

Prof. dr hab. Jan Udała  
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt  
i Higieny Środowiska  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny  
w Szczecinie

### Recenzja

**pracy doktorskiej mgr inż. Doroty Marii Hering pt. „Identyfikacja markerów genetycznych i polimorfizmu genów związanych z koncentracją i ruchliwością plemników u buhajów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej” wykonanej w Katedrze Genetyki Zwierząt Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Kamińskiego i dr inż. Marka Lecwicza, jako promotora pomocniczego**

Osiągnięty postęp w hodowli bydła był możliwy dzięki wdrożonym programom hodowlanym, opartych między innymi na wykorzystaniu inseminacji krów konserwowanym nasieniem najlepszych buhajów. Sprzyjał temu zapewne fakt dużej podatności nasienia samców tego gatunku zwierząt, w porównaniu z samcami innych gatunków, na proces konserwacji w niskich temperaturach.

Właściwa ocena i selekcja pobranych ejakulatów ma w praktyce inseminacyjnej duże znaczenie, a prognozowanie zdolności zapładniającej plemników jest ciągle aktualnym problemem. Opracowane w ostatnich latach nowoczesne metody z zakresu biologii molekularnej pozwalają na dość dokładną analizę stanu funkcjonalnego i strukturalnego gamet, nie rozwiązują jednak wszystkich problemów w tym względzie, zwłaszcza w odniesieniu do plemników, które można byłoby określić jako „suboptymalne”, klasyfikowane w ocenie jako prawidłowe, a charakteryzujące się gorszymi właściwościami zapładniającymi. W tym kontekście istotne znaczenie może mieć bliższe poznanie genetycznego uwarunkowania cech nasienia. Oszacowanie współczynników odziedziczalności dla podstawowych cech branych pod uwagę przy określaniu jakości nasienia i podjęcie prób selekcji w tym kierunku nie przyniosło spodziewanych rezultatów. Trudno też o jednoznaczną interpretację znaczenia dotychczasowych prac nad wykorzystaniem markerów genetycznych. Pomimo przeanalizowania wielu genów, dla stosunkowo nielicznych polimorfizmów stwierdzono istotne związki z cechami nasienia. Dlatego za obiecujące należy uznać badania nad wykorzystaniem tzw. mikromacierzy SNP (chipów DNA) pozwalających na genotypowanie osobników jednocześnie w tysiącach miejsc

polimorficznych danego genomu, a następnie wykorzystanie techniki genomowej analizy asocjacji (GWAS) do określenia ich związków z daną cechą. W nurt tych badań z powodzeniem włączył się Zespół Katedry Genetyki Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, realizujący we współpracy z SHiUZ w Bydgoszczy pod kierunkiem Pana Profesora Stanisława Kamińskiego nowatorski projekt w naszym kraju dotyczący selekcji genomowej buhajów.

Dostęp do materiału badawczego w ramach powyższej współpracy umożliwił Autorce niniejszej pracy przeprowadzenie interesujących badań o dużym znaczeniu poznawczym i praktycznym, których efekty zamieściła w przedłożonej rozprawie. Dysertacja ta została opracowana na podstawie trzech oryginalnych prac twórczych spójnych tematycznie opublikowanych w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu: *Animal Reproduction Science* (2014, IF = 1,511), *Reproduction in Domestic Animals* (2014, IF = 1,515) i *Polish Journal of Veterinary Science* (2016, IF = 0,719). Czasopisma te w wykazie czasopism naukowy MNiSW w danym roku wydania posiadają odpowiednio 30, 25 i 20 pkt. Z zamieszczonych danych w bazie Web of Science wynika, że liczba cytowań dla dwóch pierwszych prac wydanych w 2014 roku wynosi 23, co wskazuje na duże zainteresowanie badaczy i aktualność podjętej problematyki badawczej. We wszystkich trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Swoją udział w ujęciu wskaźnikowym szacuje kolejno na 50%, 50% i 70%. Wskazuje to na Jej duże zaangażowanie w cały proces powstania i wydania publikacji. Udział ten polegał na wyborze osobników do badań, przeprowadzeniu znacznej części analiz laboratoryjnych, interpretacji wyników i opracowania redakcyjnego pracy. Pełnienie znaczącej roli w procesie powstawania prac świadczy o posiadanych zdolnościach organizacyjnych przez Doktorantkę i umiejętnościach współpracy z innymi Członkami Zespołu, co jest bardzo pozytywną cechą, zważywszy znaczenie wspólnie podejmowanych działań i myśli koncepcyjnej w twórczej działalności naukowej.

