

Warszawa, 16.01.2017 r.

Dr hab. Joanna Gruszczyńska
Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt
Wydział Nauk o Zwierzętach
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RECENZJA

rozprawy 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"

Niniejszą recenzję pracy doktorskiej sporządziłam na zlecenie Rady Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie zgodnie z uchwałą z dnia 18 listopada 2016 roku (WBZ-DZ.6350.5.2014/2016) na podstawie otrzymanego egzemplarza pracy doktorskiej, stanowiącego zbiór 3 publikacji. Praca doktorska została wykonana w Katedrze Genetyki Zwierząt, na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Kamińskiego (promotor) i dr inż. Marka Lecewicza (promotor pomocniczy).

1. Formalna ocena pracy

Przedłożona mi do oceny praca doktorska spełnia wymagania postawione pracom naukowym w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika. Niniejsza praca zajmuje łącznie 43 strony wydruku komputerowego, w tym zawiera jedną tabelę. Autorka treść pracy przedstawiła w 6 rozdziałach (z podrozdziałami), a mianowicie: "Wstęp", "Hipoteza badawcza i cele pracy", "Materiał i metody", "Wyniki", "Dyskusja", "Wnioski". Wykaz stosowanych skrótów poprzedza ogólny wstęp. Spis literatury obejmuje 85 pozycji, w tym: ogromną większość stanowią prace naukowe w czasopismach zagranicznych, a tylko 2 pozycje w czasopismach polskich. Kolejność poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów jest właściwa, co świadczy o przemyślanej koncepcji pracy doktorskiej. Poszczególne rozdziały i podrozdziały stanowią zwarty materiał informacyjno-wynikowy, osadzony w piśmiennictwie naukowym związanym z realizowanym tematem pracy doktorskiej. Dysertacja zakończona jest streszczeniem w języku polskim (1,5 strony), streszczeniem w języku angielskim (1,5 strony), kopiami 3 opublikowanych artykułów naukowych (łącznie stron 19) oraz oświadczeniami współautorów artykułów (prof. dr hab. Stanisława Kamińskiego oraz dr inż. Kamila Oleńskiego), w których Współautorzy zadeklarowali swój szczegółowy udział w badaniach naukowych i przygotowaniu publikacji składających się na rozprawę doktorską mgr inż. Doroty M. Hering. Na uwagę zasługuje fakt, iż we wszystkich trzech publikacjach

Pani mgr inż. D.M. Hering jest pierwszym autorem, wskazuje to na znaczący (w dwóch publikacjach 50%, w jednej 70%) udział doktorantki w planowaniu i realizacji przedstawionych badań naukowych, analizach laboratoryjnych, analizie danych, opracowaniu redakcyjnym manuskryptów prac naukowych. Udział pozostałych Autorów dotyczył: określenia ogólnych założeń doświadczenia, organizacji dostępu do bazy oceny buhajów i bazy genotypów SNP, pomocy przy interpretacji wyników i opracowaniu redakcyjnym prac, uczestnictwie w procesie genotypowania buhajów i przeprowadzaniu analizy GWAS. Wszystkie trzy artykuły naukowe, które są podstawą recenzowanej rozprawy doktorskiej, zostały opublikowane w 2014 i 2016 roku w prestiżowych czasopismach z listy filadelfijskiej, charakteryzujących się wysokim Impact Factor. Są to następujące artykuły:

1. Hering D.M., Oleński K., Kamiński S. 2014. *Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein- Friesian bulls*. *Animal Reproduction Science* 146 (3-4):89-97. (IF=1,511, pkt MNiSW=30)
2. Hering D.M., Oleński K., Kamiński S. 2014. *Genome -wide association study for sperm concentration in Holstein- Friesian bulls*. *Reproduction in Domestic Animals* 49 (6):1008-1014. (IF=1,515. pt MNiSW=25)
3. Hering D. M., Kamiński S. 2016. *Association between mutation in SOX5 gene and semen quality in Holstein- Friesian bulls*. *Polish Journal of Veterinary Science* 19 (3): 651-653. (IF=0,604, pkt MNiSW= 20)

2. Ocena merytoryczna pracy

Cykl artykułów mgr inż. D.M. Hering składających się na Jej rozprawę doktorską dotyczy bardzo ważnego zagadnieniem współczesnej zootechniki, jakim jest poszukiwanie podłoża genetycznego jakości nasienia buhajów. Informacja o markerach genetycznych przedstawiona w niniejszej dysertacji umożliwi w przyszłości uwzględnienie odpowiednich markerów w preselekcji buhajów, dokonywanej w ramach programów selekcji genomowej i brakowanie buhajów charakteryzujących się genetycznie uwarunkowaną obniżoną płodnością.

