

Oponentský posudek

Na disertační práci Ing. Lucie Lískovcové zpracovanou na téma: „Asociační analýzy genů ovlivňujících kvalitu masa skotu“

Školitel: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Doktorský studijní program: Biotechnologie

Doktorský studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Oponent: prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá hodnocením kvality masa skotu a její asociace a variabilitou markerů ve vybraných kandidátních genech. Disertační práce vznikla na pracovišti Katedry zootechnických věd ZF JU v Českých Budějovicích. Práce má rozsah 104 stran bez příloh.

Předložená disertační práce má obvyklé členění. Po úvodu a cíli, následuje přehled literatury, který je členěn do pěti podkapitol, kde jsou popsány jednotlivé hodnocené vlastnosti kvality masa a analyzované polymorfizmy genů kalpain, kalpastatin, myostatin a Myf5. Disertační práce vychází ze 115 literárních zdrojů, především zahraničních zdrojů.

Cíle disertační práce jsou formulovány jasně, pouze v cíli 1 je obsaženy vlastně dva cíle, které měly být samostatně: 1. genotypizovat a stanovit frekvence... a 2. posoudit vliv na chemické složení... Formulace „stanovení vlivu“ a „stanovení asociace“ má stejný význam (i když asociace je přesnější pojem než „vliv“) a je zbytečné zvyšovat „inflaci“ slov.

Materiál a metodika popisuje populaci testovaných býků, podmínek jejich výkrmu, zpracování jejich JUT a fyzikálně chemické analýzy kvality masa. Podrobně byly popsány molekulárně genetické metody pro izolaci DNA, genotypování markerů včetně primerů pro PCR reakci, složení reakční směsi a předpokládané výsledky štěpení restriktivními enzymy. Ve statistické analýze jsou popsány zejména modelové rovnice pro asociační analýzy. Nejsou však popsány všechny metody použitých statistických analýz (např. korelační analýzy, χ^2 test – stupně volnosti, zvolené α hladiny významnosti).

Kapitola Výsledky a diskuze je uvedena na 30 stranách a je tvořena 4 podkapitolami podle dílčích cílů s vyhodnocenými a diskutovanými výsledky. V tabulkách asociací č. 13-16 jsou uváděny hodnoty P a R^2 celého modelu. V dalších tabulkách č. 17 a dalších již tyto údaje nejsou. Stačilo tyto hodnoty popsat v textu, ale opět u všech asociačních analýz.

Hodnocení formální stránky práce: Text má kvalitní zpracování z pohledu typografického, přesto se objevily určité prohřešky vůči hladké sazbě (zbytečně roztáhlé tabulky, čímž vznikly velké mezery v textu) a našel jsem řadu typografických pochybení (zejména týkající se procent: je rozdíl mezi 30% a 30 %, např. na str. 17; nebo naopak na str. 52: ...2,5 % agarózovém gelu... místo ...2,5% agarózovém gelu...) – ty by měly být opraveny v opravném listu.

Anglické názvy genů *Calpain* a *Caplastatin* by se v česky psaném textu měly psát česky, tj. kalpain a kalpastatin, neboť tyto ekvivalenty existují.

Dotazy oponenta k předložené disertační práci a náměty do diskuse:

Proč byly vybrány právě tyto polymorfizmy? Byly popsány již před více než 10 lety a byly určité již dostatečně analyzovány. Nejsou v těchto genech popsány novější polymorfizmy?

Jaký byl důvod používat programy jako MS Excel, Statistica a SAS pro statistické hodnocení, když by stačil pouze jeden (např. SAS)? Navíc MS Excel není statistický program a nepoužívá se ve vědeckých pracích pro jakékoliv hodnocení.

V metodice u některých modelových rovnic je zahrnut efekt *otce*, v popisu je uvedeno 135+. Znamená to, že bylo použito 135 otců? Pokud ano, měl se efekt otce použít jako náhodný efekt (což v GLM proceduře SASu lze nastavit). Popř. měla být použita přímo procedura MLM pro smíšené modely.

