

Jastrzębiec, 29.08.2023

Prof. dr hab. Emilia Bagnicka
Zakład Biotechnologii i Nutrigenomiki
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Szumiec
pt. „Identyfikacja alleli w *loci* mikrosatelitarnych DNA wytypowanych do weryfikacji
rodowodów owiec”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Anny Radko prof. IZ
oraz dr Agaty Piestrzyńskiej-Kajtoch,
w Instytucie Zootechniki - Państwowym Instytucie Badawczym
w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Szumiec dotyczy badań nad zestawem 12 markerów STR do kontroli rodowodów różnych ras owiec rekomendowanych przez *International Society for Animal Genetics* (ISAG). Badania nie ograniczają się do badań podstawowych tj. analizy stopnia polimorfizmu 12 mikrosatelitarnych *loci*, oceny bioróżnorodności genetycznej wybranych populacji określenia różnic genetycznych między badanymi rasami, ale mają też wysoce aplikacyjny charakter – ocena przydatności tego zestawu do prawidłowej kontroli pochodzenia zwierząt przynależnych do 14 polskich ras owiec, z siedemnastu objętych Programem Ochrony Zasobów Genetycznych, opracowanie metody analizy laboratoryjnej markerów oraz ustalenia drabinki allelicznej, reprezentatywnej dla populacji polskich owiec.

Weryfikacja pochodzenia jest podstawą prowadzenia prawidłowej pracy hodowlanej. Błędy w zapisach rodowodowych nie są zjawiskiem rzadkim w hodowli zwierząt gospodarskich, w tym również owiec, dlatego od dawna wykorzystywano polimorfizm białek krwi do weryfikacji zapisków zootechnicznych. Kandydatka podkreśliła, że badania nad polimorfizmem erytrocytarnym owiec zapoczątkowali polscy naukowcy, Białosuknia i Kączkowski jeszcze w latach 20-tych XX wieku w pracowni prof. Ludwika Hirszwelda, lekarza, bakteriologa, immunologa oraz twórcy nowej dziedziny nauki – seroantropologii. Przez wiele lat w Instytucie Zootechniki wykorzystywano polimorfizm antygenów erytrocytarnych oraz transferyny i hemoglobiny do kontroli pochodzenia u owiec, będących markerami klasy I. Od końca ubiegłego wieku, dzięki intensywnemu rozwojowi metod i technik genetyki molekularnej, do kontroli pochodzenia zwierząt gospodarskich stopniowo wprowadzano analizę mikrosatelitarną sekwencji DNA, zwanych markerami klasy II. Obecnie opiekę nad poprawnością kontroli pochodzenia sprawuje wspomniany już ISAG.

Jednak przydatność rekomendowanych przez ISAG markerów do stosowania w różnych populacjach i rasach musi być sprawdzona empirycznie w każdej populacji. Zatem poruszoną w pracy tematykę uznaję za w pełni zasadną z punktu widzenia prowadzenia prawidłowej pracy hodowlanej oraz uzupełnienia charakterystyki markerów mikrosatelitarnych, wykorzystywanych od kilku lat w kontroli pochodzenia owiec również w Polsce. Badania te są niezwykle istotne również w przypadku gatunków, czy ras podlegających ochronie zasobów genetycznych. Są to zazwyczaj małe populacje, w których wzrost współczynnika inbrodu jest realnym zagrożeniem, zatem i kontrola pochodzenia i ocena zmienności genetycznej w tych populacjach jest niezwykle istotna. Kandydatka w swojej pracy skupiła się właśnie na przedstawicielach ras owiec objętych Programem Ochrony Zasobów Genetycznych. Ochrona zasobów genetycznych polskich ras owiec, doskonale przystosowanych do naszych warunków jest niezwykle ważna również w świetle wprowadzanego programu „Zielonego Ładu”, w którym rasy lokalne mają szansę odegrać niebagatelną rolę.

