Dr hab. inż. Arkadiusz Pietruszka, prof. ZUT
Katedra Nauk o Zwierzętach Monogastrycznych
Pracownia Hodowli Trzody Chlewnej,
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie
Ul. Klemensa Janickiego 29
71-270 Szczecin

Szczecin, dnia 5 grudnia 2019 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra inż. Błażeja Nowaka
pt. „Analiza mikrosatelitarnych markerów cech reprodukcyjnych loch"
wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Wojciecha Kruszyńskiego, prof. UP
oraz promotora pomocniczego dr Magdaleny Moska
w Katedrze Genetyki Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Wykorzystanie tradycyjnych metod doskonalenia zwierząt opartych na ocenie użytkowości, selekcji i doborze do kojarzeń na przestrzeni lat przyniosło wymierne efekty szczególnie w odniesieniu do cech charakteryzujących się wysoką odziedziczalnością. W przypadku cech niskoodziedziczalnych, o ich wartości w dużej mierze decydują wpływy środowiska, dlatego też wykorzystanie tradycyjnych metod selekcji przez długi czas nie przynosiło zamierzonych efektów. Dopiero wprowadzenie metody BLUP (ang. Best Linear Unbiased Prediction) model zwierzęcia w doskonaleniu wartości hodowlanej zwierząt przyczyniło się do zwiększenia postępu. Dalszy postęp w zakresie cech użytkowych był możliwy do osiągnięcia dzięki rozwojowi zaawansowanych metod biotechnologicznych i prowadzeniu selekcji wspomaganej markerami - MAS (ang. marker - assisted selection). Za pomocą technik analizy DNA możliwe stało się lokalizowanie genów oraz markerów DNA odpowiedzialnych za ujawnianie się poziomu cech użytkowych, co może być wykorzystywane do szacowania wartości hodowlanej zwierzęcia. Pozwalają one także na identyfikację genotypu osobnika i kontrolę jego pochodzenia. Diagnostyka molekularna jest szczególnie ważna dla cech ilościowych kodowanych przez geny polimeryczne, daje bowiem możliwość wytypowania genów kandydujących do statusu genów głównych – QTL (ang. Quantitative Trait Loci).

Wyniki analiz prowadzonych na poziomie molekularnym odgrywają coraz większe znaczenie w uzyskaniu określonego postępu, dlatego też chętnie są wykorzystywane w programach hodowlanych realizowanych przez firmy hybrydowe, choć nie tylko. W Polsce

realizowany pod nadzorem Polskiego Związku Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej POLSUS program hodowlany zakłada eliminację z hodowli zwierząt czystorasowych i mieszańców obciążonych genem wrażliwości na stres $RYR1^T$. Prowadzone na tym gruncie przez lata działania doprowadziły do uwolnienia polskiej hodowli od osobników obciążonych nosicielstwem tego genu.

Mając na względzie powyższe inicjatywa badań podjętych przez Pana mgra inż. Błażeja Nowaka jest bardzo cenna, aktualna i oczekiwana nie tylko przez środowisko naukowe, ale także przez hodowców zainteresowanych wykorzystywaniem nowoczesnych narzędzi pozwalających na uzyskanie znacznego postępu hodowlanego w krótszym czasie. Dlatego uważam, że wybór tematu realizowanej rozprawy jest w pełni uzasadniony. Tym bardziej, że jak donoszą niektórzy autorzy, stosowanie selekcji MAS może wyeliminować niekorzystny efekt wywołany przez tradycyjne metody selekcji, które w pewnym stopniu, w sposób nieświadomy mogą prowadzić do zmniejszenia puli alleli występujących w populacjach, a tym samym zmniejszania zmienności genetycznej.

Oceniana praca doktorska liczy 137 stron, łącznie z tabelami, wykresami i wykazem piśmiennictwa. Układ pracy i podział treści jest typowy dla tego typu dysertacji i z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń.