Przyjęta forma przygotowania dysertacji na podstawie opublikowanych już prac naukowych w uznanych czasopismach międzynarodowych, ułatwia w znacznym stopniu wykonanie zadania postawionego przed recenzentem w zakresie merytorycznej oceny pracy. Prace te bowiem uzyskały pozytywne opinie niezależnych ekspertów związanych z daną problematyką co świadczy o ich rzetelności i dużej wartości naukowej. Rola oceniającego powinna więc skupiać się bardziej na ocenie komplementarności i spójności prac, ich znaczenia dla rozwoju wiedzy w danym kierunku oraz polemice z Autorką na temat uzyskanych wyników.

Powyższe wyniki zamieszczone w trzech publikacjach Autorka zaprezentowała w pracy przygotowanej według obowiązujących wymogów dla tego typu opracowań naukowych. W pracy tej poza załączonymi publikacjami i oświadczeniami zawarła następujące rozdziały: wstęp, hipoteza badawcza i cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski. Na końcu pracy zamieszczono wykaz piśmiennictwa oraz streszczenia w języku polskim i angielskim, a na jej początku wykaz stosowanych skrótów.

We wstępie, będącym zarazem przeglądem literatury, Autorka na samym początku zaznacza, że poprawa płodności jest jednym z największych wyzwań hodowli bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, a źródłem obniżonej płodności mogą być niekorzystne zmiany cech jakości nasienia buhajów. Stwierdza, iż standardowe procedury oceny jakości nasienia nie eliminują buhajów z obniżoną płodnością, od których pobrane nasienie klasyfikowane jest jako normalne. Stąd też stwarza to potrzebę podjęcia badań nad genetycznym uwarunkowaniem cech jakości nasienia, a następnie na ich podstawie brakacji buhajów z obniżoną płodnością. Tym samym wskazuje na celowość podjęcia niniejszych badań.

W dalszej części pracy Doktorantka dokonuje ogólnej charakterystyki nasienia buhajów i przedstawia uwarunkowania zróżnicowanej koncentracji i ruchliwości plemników, a więc dwóch głównych wskaźników analizowanych w swoich badaniach. Po krótkiej charakterystyce najważniejszych czynników środowiskowych wpływających na właściwości nasienia, więcej uwagi poświęca czynnikom genetycznym. Cytując aktualne prace, autorów z kraju i zagranicy, przedstawia genezę i kierunki badań zmierzających do bliższego poznania genetycznego uwarunkowania cech nasienia. Odnosząc się do dwóch analizowanych przez siebie cech, tzn. koncentracji i ruchliwości plemników zaznacza, że określono dla nich współczynniki odziedziczalności oraz przeanalizowano szereg genów. Nieliczne jednak tylko polimorfizmy wykazywały istotne związki z tymi cechami nasienia. Zsekwencjonowanie dopiero genomu bydła rozpoczęło Jej zdaniem nowy etap w poszukiwaniach genetycznego podłoża wielu cech istotnych w hodowli zwierząt. Dostępne w tej mierze metody, najpierw ograniczały się do cech produkcyjnych, później zaczęły być również przydatne w doskonaleniu cech płodności. W dalszej części rozdziału Doktorantka przytacza badania autorów z kraju i zagranicy wskazujące na duże możliwości wykorzystania mikromacierzy SNP i analizy GWAS w celu ustalenia powiązań między markerami genetycznymi a cechami nasienia czy też eliminacji zaburzeń płodności.

*Przedstawiony rozdział, w krótkiej ale treściwej i przystępnej formie jest dobrze wykonanym przeglądem literatury, zwłaszcza w odniesieniu do genetycznego uwarunkowania cech nasienia. Autorka wykorzystwała aktualne materiały źródłowe, odpowiednio je*

*zinterpretowała, dostarczając najnowszych informacji dotyczących podjętego tematu. Świadczy to o znajomości przez Nią problematyki badawczej i posiadanych umiejętnościach analizy, interpretacji wyników badań i wyciągania na ich podstawie wniosków.*

W następnym rozdziale Doktorantka przedstawia założoną hipotezę i cel pracy jaki zamierzała osiągnąć wykonując badania, których wyniki zamieściła w trzech oryginalnych publikacjach.

Przyjęta hipoteza jest poprawnie sformułowana w kontekście dokonanego przeglądu wyników prac innych autorów, jak również doświadczeń własnych i posiadanych możliwości wykonania badań. Poprawnie wyznaczono także cele pracy.