Rovněž v některých modelech je uveden efekt *hmotnosti JOT*. Z popisu rovnice opět není jasné, zda se jedná o proměnnou nebo pevný faktor. Pokud se jedná o proměnnou, je zahrnuta do modelové rovnice jako regrese? Pokud jako pevný faktor, kolik úrovní (vyjádřené pravděpodobně v intervalech) má?

V kapitole Výsledky nejsou výsledky χ^2 testu podrobněji okomentované a u polymorfizmů v genech *MSTN* a *Myf5* zcela chybí. Co tedy výsledky o HW rovnováze vypovídají o populaci býků?

V tabulkách asociačních analýz jsou uváděny střední hodnoty ve formě průměrných nejmenších čtverců (LSM) a směrodatných odchylek. SAS však výsledky lineárních modelů popisuje pomocí LSM a *středních chybách průměru* (standard error – SE). Mělo by toto být zdůrazněno v opravném listě.

Jakou metodou byly počítány korelace? Není uvedeno v metodice. Rovněž v metodice nejsou uvedeny modelové rovnice pro výpočty interakcí mezi geny *CAPN* a *CAST*.

Jaký způsob využití studovaných genetických markerů byste pro šlechtění doporučila? Naznačujete přímé využití znalosti genotypů k selekci. Má tento způsob MAS v dnešní době genomických selekcí opodstatnění? Byl by zájem šlechtitelských firem a svazů chovatelů?

Proč tyto původní výsledky nebyly publikovány v časopisu (s impakt faktorem)? Publikaci popisující výsledky uváděné v této disertační práci jsem nenašel v seznamu publikovaných prací (což je podmínkou VŠ zákona a opatření děkana ZF JU č. 17/2010)?

Závěrečné hodnocení

Při celkovém posuzování doktorské disertační práce Ing. Lucie Lískovcové konstatuji, že cíle disertační práce byly splněny. I přes výše uvedené nedostatky a připomínky má disertační práce vysokou úroveň a výsledky jsou zajímavé. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce, definovat cíle, vybrat vhodné metody a vyhodnotit výsledky a srovnávat je s literárními zdroji.

Doporučuji disertaci k obhajobě před oborovou komisí a po jejím úspěšném obhájení doporučuji jmenované udělit akademický titul „doktor“, ve zkratce Ph.D.

V Brně dne 4. 5. 2017



prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat
Agronomická fakulta
Mendelova univerzita v Brně

Oponentský posudek na disertační práci s názvem:

Asociační analýza genů ovlivňujících kvalitu masa skotu

Autorka práce: Ing. Lucie Lískovcová

Školitel: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc., Zemědělská fakulta JU v Českých Budějovicích

Oponent: doc. Ing. Karel Mach, CSc.

Disertační práce s výše uvedeným názvem je bezesporu hodnotným vědeckým pojednáním, jež svým přístupem k zadanému tématu a výsledky řešení splňuje všechny požadavky na tyto práce kladené. Na vysoké vědecké úrovni disertační práce se m. j. v kladném slova smyslu podepsaly studijní pobyty autorky na vybraných pracovištích v ČR i zahraničí a absolvování kurzů, zaměřených na studium biologie nukleových kyselin a metody molekulární biologie, včetně uplatnění PCR.

Z poměrně rozsáhlého literárního přehledu (26 s.) je zřejmé, že autorka prostudovala velký počet literárních pramenů, zaměřených na genom skotu, současné (kandidátní geny, QTL) i klasické poznatky (senzorické vlastnosti a chemické složení hovězího masa), týkající se masné užitkovosti skotu. Důraz je pochopitelně kladen na dosavadní zjištění působení těch kandidátních genů na kvalitu hovězího masa, jejichž vliv byl předmětem řešení předložené disertační práce.

Hypotéza disertační práce jasně formuluje předpokládané ovlivnění kvalitativních ukazatelů masa (vaznost vody, křehkost, pH a barvu) genetickým založením jedince. Konkrétně se jedná o polymorfismus vybraných genů u býků českého strakatého skotu, mající spojitost se vztahem k míře osvalení a *post mortem* zrání masa. Cílem disertační práce bylo genotypizování polymorfismu (stanovení genotypových a genetických frekvencí) v genech CAPN, CAST, MSTN a MYF5, včetně analýzy jejich vlivu na vybrané ukazatele chemického složení (sušina, tuk, bílkoviny, popeloviny) a kvalitu (křehkost, vaznost, pH, barvu) hovězího masa.