Przed wstępem pracy Autor zamieścił wykaz skrótów używanych w treści kolejno przedstawianych rozdziałów. Brakuje w nim wyjaśnienia skrótu PCA. W krótkim wstępie obejmującym 4 strony tekstu Autor wychodząc od opisu tradycyjnych metod doskonalenia opartych na klasycznej selekcji przechodzi do omówienia idei prowadzenia selekcji wspomaganej markerami genetycznymi. Kontynuując swoje rozważania przedstawia możliwości jej wykorzystania u różnych gatunków zwierząt gospodarskich, w tym u świń. Skupiając się na tym gatunku pod koniec wstępu jasno formułuje główny i szczegółowe cele pracy. Za główny cel pracy Autor postawił analizę dwunastu markerów STR pod kątem ich przydatności w pracy hodowlanej prowadzącej do poprawy wybranych cech reprodukcyjnych loch. Uszczegóławiając cele pracy w kolejnych jej etapach dokonuje identyfikacji polimorfizmy wybranych sekwencji mikrosatelitarnych u loch różnych ras, oszacowania wartości najważniejszych wskaźników użytkowości rozpłodowej, analizy wpływu genotypu na wybrane wskaźniki użytkowości rozpłodowej oraz obliczenia współczynników korelacji pomiędzy cechami reprodukcyjnymi. Dużą część swoje pracy (rozdziały: wyniki, dyskusja) Autor poświęcił również analizie wpływu rasy na wartość wskaźników użytkowości rozpłodowej, co nie zostało ujęte w sformułowanych celach. Niemniej jednak te informacje

wzbogaciły dysertację i mogły być przydatne podejmując próbę wyjaśnienia i interpretacji uzyskanych wyników.

Rozdział „Materiał i metody", został podzielony na 4 główne podrozdziały i przedstawiony na 7 stronach ocenianej pracy. W pierwszej kolejności Autor opisał materiał doświadczalny i jego miejsce pochodzenia, a także scharakteryzował cechy będące przedmiotem dalszych analiz. Przy tej okazji chciałbym zwrócić uwagę na użyte w tej części pracy sformułowanie - sztuczna inseminacja. Poprawniej byłoby użyć sformułowania sztuczne unasienianie albo ograniczyć się jedynie do pojęcia inseminacja, gdyż wskazuje ono, że nie jest to proces naturalnego zapłodnienia. Warto byłoby w tej części pracy odnieść się do kwestii sposobu określania liczby prosiąt odchowanych w jednym miocie. Jak zapewne Autorowi wiadomo w praktyce dopuszcza się odchowywanie prosiąt przez tzw. mamki. Działanie takie może skutkować odmienną liczbą prosiąt odchowanych niż w przypadku odchowywania ich wyłącznie przez własne matki. Następnie w tej części pracy szczegółowo zaprezentował sposób przeprowadzenia analiz na poziomie molekularnym. Kończąc rozdział materiał i metody, Autor opisał właściwie dobrane i zastosowane analizy statystyczne.

Pragnę w tym miejscu podkreślić wielowątkowy charakter przeprowadzonych badań, szeroki zakres przeprowadzonych oznaczeń, analiz zwłaszcza z zakresu genetyki molekularnej oraz wykorzystanych metod, co zasługuje na duże uznanie. Zrealizowanie analiz laboratoryjnych ze względu na ich pracochłonność, wymagało dużej wiedzy, doświadczenia i sprawności organizacyjnej.

Prezentacji uzyskanych wyników dokonano aż na 60 stronach komputerowo edytowanego tekstu wzbogaconego w liczne tabele i wykresy, co dodatkowo podnosi wartość ocenianej dysertacji. W poszczególnych podrozdziałach omówienia wyników Autor omawia zagadnienia dotyczące charakterystyki analizowanych markerów mikrosatelitarnych, analizy cech reprodukcyjnych loch, wpływu genotypu na cechy reprodukcyjne loch, korelacji fenotypowych między tymi cechami oraz analizy głównych składowych cech reprodukcyjnych z uwzględnieniem ras i genotypów. Spośród 12 analizowanych markerów mikrosatelitarnych opisywanych w niniejszym rozdziale, Autor skupił się głownie na tych, które wykazywały potwierdzony statystycznie związek z badanymi cechami. Wśród nich najczęściej wykazywano związek markera SW1808 z badanymi cechami (siedmioma spośród 12 analizowanych), co może wskazywać na znaczącą jego rolę w kształtowaniu poziomu użytkowości rozpłodowej samic tego gatunku. Potwierdzeniem tego są chociażby wyniki cech wykorzystywanych w programach hodowlanych, w tym liczby prosiąt urodzonych żywych i liczby prosiąt odchowywanych, a także liczby prosiąt urodzonych razem. Na ścisły związek