W materiale i metodach, Autorka dokonała zbiorczego opisu metod, szczegółowo zaprezentowanych w każdej pracy. Przyjęcie takiej formy jest dobrym rozwiązaniem, pozwalającym lepiej zapoznać się z tokiem postępowania metodycznego na poszczególnych etapach prac badawczych zmierzających do osiągnięcia danego celu. Jak zaznaczyłem wcześniej, od strony merytorycznej, w tym doboru materiału i metod badawczych, praca była poddana już ocenie. Należy jednak podkreślić trafność doboru tych metod i wskazać na posiadane możliwości wykonania specjalistycznych badań, jak również możliwość skorzystania z wyników jakie zostały uzyskane na potrzeby selekcji genomowej w ramach współpracy z SHiUZ w Bydgoszczy. Należy także podkreślić, że bez tej współpracy wykonanie powyższej pracy byłoby raczej niemożliwe. Jest to wzorcowy przykład współpracy między nauką i praktyką. Na bazie dociekań naukowych Zespół realizujący badania uzyskał wyniki, które mogą być wykorzystane w praktyce hodowlanej.

Powyższe wyniki Autorka przedstawiła w kolejnym rozdziale „Wyniki”.

Wyniki te potwierdzają zarazem osiągnięcie w pełni celów badawczych, jakie w pracy założono, gdyż:

1. Wskazano 34 markery SNP związane ze zróżnicowaniem ruchliwości plemników, spośród których 18 zlokalizowanych było w obrębie genów funkcjonalnych. Podobnie w przypadku koncentracji plemników, wskazano 13 markerów SNP związanych z tą cechą, a 7 zlokalizowanych było w obrębie genów funkcjonalnych.
2. Opracowano test PCR dla genu kandydującego SOX5, co pozwoliło na zidentyfikowanie jednonukleotydowego polimorfizmu powodującego mutację zmiany sensu. W wyniku zastosowania metody PCR-RFLP oznaczono trzy genotypy: CC, CT i TT.
3. Wykazano statystycznie istotne związki pomiędzy powyższym polimorfizmem genu SOX5 a ruchliwością i koncentracją plemników.

Otrzymane wyniki Autorka omawia w następnym rozdziale, porównuje je z pracami innych badaczy, przedstawia własne spostrzeżenia i poglądy w wielu kwestiach. Na samym początku uzasadnia wybór buhajów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej jako modelu do badań, podając trzy powody. W jednym z nich stwierdza, że u buhajów tych występuje znaczne zróżnicowanie parametrów nasienia, co jest między innymi powodem występowania obniżonej płodności. Zaznacza, że poznanie genów zaangażowanych w kształtowanie cech nasienia może być pomocne w ograniczeniu tego zjawiska, poprzez eliminację buhajów – nosicieli niekorzystnych alleli. Na kanwie takiego stwierdzenia nasuwa się pytanie, o ewentualne skutki takiego postępowania i jego znaczenia dla hodowli w kontekście stosowanej selekcji genomowej. Jakie jest zdanie Autorki w tym względzie?

Prowadząc rozważania o analizach GWAS Doktorantka podkreśla, że pozwoliły one zidentyfikować markery typu SNP istotnie związane z dwoma najważniejszymi cechami nasienia świeżego, tj. koncentracją i ruchliwością plemników zaznaczając, że są ważne z punktu widzenia zakładów produkcji nasienia, gdyż określają zarówno wydajność produkcji nasienia do celów inseminacji jak i jego jakość. Szkoda, że nie rozwinięto tego zagadnienia i nie wspomniano również o objętości ejakulatu, która to cecha razem z dwiema wymienionymi decyduje o wielkości produkcji nasienia, określanej liczbą dawek inseminacyjnych otrzymanych z ejakulatu. Genetyczne podłoże objętości ejakulatu było przedmiotem badań Zespołu, a Doktorantka jest pierwszym autorem pracy opublikowanej na ten temat. Przedstawiono w niej również interesujące wyniki, zidentyfikowano markery związane z powyższą cechą, co wskazuje na możliwość wykorzystania badań w selekcji buhajów i doskonalenia ich płodności. Dlatego też wydaje się, że przedstawienie tych wyników, na tle zaprezentowanych w niniejszej pracy, było by dobrym ich uzupełnieniem i bardziej podkreśliłoby niewątpliwe osiągnięcia Zespołu, stosującego nowatorskie metody w ustaleniu genetycznego podłoża cech nasienia oraz podejmującego próby wykorzystania wyników w praktyce. Za interesujące należy uznać podjęte przez pracowników Katedry Genetyki Zwierząt oraz Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM badania nad genetyczną determinacją niektórych cech nasienia kriokonserwowanego. Wykonane badania, w których uwzględniane są nowe metody oceny z zakresu biologii molekularnej, powinny pozwolić na bliższe poznanie genetycznego podłoża cech tego nasienia, co może mieć duże znaczenie dla praktyki inseminacyjnej. Trafnym więc wydają się sugestie Doktorantki, zawarte w ostatnim zdaniu, dotyczące wartości aplikacyjnej realizowanych badań na nasieniu kriokonserwowanym.