Przedstawiony mi do oceny manuskrypt liczy 131 strony i opatrzony jest streszczeniem w języku polskim i angielskim. Po streszczeniach umieszczony został spis skrótów i oznaczeń. Część informacji i wyników zestawiono w 26 tabelach, 12 wykresach i 19 rycinach, zamieszczonych w części głównej manuskryptu oraz 4 tabelach zamieszczonych jako załączniki.

Układ pracy jest typowy dla dysertacji jaki jest stosowany w ostatnim czasie – po krótkim wstępie, w którym została zarysowana problematyka pracy, Kandydatka w sposób zwięzły scharakteryzowała wszystkie rasy owiec, których DNA stanowiło materiał do badań. Niestety, w opisie wielu z nich zabrakło podstawowej informacji o aktualnej wielkości populacji i liczbie stad. Informacja ta pomogłaby w ocenie reprezentatywności wykorzystanego materiału genetycznego. W kolejnym podrozdziale Kandydatka omówiła metody wykorzystywane do identyfikacji osobniczej i kontroli pochodzenia w przeszłości i obecnie. W podrozdziale dotyczącym markerów mikrosatelitarnych DNA Kandydatka antycypowała i wskazała jeden z celów swojej pracy. Wszystkie cele pracy, natomiast, zostały przedstawione na koniec wprowadzenia. Kandydatka założyła opracowanie metody analizy markerów satelitarnych DNA rekomendowanych przez ISAG do kontroli pochodzenia owiec przy wykorzystaniu reakcji PCR multipleks, a następnie analizę długości fragmentów DNA w sekwenatorze; analizę polimorfizmu dwunastu mikrosatelitarnych *loci* i ocenę ich przydatności do kontroli pochodzenia wybranych ras owiec; ocenę bioróżnorodności genetycznej analizowanych populacji; analizę dystansu genetycznego między badanymi rasami oraz ustalenie grabinki allelicznej dla badanych *loci*.

Uwagi do tej części pracy: brak hipotezy zerowej i alternatywnej dla celów o charakterze badań podstawowych.

W kolejnym rozdziale Kandydatka omówiła materiał doświadczalny, wskazując w ilu stadach i w jakich województwach utrzymywane był zwierzęta, a następnie omówiła metody laboratoryjne tj. metodę izolacji DNA oraz metodę identyfikacji alleli STR, w tym opracowanie drabinki allelicznej. Rozdział Materiał i metody kończy omówienie analiz

statystycznych otrzymanych wyników. Oszacowano heterozygotyczność obserwowaną i oczekiwaną, wyjaśniając, iż im bardziej otrzymane wartości zbliżają się do jedności, tym bardziej dany marker jest przydatny do analiz genetycznych. Następnie przedstawiono metodę szacowania współczynnika inbredu, indeksu stopnia polimorfizmu, siły dyskryminacji dla *locus* oraz kumulatywnego wskaźnika siły dyskryminacji dla wszystkich *loci*, prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa i łącznego prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa dla wszystkich badanych *loci*, a także dystansu genetycznego między badanymi rasami owiec. Na podstawie równania Hardy'ego-Weinberga określono stan równowagi genetycznej badanych populacji przy wykorzystaniu programu statystycznego opracowanego w IZ-PIB.

Uwagi do tej części pracy:

- brak informacji z jakiego okresu pochodziły badane próbki krwi – czy były to próbki pobrane od wszystkich zwierząt utrzymywanych w danym stadzie w tym samym czasie, czy próbki krwi kolekcjonowane w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt IZ-PIB przez dłuższy okres. Z opisu metody izolacji DNA ze świeżej krwi można domniemać, iż były to próbki na bieżąco napływające do laboratorium, z których Kandydatka izolowała DNA. Jednak możliwym jest, że Kandydatka wykorzystywała również próbki DNA wyizolowane we wcześniejszych latach.

- z czego wynikał brak próbek z dwóch województw? Czy brak jest w nich stad owiec uczestniczących w Programie Ochrony Zasobów Genetycznych?