Kap.: Materiál a metodika podrobně uvádí charakteristiku sledovaných zvířat a postupy řešení, jež vedly k naplnění cílů práce. Dosažené výsledky lze, podle mého názoru rozdělit do 9 relativně samostatných částí – sjednocených základním cílem práce, tím je analýza vybraných genů na složení a kvalitu hovězího masa:

- 1) Základní charakteristiky kvality masa ve sledovaném souboru býků (křehkost syrového a grilovaného masa, vaznost, pH, barva a teplota). Toto sledování mohlo být uvedeno v kap.: Výsledky a diskuze.

- 2) Genotypové a alelové frekvence všech čtyřech analyzovaných genů; vždy porovnána skutečnost s hodnotami Hardy – Weinbergovy rovnováhy na čtyřech hladinách významnosti.
- 3) Chemické složení masa u jednotlivých genotypů všech čtyř analyzovaných genů (u každého z nich se jedná o dvě alely s kodominantní dědičností).
- 4) Asociační analýza polymorfismu sledovaných genů a kvality masa (křehkost, vaznost, pH, barva – červené spektrum, žluté spektrum a světlost); vždy 1, 14 a 28 den *post mortem* – zvlášť přínosné výsledky z hlediska zpracovatele i spotřebitele.
- 5) Korelační koeficienty mezi stejnými ukazateli kvality masa v 1, 14 a 28 dní *post mortem*. Dotaz: jedná se o korelace fenotypové (r_p), genetické (r_g), případně prostředňové (r_E)?
- 6) Korelační koeficienty mezi jednotlivými ukazateli kvality masa v 1, 14 a 28 dní *post mortem*. Stejný dotaz (připomínka), jako u předchozího bodu. Je třeba zdůraznit, zejména pokud by se jednalo koeficienty genetické korelace, jejich přínos při selekci na jednotlivé ukazatele masné užitkovosti.
- 7) Studium interakce mezi všemi čtyřmi analyzovanými geny (polymorfními typy), jatkami, plemenem a chovem na jedné straně a délkou zrání na straně druhé. Jedná se o přínosné výsledky ve směru propojení poznatků molekulární genetiky a klasického posuzování vybraných vlivů na masnou užitkovost – konkrétně na jeden z ukazatelů kvality masa.
- 8) Vliv interakce mezi genotypy v genu CAPN X CAST na jednotlivé ukazatele kvality masa.
- 9) Vliv interakce mezi genotypy CAST, CAPN a délkou zrání na jednotlivé ukazatele kvality masa. Dotaz: vliv interakce (tento a dva předchozí body) je posuzován na základě výpočtu koeficientu korelace?

Všechny vyjmenované cíle práce byly splněny. Práce prohloubila dosavadní poznatky o působení konkrétních kandidátních genů na kvantitativní vlastnosti hovězího masa. V této souvislosti je třeba mít na zřeteli, že ukazatele kvality masa (křehkost, pH, vaznost vody i barva) jsou z genetického hlediska, podobně jako složení masa, typickými kvantitativními vlastnostmi.

V kap. 6: Výsledky a diskuze a kap. 7: Závěr jsou jasně formulovány dosažené výsledky. Autorka získala značný počet údajů, jež dokázala vhodným způsobem, za použití sofistikovaných statistických metod, zpracovat a následně interpretovat; např. se jedná o významnou asociaci jednotlivých alel genu CAPN a CAST s obsahem sušiny a popelovin v mase. Podobně je tomu u všech čtyřech analyzovaných genů – jejich vliv na barvu masa. Za zvlášť cenné lze považovat výsledky interakcí – podrobněji výše uvedeno pod body 7, 8 a 9.