W dosyć obszernym wstępie dysertacji Autorka dokonała ogólnej charakterystyki nasienia buhajów, omówiła czynniki środowiskowe i genetyczne warunkujące zróżnicowanie koncentracji i ruchliwości plemników.

Pani mgr inż. Dorota Maria Hering na podstawie dotychczasowej wiedzy postawiła hipotezę badawczą zakładającą, że skanowanie genomu przy pomocy mikromacierzy pozwoli

wytypować istotne markery genetyczne typu SNP i geny kandydujące warunkujące zróżnicowanie koncentracji i ruchliwości plemników w nasieniu buhaja.

Cele podjętych badań zostały jasno postawione:

1. Wskazanie markerów typu SNP związanych ze zróżnicowaniem ruchliwości i koncentracji plemników buhajów a także genów kandydujących zlokalizowanych w sąsiedztwie tych markerów.
2. Opracowanie testu PCR pozwalającego na określenie polimorfizmu w obrębie genu kandydującego dla ruchliwości plemników.
3. Ocena wpływu polimorfizmu wybranego genu kandydującego na ruchliwość i koncentrację plemników w nasieniu świeżym.

Przedstawiona do oceny dysertacja jest wynikiem kilkuletnich badań prowadzonych przez mgr inż. Dorotę Hering z Zespołu Pana Profesora Stanisława Kamińskiego we współpracy ze SHiUZ Sp. z o. o. w Bydgoszczy. Badaniami objęto 1581 buhajów, jednakże w końcowej analizie uwzględniono informacje o 368 buhajach.

Oceniając pracę należy podkreślić, że metody zastosowane w badaniach zostały bardzo wnikliwie przemyślane i właściwie dobrane, dzięki czemu umożliwiły przeprowadzenie interesujących i nowatorskich badań. Autorka wraz z innymi współpracownikami zgenotypowała buhaje z wykorzystaniem mikromacierzy SNP (Bovine 50K Bead Array - firmy Illumina), przeprowadziła analizę jakości tzw. klastrów SNP (w celu usunięcia markerów dających niejednoznaczny odczyt), przeprowadzając odpowiednie analizy statystyczne i bioinformatyczne dokonała mapowania genów kandydujących metodą GWAS, a także przeprowadziła prawidłowo identyfikację polimorfizmu w obrębie genu kandydującego z wykorzystaniem metody PCR-RFLP. W analizach statystycznych mających na celu wykazanie statystycznie istotnych różnic we frekwencji genotypów i alleli w grupach buhajów o skrajnie różnych fenotypowo wartościach cech wykorzystwała następujące testy: Cohrana-Armitage oraz Correlation/Trend dostępne w pakiecie programu SVS, stosując testowanie wielokrotne (poprawka Bonferroniego oraz wskaźnik FDR) w celu zmniejszenia ryzyka popełnienia błędu I rodzaju. Weryfikując związek polimorfizmu wybranego genu kandydującego SOX5 z koncentracją i ruchliwością plemników mierzonych w nasieniu świeżym przeprowadzono z wykorzystaniem testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa dostępnego w pakiecie Statistica 10.0.

Na podstawie przeprowadzonych badań w poprawny i przejrzysty sposób Doktorantka przeprowadziła w rozdziale "Wyniki" i jego podrozdziałach oraz rozdziale "Dyskusja" badań własnych, szczegółową analizę wyników odnosząc je zarazem do literatury naukowej.

Wykonując pracę doktorską Pani mgr inż. Dorota M. Hering wykazała się dużym zrozumieniem tematyki badań. Wszystkie prace są bardzo wartościowe i przeszły pozytywnie przez recenzje w renomowanych czasopismach specjalistycznych, co więcej zostały w nich wydrukowane. Uzyskane przez Autorkę wyniki są znaczące. Dowiodła Ona, iż:

- genomowa analiza asocjacji jest efektywną metodą różnicującą podstawowe cechy nasienia buhajów,
- dystrybucja efektów markerów w poszczególnych chromosomach wskazuje na niewielki udział pojedynczych markerów SNP w kształtowaniu cech nasienia buhaja i ich poligenowe uwarunkowanie,
- poznanie istotnych markerów SNP oraz analiza bioinformatyczna umożliwiły wybór kolekcji genów potencjalnie zaangażowanych w kształtowanie koncentracji i ruchliwości plemników w nasieniu świeżym buhaja,
- na przykładzie polimorfizmu genu SOX5 wykazano, iż strategia wyboru genów kandydujących na bazie analizy GWAS wydaje się być skuteczna w poznaniu uwarunkowania genetycznego cech jakości nasienia buhaja.