- Kandydatka ustaliła dwie temperatury przyłączania starterów i na tej podstawie opracowała dwie reakcje PCR typu multiplex. Czy ta część pracy była poprzedzona analizami pojedynczych markerów w gradiencie temperatur w celu wskazania najlepszej temperatury przyłączania starterów?

- Kandydatka podała, że poprawność stosowanych metod genotypowania była potwierdzona w międzynarodowych testach porównawczych – w jakich latach były testowane próbki, wykorzystywanie do opracowania niniejszej dysertacji?

- brak informacji o autorze/autorach programu IMGBOVSTAT i jego dostępności.

Wyniki zostały przedstawione w kolejnym rozdziale. Zestawiono je w 18 tabelach i na 17 rysunkach, 12 wykresach oraz czterech obszernych tabelach w rozdziale 8 „Załączniki” i zostały one dokładnie omówione w tekście.

Uwagi do rozdziału „Wyniki”:

- pierwszy podrozdział tego rozdziału (4.1) jest powtórzeniem informacji metodycznych. Jedyne informacje o bialleliczności *locus AMEL* i nieprzeprowadzeniu dla tegoż *locus* wskaźników polimorfizmu można zaliczyć do wyników pracy.

- w podrozdziale 4.1.4, przedstawiając siłę dyskryminacji dla każdego markera osobno podano wynik osiągnięty dla najniższej wartości markera INRA172 dla rasy KOR, jednak nie przedstawiono najwyższej uzyskanej wartości dla INRA005 u CKP.
- pierwsze dwa zdania podrozdziału 4.1.7 pt. „Drabinka alleliczna” to również powtórzone informacje metodyczne.
- nie przy wszystkich tabelach, rycinach i wykresach zastosowano zasadę, iż muszą być one zrozumiałe dla czytelnika bez zapoznawania się z tekstem i tak, pod tabelą 1, 11 i 12 zabrakło wyjaśnień skrótów nazw ras owiec, a w samym tytule tabel 1, 12 i 14-26 oraz rycin od 3 do 19 i wszystkich wykresów zabrakło nazwy gatunku, którego dotyczy praca.

Kolejny rozdział to dyskusja składająca się z kilku podrozdziałów, poprzedzonych krótkim wstępem, w którym Pani mgr inż. Agnieszka Szumiec przypomniała znaczenie badań nad zmiennością fenotypową i genetyczną populacji zwierząt hodowlanych, a także podkreśliła znaczenie badań nad zmiennością genetyczną na poziomie molekularnym, stanowiące istotne uzupełnienie analiz klasycznej genetyki populacji. Nie zgodziłabym się tylko z twierdzeniem podanym za Ajmone-Marsan i wsp. (2014), że analiza różnorodności genetycznej z czasem zastąpiła badanie fenotypowej różnorodności ras – jakimi argumentami Kandydatka broni tego stwierdzenia?

Następnie Pani mgr inż. Agnieszka Szumiec przedyskutowała wyniki badań własnych na tle badań już opublikowanych w literaturze światowej. Wskazała na zgodności lub różnice między swoimi wynikami, a tymi, dostępnymi w publikacjach innych autorów i analizowała przyczyny różnic. Przy omawianiu każdego z badanych parametrów Kandydatka wyciągała stosowne wnioski na podstawie uzyskanych przez siebie wyników.

Uwagi do rozdziału Dyskusja:

- w tej części pracy z reguły nie przywołuje się swoich wyników podając tabele, czy rysunki, w których/na których zostały one zaprezentowane.
- Kandydatka nie ustrzegła się powtórzeń dotyczących metodyki badań i wyników własnych, np. dwa pierwsze zdania podrozdziału 5.1.2.