z tymi cechami wskazują także analizy dwóch innych markerów w tym S0008 oraz S0064. W świetle powyższego, jak również prowadzonej w kraju pracy hodowlanej metodą BLUP animal model uwzględniającej wspomniane cechy, uzyskane wyniki należy uznać za znaczące osiągniecie niniejszej dysertacji. Uzyskanie interesujących w tym zakresie wyników wskazuje, że zagadnieniu temu warto poświęcić więcej uwagi i kontynuować badania na większej populacji osobników. Warto również podkreślić podjęte przez Autora starania w celu wzbogacenia materiału badawczego o zwierząt pochodzące z hodowli zagranicznych (Stany Zjednoczone Ameryki Północnej). Ciekawą w tym kontekście byłaby także analiza związku, wybranych na podstawie uzyskanych wyników, markerów z cechami użytkowości rozpłodowej loch, prowadzona oddzielnie dla tych samych ras, pochodzących z różnych ośrodków. Opisując wyniki Autor niejednokrotnie (np. str. 38, 40, 43, 44, 45) podkreśla istnienie statystycznie istotnych równic między genotypami w zakresie analizowanych cech. W moim odczuciu warto byłoby wskazać w tych miejscach poziom istotności odnotowanych różnic. Aby się o nim dowiedzieć należy sięgnąć do tabel z wynikami. Wskazanym byłoby wyjaśnienie, przytaczanej w tabeli 7 liczebność, która jest odmienna od przedstawionej w rozdziale materiał i metody liczby loch poszczególnych ras. Rolą recenzenta poza wykazaniem osiągnięcia wynikającego z opracowania jest również wskazanie, o ile występują, pewnych niedociągnięć. Dlatego też w tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę na błędne, w kontekście uzyskanych wyników, oznaczenia genotypów w obrębie markera SW472. Na stronie 38 Autor podał, że cyt. „Lochy o genotypie 89/89, w obrębie markera SW 472, miały laktację krótszą o 1,17 dnia, w porównaniu z osobnikami o genotypie 89/91". Wyniki zamieszczone w załączniku 1 tego nie potwierdzają. Różnica na wskazanym poziomie istnieje, jednak między osobnikami o genotypach 89/91 a 91/91. W obrębie tego markera wykazano także różnice między genotypami dochodzące do 10% w zakresie liczby prosiąt urodzonych żywych. Nie wykazano jednak statystycznie istotnych różnic. W przypadku innego markera (SW1083) różnice między genotypami w liczbie prosiąt urodzonych żywych sięgały wartości 1,9 i także nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Jaka mogła być tego przyczyna ? Na wykresie 1 Autor zaprezentował wyniki dotyczące długości laktacji w zależności od genotypu markera SW472. Przy czym wartości na osi rzędnych wykresu wskazują, że odnoszą się one raczej do długości ciąży, a nie długości laktacji. O braku wpływu genotypów na cechy dowiadujemy się z opisu, w którym Autor stwierdza, że cyt. „Nie wykazano żadnych istotnych statystycznie **różnic w wartościach cech** reprodukcyjnych loch posiadających różne genotypy w obrębie markera SW460" (str. 40, str. 47). Wydaje się, że poprawniej byłoby użyć sformułowania wskazującego na brak istotnych