Připomínky a dotazy

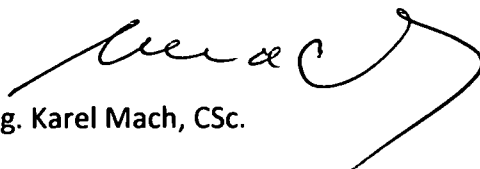
- 1) Prosím o stručné vyjádření k výše uvedeným dotazům pod body 5. – 9.
- 2) V části „Souhrn“ (3. řádek) autorka uvádí; cituji: „Byl analyzován vliv některých kandidátních genů na kvalitu masa.....“. Nelze tyto analyzované geny, v souladu s dosaženými poznatky, s přihlédnutím k dalším poznatkům uvedených v literárním přehledu, označit za QTL?
- 3) V disertační práci bylo hodnoceno chemické složení a ukazatele kvality masa ve vztahu ke genotypu na lokusech CAPN, CAST, MSTN a MYF5 a ne na lokusech calpain, calpastain, myostatin; (s. 83 v kap.: Závěr).
- 4) Závěr práce (s. 86) je značně obecný. Domnívám se, že vliv některých genotypů v analyzovaných lokusech, byl již prokázán. Je možno tuto asociaci, (tento průkazně prokázaný vztah?) využít ve šlechtění zaměřeného na kvalitativní ukazatele masné užitkovosti skotu? Který z výsledků disertační práce by měl být rozvíjen další výzkumnou činností?
- 5) Který z poznatků molekulární genetiky – selekce pomocí markerů (MAS), kandidátních genů, QTL, případně SNP má, podle názoru autorky, perspektivu ve šlechtění hospodářských zvířat, konkrétně skotu a jeho masné užitkovosti? Dojde v budoucnosti k výraznému poklesu využívání dosavadních šlechtitelských postupů, vycházejících z aplikace poznatků populační genetiky?

Závěr

Disertační práce paní Ing. Lucie Lískovcové, s výše uvedeným názvem, odpovídá požadavkům, kladeným na pojednání tohoto typu. Autorka prokázala mimořádnou schopnost samostatné vědecké práce.

Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu doporučuji, aby byl paní Ing. Lucii Lískovcové udělen akademický titul „DOKTOR“ (ve zkratce Ph.D.).

Doc. Ing. Karel Mach, CSc.



V Praze 12. dubna 2017

Oponentský posudek

disertační práce Ing. Lucie Lískovcové na téma
„Asociační analýza genů ovlivňujících kvalitu masa skotu“

Oponent: doc. Ing. Jarmila Voříšková, Ph.D.
ZF JU v Českých Budějovicích

Se zvyšujícími požadavky spotřebitelů na kvalitu potravin, je a bude otázka šlechtění, a to nejen u nás, stále aktuální. Problematika v předkládané práci, která je řešena na populaci českého strakatého skotu, jako významného producenta kvalitního hovězího masa, bude mít v procesu šlechtění svůj význam a přínos, neboť objasnění vztahů genetického založení jedince může výrazným způsobem přispět ke zlepšení kvalitativních ukazatelů hovězího masa.

Stanovené cíle disertační práce v návaznosti na hypotézy práce byly srozumitelně a přesně definované.

Kapitola Přehled literatury je zpracována odpovědně, obsahuje 115 citací převážně zahraničních autorů (82) a zahrnuje nejen základní přehled o masné užitkovosti českého strakatého skotu, ale také shrnuje doposud známé informace o genech calpain (CAPN) a calpastatin (CAST) a jejich vztazích k ukazatelům kvality masa zejména jeho křehkosti, jakožto významného faktoru z hlediska spotřebitele. Dále se autorka pokusila v této části práce shrnout dostupné informace o vztazích kandidátních genů myostatinu (MSTN) a MYF5 ke kvalitativním ukazatelům hovězího masa.

Kapitola Materiál a metodika je zpracována podrobně a chronologicky popisuje podmínky výkrmu býků, odběry vzorků masa, stanovení jednotlivých kvalitativních ukazatelů masa (křehkost, barva, pH, vaznost), použité metody, izolaci DNA a metodiky polymorfismů. Pro přehlednost by autorka při obhajobě mohla uvést, jak ona sama se podílela na této činnosti. Autorce se podařilo shromáždit a zajistit genotypizaci metodou polymerázové řetězové reakce a polymorfismu délky restrikčních fragmentů u 381 ks zvířat pro vybrané lokusy. Použité statistické metody pro zpracování získaných údajů byly vhodně zvolené včetně lineárních modelů pro posouzení jednotlivých vlivů.