Pod dyskusji Kandydatka w sposób syntetyczny podsumowała swoje wyniki, a kolejny rozdział dysertacji stanowią trafnie sformułowane wnioski. Pani mgr inż. Agnieszka Szumiec stwierdziła, iż analizowany panel 12 markerów mikrosatelitarnych może być stosowany do kontroli pochodzenia, analizy struktury populacji i różnorodności genetycznej owiec, wskazując w kolejnych punktach na jakiej podstawie zostały te wnioski wyciągnięte. Podkreśliła również, że analizowane sekwencje motywu repetytywnego i liczba powtórzeń nukleotydowych w każdym z zsekwencjonowanych alleli wszystkich badanych *loci* mogą być stosowane jako dane referencyjne. Wskazała również na istnienie odrębności rasowej, zwłaszcza rasy cakiel podhalański (CKP) oraz brak ryzyka chowu wsobnego badanych ras.

Kolejny rozdział to Literatura, zawierający aż 113 pozycji, z czego większość o zasięgu światowym, opublikowanych w ostatnich latach. W spisie literatury znalazły się

również starsze publikacje, z najstarszą z 1952 roku, co wynika z zaprezentowania historii badanych ras. Świadczy to o tym, iż Kandydatka, w większości przypadków, dotarła do informacji pierwotnych, a nie opierała się na informacjach powielanych przez innych autorów, co często prowadzi do ich zniekształcenia.

Do manuskryptu dołączono dysertację w formie elektronicznej.

Drobne uwagi redakcyjne do całości pracy:

Redakcyjnych uchybień jest niewiele, np. kilka błędów interpunkcyjnych, zacytowanie pozycji literatury w spisie skrótów, nieprawidłowe tłumaczenie skrótu ddH₂O (w języku angielskim podano „distilled”, w polskim tłumaczeniu „dejonizowana”). Ponadto, wyjaśnienie znaczenia skrótu podajemy w tekście, gdy używamy go po raz pierwszy, a w dalszej części pracy wykorzystujemy już tylko skrót, natomiast skrót ISAG jest rozwinięty kilkakrotnie (str. 28 – dwukrotnie, str. 37).

Kandydatka nie uniknęła kilku błędów stylistycznych, czy niezręcznych sformułowań np. „wzrost/szczyt ilości pogłowia” (str. 12), „Gdy wystąpiła możliwość wyginięcia tej rasy...” (str. 14), czy „...rasa ta została uznana za zaginioną.” (str. 24 oraz 95/96). Zdjęcie 4, przedstawiające owcę wielkopolską, ma w linku odnośnik do owcy uhruskiej. W manuskrypcie nie ujednolicono sposobu rozwinięcia dziesiętnego ułamków (od dwóch do czterech miejsc po przecinku).

W przypadku cytowania stron internetowych konieczne jest umieszczenie daty dostępu; strony mogą być nieaktywne po pewnym czasie.

W anglojęzycznym streszczeniu użyto dwukrotnie wyrażen języka nieformalnego (skrót *shouldn't* i *don't*).

Podkreślić jednak należy, że praca jest napisana poprawnym językiem, z prawidłową składnią, a błędy, które są trudne do uniknięcia w tak obszernym opracowaniu, są naprawdę nieliczne.

Wymienione powyżej uwagi nie umniejszają wartości naukowej pracy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Szumiec pt. „Identyfikacja alleli w *loci* mikrostelitarnych DNA wytypowanych do weryfikacji rodowodów owiec” stanowi niezwykle istotny wkład w badania nad zachowaniem bioróżnorodności. Prezentowana praca wskazuje na dobre przygotowanie teoretyczne Kandydatki, umiejętność analizowania wyników i ich interpretacji oraz wnioskowania. Należy podkreślić nie tylko poznawczy, ale i aplikacyjny charakter pracy.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Agnieszki Szumiec spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789 ze zm.) oraz w związku z art. 179 ust. 2 oraz ust. 3 pkt 2b Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o

szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.) i zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Szumiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jastrzębiec, 29.08.2023



Prof. dr hab. Emilia Bagnicka