Chciałam podkreślić, że niezwykle ważne jest, iż znajomość alleli istotnie wpływających na cechy nasienia otwiera możliwości ich uwzględnienia w preselekcji buhajów dokonywanej w ramach programów selekcji genomowej. Autorka ponadto stwierdza, iż uzyskane wyniki są podstawą do dalszych badań, tym razem nad uwarunkowaniem genetycznym cech nasienia rozmrożonego w celu poznania zmiennych lub nowych efektów genów kandydujących.

Wnioski generalnie odnoszą się do przeprowadzonych badań, mają charakter ogólny, trafnie odpowiadające na cel postawiony w pracy.

3. Uwagi krytyczne i dyskusyjne

Język pracy jest poprawny, jakkolwiek zauważa się drobne nieścisłości w tekście, które jednak nie umniejszają wartości naukowej niniejszej pracy. Nasuwają się także następujące uwagi:

Dotyczące treści manuskryptu:

Dotyczące rozdziałów "Wstęp" i "Cele pracy":

- na stronie 9 w ostatnim akapicie należałoby napisać o poprawę jakich parametrów i jakich cech jakościowych chodzi,
- na str. 10 w drugim akapicie brakuje określenia ras bydła - dot. powołania na prace: Brito i in., 2004 oraz Kumi-Diaka i in. 1981,

- na str. 10, 14 - rasy zwierząt gospodarskich w jęz. polskim należy pisać małą literą, w szczególnych przypadkach dużą literą, gdy nazwa rasy dotyczy nazwiska, miejscowości,
- na str. 11. podrozdział 1.2.2., str 14, 15 - geny, QTLs zlokalizowane są w chromosomach, a nie na chromosomach. Ta sama uwaga też dotyczy rozdziału "Wyniki" str. 20, 21, 22 oraz rozdziału "Dyskusja" str. 24,
- na str. 12 - pomyłka w umieszczeniu tytułu tabeli - powinien on być nad tabelą, a nie pod tabelą,
- na str. 13 pod koniec pierwszego akapitu "Polimorfizm w genie IHBA (C7639T) wykazał związek.....", a powinno być np.: "Wykazano związek między polimorfizmem....."
- na str. 14, 15 - niezręcznie używać określenia "u ludzi", jeśli dotyczy to gatunku, a poprawna nazwa gatunku to człowiek. Ta sama uwaga ta dotyczy także rozdziału 4. "Dyskusja" str. 24, 26,
- str. 16 cel 2 - gen kandydujący danej cechy, a nie dla danej cechy.

Dotyczące rozdziału 3. "Materiał i metody":

- str. 17 dotyczy podrozdziału 3.1 "Materiał" - podając średnie ruchliwości i koncentracji plemników niestety nie zamieszczono w pracy wartości odchylenia standardowego,
- w celu identyfikacji markerów genetycznych badanych cech i przeprowadzenia analizy GWAS Pani mgr Hering wyodrębniła grupy buhajów charakteryzujące się: 1. bardzo niską (n=41) i normalną (n=279) ruchliwością plemników (pytanie, co Autorka uznaje za normalną ruchliwość plemników skoro w artykule "Hering D.M., Oleński K., Kamiński S. 2014. Genome -wide association study for sperm concentration in Holstein- Friesian bulls. *Reproduction in Domestic Animals* 49 (6):1008-1014." określona jest jako grupa kontrolna) oraz 2. bardzo niską (n=126) i wysoką (n=140) koncentracją plemników.

W sumie do analizy dotyczącej ruchliwości plemników zgenotypowano 320 buhajów, a dotyczącej koncentracji plemników 266buhajów. Jaki % tych samych buhajów uwzględniono w obu analizach?

Dlaczego w artykule "Hering D.M., Oleński K., Kamiński S. 2014. Genome -wide association study for sperm concentration in Holstein- Friesian bulls. *Reproduction in Domestic Animals* 49 (6):1008-1014." Autorka podaje liczbę 305 buhajów, skoro łączna ich liczba to 320? Co się stało z 15 buhajami?

- str. 17. dotyczy podrozdziału 3.2. "Metody". Wydaje mi się, że Autorka powinna napisać, że analizę nasienia buhajów przeprowadzili pracownicy SHiUZ, gdyż stwierdzenie, że "Analiza

nasienia buhajów jest standardową procedurą przeprowadzaną w stacja inseminacyjnych" nie jest zrozumiałe i wystarczające dla czytelnika.

- str. 18 pierwszy akapit jest "...DNA genomowe wyizolowane...", a powinno być "...DNA genomowy wyizolowany...", gdyż kwas dezoksyrybonukleinowy jest rodzaju męskiego.

