i >8 Mpz (tabele 5 i 6). Najwyższa ilość długości krótkich ROH została wykazana u rasy hereford, natomiast najniższe wartości stwierdzono u badanych ras zachowawczych.

W rozdziale *Dyskusja* dotyczącym omówienia tej części wyników Pan magister Tomasz Szmatoła słusznie zauważył podobieństwo uzyskanych rezultatów do wyników innych autorów, przy czym potwierdził bardzo interesującą przewagę rasy hereford w średniej długości ROH, obliczonej dla wszystkich kategorii długości > 1 Mpz. Wysokie wartości średnich długości i liczby ROH u ras wysoko produkcyjnych związane są, jak Autor słusznie zauważa, z kierunkową selekcją i powszechnym stosowaniem inseminacji. Część pracy dotycząca charakterystyki ciągów homozygotycznych u ras rodzimych uważam za najbardziej wartościową. Po raz pierwszy spotykamy w niniejszej Dysertacji dokładną analizę ROH dla rasy białogrzbieta czy polskiej czerwonej i wykazanie różnic w porównaniu do ras produkcyjnych szczególnie w odniesieniu do sumy ciągów. Zaobserwowane u zwierząt ras rezerwy genetycznej niskiej ilości długich ciągów świadczy korzystnie niskim stopniu pokrewieństwa pomiędzy zwierzętami, co stanowi cenną informację dla hodowców tych ras.

Kolejnym rozważanym zagadnieniem podjętym przez Doktoranta była analiza współczynników inbredu F_{ROH} w 5 kategoriach długości ROH. Uzyskane wyniki korespondowały z uprzednio przeprowadzonymi analizami i wykazały najwyższe wartości dla rasy hereford a najniższe dla ras zachowawczych (tabela 9). W rozdziale *Dyskusja* poświęconym tym zagadnieniom Doktorant w sposób bardzo interesujący omówił wartości współczynników F_{ROH} jako źródła informacji na temat stopnia inbredu w poszczególnych stadach i przytoczył analizowane przez wielu autorów korelacje pomiędzy wskaźnikami F_{ROH} i F_{PED} (współczynnik obliczony na podstawie danych rodowodowych). Jednak Autor nie porównał uzyskanych w dysertacji rezultatów z wynikami własnymi opublikowanymi w pracy Szmatoła i in. (2016, *Livestock Science*) pod zbliżonym tytułem. W wymienionej publikacji Doktorant wraz z zespołem badawczym scharakteryzował ROH w genomach 1387 zwierząt 4 ras: holsztyńsko-fryzyjskiej, polskiej czerwonej, limousine i rasy simentalskiej. Interesujące jest porównanie niektórych wyników przedstawionych w dysertacji (tabela 2) i wymienionej publikacji np. w odniesieniu do liczby ROH/ na zwierzę w 5 kategoriach długości dla ras: polskiej czerwonej, limousine i rasy simentalskiej. W kategorii > 1 Mpz wartości te są dwukrotnie niższe, przy zbliżonych wartościach F_{ROH} , co nasuwa pytanie odnośnie przyczyny tych różnic.

W części pracy dotyczącej wykrycia regionów ROH hotspots opisana szczegółowo przez mgr Tomasza Szmatołę metoda, prowadząca do scharakteryzowania wysp ROH i wykazania haplotypów podlegających presji selekcyjnej, umożliwiła precyzyjne wykazanie częstości występowania ROH u każdej z badanych ras. Na wykresach 4 i 5 oraz w tabeli 10 Autor przedstawił regiony genomu o najwyższej częstości ROH, z uwzględnieniem poszczególnych autosomów dla każdej rasy. Jednak próba takiego nagromadzenia informacji na jednej rycinie sprawiła, że wykres 5 jest mało czytelny. Wykres 6 potwierdza obecność wspólnych genów dla ras mięsnych charolaise i limousine, aż 60. genów wspólnych dla montbeliarde i rasy simentalskiej. Natomiast zaskakująco niską liczbę wspólnych genów wykazał Autor dla obu odmian rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, do którego to interesującego wyniku nie znalazłam odniesienia w rozdziale *Dyskusja*.