*Opracowanie omawianego rozdziału dyskusja świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu przez Doktorantkę. W rozdziale tym poprawnie zinterpretowała uzyskane wyniki na tle osiągnięć innych badaczy, wskazując zarazem dalsze kierunki badań jakie zamierza z Zespołem podjąć oraz co należałoby zrobić aby dany problem wyjaśnić. Świadczy to o rozeznaniu w aktualnych trendach badawczych, dostrzeganiu znaczenia realizowanych prac dla praktyki oraz chęci rozwijania swoich zainteresowań naukowych.*

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka wyciągnęła 6 wniosków. Jak zaznaczono wcześniej przy omawianiu rozdziału wyniki, otrzymane rezultaty pozwoliły Jej na osiągnięcie postawionych celów, a sformułowane wnioski to odzwierciedlają. Ważnym w kontekście doskonalenia cech wyrażających sprawność reprodukcyjną samca, wydaje się wniosek 5-ty, w którym wskazano, iż dzięki znajomości uwarunkowań genetycznych cech nasienia, występuje możliwość ich uwzględniania w preselekcji buhajów dokonywanej w ramach programów selekcji genomowej. Może to mieć znaczenie dla doskonalenia cech związanych z rozrodem, którym w programach hodowlanych nadaje się coraz większą wagę.

W toku realizacji pracy, Autorka uzyskała wiele danych o charakterze poznawczym oraz aplikacyjnym, mogących być wykorzystanych w doskonaleniu cech rozrodczych buhajów. Na podkreślenie zasługuje:

1. Wskazanie markerów warunkujących różnicowanie ruchliwości i koncentracji plemników.
2. Wskazanie na 11 genów potencjalnie związanych z ruchliwością plemników i 2 genów bezpośrednio związanych z ich koncentracją oraz wiele innych związanych pośrednio z tymi cechami.
3. Zasugerowanie poligenowego uwarunkowania badanych cech związanych z produkcją nasienia.
4. Przeprowadzenie mapowania genów kandydujących metodą genomowej analizy asocjacji (GWAS), wskazanie na zalety tej metody oraz zasad postępowania przy wyborze genu kandydującego.

Praca, stanowiąca podsumowanie wyników zamieszczonych w trzech oryginalnych pracach twórczych, napisana jest poprawnym językiem pod względem stylistycznym i gramatycznym. Autorka w przystępnej i zrozumiałej formie zaprezentowała najważniejsze wyniki, opisując tok postępowania i metody jakimi je osiągnęła. Poddała je następnie rzetelnej dyskusji, wskazując zarazem na potrzebę kontynuacji prac w wybranych kierunkach. Powyższe, jak również posiadany już znaczący dorobek naukowy wyrażony wskaźnikami

bibliometrycznymi, wskazuje na posiadane doświadczenie, umiejętności i kompetencje naukowe w zakresie obranej problematyki badawczej przez Doktorantkę.

W maszynopisie na str. 14 (wiersz 25) w zdaniu: Badaniami objęto takie cechy jak poziom hormonów ... wśród LH i IGF1 jest „IN”. Co to oznacza?

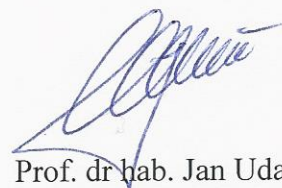
#### Wniosek końcowy

*Przygotowana rozprawa doktorska ma zarówno znaczenie poznawcze jak aplikacyjne. Na podkreślenie zasługuje dobre przygotowanie pracy od strony metodycznej. Wykorzystane metody badawcze, które pozwoliły Doktorantce uzyskać interesujące wyniki, a na ich podstawie przygotować trzy oryginalne prace twórcze, zebrała i w przystępny sposób objaśniła w maszynopisie. Wyniki te przedstawiła na tle osiągnięć innych badaczy, wskazując dalsze możliwości realizacji badań w obranym kierunku. Świadczy to o dobrym rozeznaniu w aktualnych trendach badawczych, posiadanej wiedzy i kompetencjach naukowych. Autorka w pełni wykonała postawione zadania, osiągnęła postawione cele i potwierdziła przyjętą hipotezę. Praca niewątpliwie wnosi nowe wartości i przyczynia się do rozwoju badań w uprawianej dyscyplinie*

*Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Doroty Marii Hering pt. „Identyfikacja markerów genetycznych i polimorfizmu genów związanych z koncentracją i ruchliwością plemników u buhajów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej” odpowiada wymogom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn.zm., t.j. Dz.U. z 2014 r. poz. 1852).*

*Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Doroty Marii Hering do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

Szczecin, 28 grudnia 2016 roku



Prof. dr hab. Jan Udała