Zjištění, ke kterým autorka dospěla, jsou popsány v kapitole Výsledky a diskuze. V této kapitole popisuje dosáhnuté výsledky, které podle možností konfrontuje s dostupnými autory. Tabulky, které v práci předkládá, jsou zpracovány přehledně a výstižně.

Přínosné jsou závěry porovnání genotypové a alelické frekvence jednotlivých genů u testovaného souboru, že kromě lokusu pro myostatin nebyly ostatní zvolené tři lokusy pro CAPN, CAST a MYF5 v genetické rovnováze.

Z dizertační práce vyvozuje autorka správné a odborné závěry s popisem zjištěné situace. Za významné považují jednak poznatky o potvrzení vlivu polymorfismů v lokusu CAPN a CAST na obsah sušiny a popela v mase. Dále také poznatky o rozdílech mezi genotypy v lokusu CAPN ve vztahu ke křehkosti masa jak u syrového, tak i tepelně upraveného masa s ohledem na průběh zrání.

Po formální a obsahové stránce se autorka nedopustila v práci výrazných nedostatků, což svědčí o pečlivém přístupu, které vyplývají i z jejích dosavadních publikací.

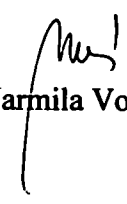
K práci mám několik poznámek a dotazů:

- v textu citování autoři nejsou uvedeni v Seznamu literatury a to Weller et al. (2010), Kučera (2006), Schenkel et al. (2007)
- v kapitole Materiál a metodika je uveden rozsah získání podkladových dat za roky 2009 až 2013 (s. 41) a následně pak 2007 až 2013 (s. 43)
- autorka by mohla uvést svůj názor na to, proč se ve světě autoři nevěnují problematice lokusů calpastatinu, myostatinu a MYF5 u populací skotu ve vztahu k chemickému složení masa (s. 61)
- jaký význam a vztah k ostatním ukazatelům hrála teplota, která nebyla v práci u žádných vztahů komentována (s. 64, 67, 70 a 72)
- U řady hodnocení uvádíte, že nejsou dostupní autoři, kteří se zabývali obdobným tématem. Proč si myslíte, jaký je váš názor, že je malá pozornost ve výzkumu zaměřena na tuto problematiku (otázka finančního zatížení, dostupnosti, nebo?)
- Které další markry je podle Vás možné využít při šlechtění skotu na masnou užitkovost?
- Na základě získaných obsáhlých poznatků za dobu studia by autorka mohla naznačit jakým procentem (v jednotkách, desítkách) by se genotypizace mohla promítnout na zlepšení výsledků masné užitkovosti (kvality masa) u populace českého strakatého skotu.

Uvedené výsledky v disertační práci poukazují na nutnost šetrného zacházení se zvířaty před porážkou, kdy lze kvalitu masa výrazně ovlivnit a dále ji pak zlepšovat i následnou délkou zrání. Nejsou však prokázány jednoznačné výsledky sledovaných markerů calpainu, calpastatinu, myostatinu a MYF5, protože vlivů na kvalitu masa existuje mnoho a genotyp je pouze jedním z nich. Přesto je spis svým odborným obsahem a úrovní zpracování dalším přínosem v oblasti mapování faktorů působících na masnou užitkovost skotu.

Zpracování disertační práce bylo náročné od sběru podkladových dat, řadu analýz až po statistické zpracování. Autorka tak prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Připomínky převážně formálního charakteru nesnižují úroveň předkládané práce. Doporučuji proto, aby po úspěšné obhajobě disertační práce před komisí byl Ing. Lucii Lískovcové udělen akademický titul „doktor“ Ph.D.

V Českých Budějovicích, 9.5.2017


doc. Ing. Jarmila Voříšková, Ph.D.