Bardzo ciekawe rezultaty przedstawiono w tabeli 12, w której Doktorant wykazał obecność genów kodujących białka szlaków metabolicznych występujących w regionach ROH hotspots. Na uwagę zasługują, u wszystkich badanych ras mięsnych, geny ścieżki sygnałowej integryn i czynnika wzrostu *PDGF*. Natomiast dla ras holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej i czerwono-białej ścieżki receptora hormonu uwalniającego tyreotropinę, czy szlaku receptorów hormonów uwalniających gonadotropinę. Zamieszczone zdanie na stronie 43, że w regionach wysp ROH u wielu ras występują geny m.in. acylotransferazy (*DGATI*), miostatyny (*MSTN*) czy białka wiążącego kwasy tłuszczowe (*FABP4*) jest mało precyzyjne, gdyż nie wiadomo jakie rasy Autor miał na myśli, co więcej, nie zamieszczono tutaj odsyłacza do suplementu 1a, a w tabeli 12 nie zostały one wymienione.

Dyskusja otrzymanych wyników opisanych w tej części dysertacji także została przeprowadzona w sposób jasny i kompetentny, z uwzględnieniem najnowszej literatury w dziedzinie badań. Pan mgr Tomasz Szmatoła przytacza szereg prac, których autorzy wykazują, że rozkład i częstość ROH są charakterystyczne dla ras i populacji. A regiony wysp, kształtowane pod wpływem selekcji, obejmują *loci* genów ważnych z punktu widzenia

produkcyjności. Jednak wyniki nie są tak jednoznaczne dla analizowanych typów użytkowych. Autor wskazuje m.in. na początkową sekwencję chromosomu drugiego u rasy limousine, w obrębie której znajduje się *locus* miostatyny (decydującej o umięśnieniu), ale nie potwierdza takich zależności w odniesieniu do rasy hereford. Interesujące jest natomiast wskazanie u wszystkich badanych ras mlecznych, w regionach wysp ROH genów szlaku sygnałowego wydzielania hormonu tyreotropowego. Podobnie słusznie podkreśla identyfikację 13 genów wspólnych dla ras zachowawczych decydujących m.in. o łatwości wycieleń czy wzroście zwierząt. Autor zwraca uwagę na fakt, że u tych ras najwyższa liczba genów zidentyfikowanych w rejonach wysp ROH należała do ścieżek metabolicznych związanych z aktywacją komórek B i T czy też szlaków sygnałowych cytokin, doszukując się właśnie w tym wyższej odporności zwierząt na choroby.

Dysertację Autor zakończył formułując siedem jasno sprecyzowanych wniosków o charakterze stwierdzeń. Wynikają one z analizy uzyskanych wyników badań jednak uważam, że pierwszy wniosek jest zbyt ogólny i może zostać pominięty.

Uwagi szczegółowe

1. W rozdziale piśmiennictwo nie znalazłam dwóch pozycji wykorzystanych w tekście: Williams i wsp. (2015) wers 25, str. 17 oraz Meszaros i wsp. (2015) wers 31 str. 55.
2. W tekście pracy nazwę rasy „Simentaler” proponuję zastąpić „bydło simentalskie”.
3. Na stronie 33 wartość F_{ROH} dla rasy polskiej czerwonej zamiast 0,40 powinna wynosić 0,040.
4. Przytaczane po raz pierwszy w tekście skróty genów powinny być wyjaśniane.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w charakterystykę ciągów homozygotyczności w genomach ras produkcyjnych, przede wszystkim należy jednak podkreślić nowatorstwo uzyskanych wyników w odniesieniu do 4 krajowych ras zachowawczych. Pan mgr inż. Tomasz Szmatoła wykazał się bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, umiejętnością rozwiązywania problemów naukowych, właściwego opracowania wyników badań i ich interpretacji. Pragnę zaznaczyć i podkreślić, że oceniana rozprawa ma wysoką wartość naukową i duży potencjał aplikacyjny. Rozprawę doktorską Pana magistra inż. Tomasza Szmatoły pt. „*Charakterystyka ciągów homozygotyczności u wybranych ras bydła*” oceniam bardzo i stwierdzam, że dysertacja spełnia wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r., Nr 65 poz. 595., Dz. Ustaw z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. Ustaw z 2011 r., Nr 84, poz.455). **Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr inż. Tomasza Szmatoły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kraków, 26 lutego 2019 r.

Dr hab. Urszula Kaczor