- str. 18 w ostatnim wierszu prawdopodobnie chodziło o "cechy nasienia a nie cechy związane z nasieniem"

- str. 19. dotyczy podrozdziału 3.2.4. - pewną niezręcznością jest stwierdzenie, że wybrano "przykładowy" gen kandydujący SOX5 (bez słowa przykładowy). W dalszej części dysertacji Autorka dobrze uzasadnia dlaczego wybrała ten gen do swoich analiz, a nie inny. Pozostałe uwagi to: powinno być "uwidocznienie w żelu agarozowym", a nie "na żelu agarozowym". Część nazwy enzymu restrykcyjnego powinna być napisana kursywą "RsaI". W opisie długości fragmentów powinien być skrót słowa pary zasad czyli "pz", zamiast "bp",

- str. 19. dotyczy podrozdziału 3.2.5 - cytowanie pakietu Statistica 10.0 jest nie pełne - powinno być uzupełnione o rok wprowadzenia na rynek,

- str. 21 dotyczy podrozdziału 4.1.2. w pierwszym akapicie nie podano wartości odchylenia standardowego. Dalej na tej samej stronie Autorka pisze, iż " GWAS umożliwia wskazanie 13 markerów SNP warunkujących zróżnicowanie koncentracji plemników." Wydaje mi się, że Autorce chodziło o "związek markerów ze zróżnicowaniem koncentracji plemników".

Dotyczące rozdziału 4. "Dyskusja"

- str. 23 ostatnie zdanie w pierwszym akapicie wymaga korekty stylistycznej

- str. 27 - pierwsze zdanie - należy uściślić, w jakim intronie genu INCENP znajduje się marker SNP. W czwartym akapicie, drugie zdanie wymaga naniesienia poprawek stylistycznych i uściślenia o jakie "związki genu" chodzi.

Uwagi dotyczące artykułu: Hering D. M., Kamiński S. 2016. *Association between mutation in SOX5 gene and semen quality in Holstein- Friesian bulls.* Polish Journal of Veterinary Science 19 (3): 651-653.

-uwaga do zdjęcia 1:

- w opisie zdjęcia powinna być wpisana poprawna nazwa standardu masy wykorzystanego w badaniach tj. ϕ X174 HaeIII

- w opisie w rozdziale "Materiał i metody" nie znalazłam informacji, czy w zastosowanej analizie produkt PCR był oczyszczony, jeśli tak, to jakim zestawem komercyjnym, jeśli nie, to dlaczego nie dokonano oczyszczenia produktu PCR z nadmiaru

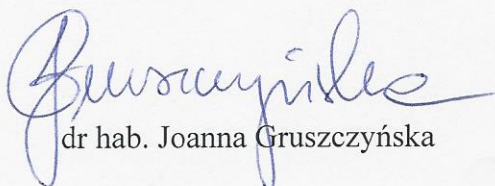
reagentów przed zastosowaniem cięcia enzymem restrykcyjnym *RsaI*. Pytam dlatego, iż na zdjęciu widoczny jest w przypadku wszystkich prób prążek poniżej 69 pz. Dlaczego nie przeprowadzono rozdzału elektroforetycznego produktu PCR? Obraz rozdzału tego produktu byłby informacją - kontrolą czystości uzyskanego produktu i być może wyjaśniłby obecność dodatkowego prążka w żelu.

Zapoznając się szczegółowo z treścią niniejszej rozprawy doktorskiej, pozbawionej uchybień, dostrzegłam tylko kilka drobnych nieścisłości, sporadyczne błędy stylistyczne, które z obowiązku recenzenta wymieniłam. Wyrażam przekonanie, iż powyższe uwagi nie umniejszają merytorycznej wartości pracy oraz jej walorom poznawczym.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Pracę doktorską pt. "Identyfikacja markerów genetycznych i polimorfizmu genów związanych z koncentracją i ruchliwością plemników u buhajów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej", autorstwa Pani mgr inż. Doroty Marii Hering oceniam wysoce pozytywnie. Stanowi ona oryginalny, znaczący, o znamionach innowacyjności dorobek naukowy. Rozprawa wnosi do literatury przedmiotu wiele istotnych, udokumentowanych informacji w zakresie m.in. możliwości wykorzystania określonych alleli w preselekcji buhajów dokonywanej w ramach programów selekcji genomowej. Stwierdzam, że Doktorantka ma dobre przygotowanie merytoryczne, w wystarczającym stopniu opanowała metody badawcze zarówno laboratoryjne jak i bioinformatyczne. Podjęta problematyka badawcza nie jest łatwa, stąd uzyskane wyniki, a zwłaszcza ich interpretacja wymaga często krytycznego spojrzenia i ostrożności we wnioskowaniu.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa naukowa spełnia wymogi stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora nauk rolniczych, dyscyplina zootechnika, określone w Ustawie 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 późniejszymi zmianami; tj. Dz. U. z 2014 r. poz. 1852). W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Doroty Marii Hering do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Joanna Gruszczyńska