statystycznie **różnic między** genotypami w zakresie cech.... Nie do końca można zgodzić się ze stwierdzeniem, że lochy o genotypie 185/193 rodzące najwięcej prosiąt i odchowujące najliczniejsze mioty miały również najdłuższą laktację. Nie potwierdzają tego wyniki przedstawione w tabeli 11. U loch o tym genotypie stwierdzono taką samą długość laktacji jak u loch o genotypie 185/185 i krótszą niż u loch o genotypie 183/185. Uważam, że korekty wymaga zdanie zgodnie, z którym cyt. „...istotne statystycznie różnice w liczbie TNB i NBA **nie wpływały** w sposób istotny na liczbę STB itd. ...". Wydaje się, że Autorowi chodziło raczej o brak wpływu genotypu, a nie istotnie statystycznych różnic. Podobnego błędu stylistycznego Autor użył również w ostatnim zdaniu na stronie 58. Odnosząc się do podrozdziału 4.4., w którym opisano analizy korelacji fenotypowych cech reprodukcyjnych, z korzyścią dla odbiorców tych wyników byłoby ich opatrzenie stosownym komentarzem. Autor ograniczył się jedynie do stwierdzeń istnienia lub nie zależności i wskazania wartości współczynników korelacji. A przecież fakt istnienia statystycznie istotnych zależności między liczbą prosiąt urodzonych ogółem a liczbą prosiąt urodzonych żywych oraz liczbą prosiąt urodzonych martwych dostarcza cennych informacji i jest wskazówką do podejmowania określonych działań przy konstruowaniu programów hodowlanych. Oceniając rozdział Wyniki stwierdzam, że Autor dokonał, mimo drobnych uchybień, prawidłowej oceny wartościowych wyników. Odzwierciedlają one założony cel badań, a nawet wykraczają poza jego zakres.

Dyskusję uzyskanych wyników Autor przeprowadził wykorzystując do tego celu właściwie dobrane i wykorzystane liczne pozycje piśmiennictwa zwłaszcza autorów zagranicznych. W zdecydowanej większości ukazały się one po roku 2000, a nierzadko po 2010. Dlatego też stwierdzam, że Autor ocenianej dysertacji przeprowadził wnikliwą i merytoryczną dyskusję odwołując się w niej do aktualnych wyników badań innych autorów.

Całość opracowania kończy rozdział Podsumowanie i wnioski, które znajdują potwierdzenie w uzyskanych wynikach badań. Na szczególna uwagę zasługuje - moim zdaniem – wniosek, zgodnie z którym wykazano związek wartości wskaźników użytkowości rozpłodowej, w tym zwłaszcza liczby prosiąt urodzonych ogółem, liczby prosiąt urodzonych żywych i odsadzonych z markerami S0008, S0064 oraz SW1808. Informacja ta może być przydatna przy konstruowania programów hodowlanych mających na celu doskonalenie użytkowości rozpłodowej loch.

W podsumowaniu tej części oceny stwierdzam, że uzyskane wyniki są ciekawe, oryginalne i jednocześnie inspirujące do dalszych dociekań. Mają także swoją wartość poznawczą, ale i wartość praktyczną. Zostały przedstawione i zinterpretowane, mimo

drobnych uchybień, w poprawny sposób, wykorzystując w tym celu szeroki zakres piśmiennictwa. Właściwe i umiejętne wykorzystane piśmiennictwo, liczące blisko 190 pozycji, jest niewątpliwie mocną stroną ocenianej dysertacji. Przytoczone wyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej dysertacji i w większości mają charakter dyskusyjny lub edytorski. Wyrażam przekonanie, że wskazane drobne niedociągnięcia pomogą Autorowi w udoskonalaniu sposobu prezentacji wyników badań w dalszym postępowaniu. Uzyskane wartościowe dla nauki i praktyki hodowlanej wyniki pracy powinny być opublikowane w renomowanych czasopismach.

Konkluzja

Badania zostały przeprowadzone prawidłowo, dokonano właściwej interpretacji wyników oraz przeprowadzono wnikliwą dyskusję. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano wniosek wskazujący na istnienie związku niektórych spośród analizowanych markerów z cechami reprodukcyjnymi loch, co w przyszłości może być wykorzystane w doskonaleniu zarodowego pogłowia loch, a w dalszej kolejności loch pogłowia masowego. Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska jest wartościowym opracowaniem. W związku z powyższym stwierdzam, że praca doktorska pt. **„Analiza mikrosatelitarnych markerów cech reprodukcyjnych loch"** odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. z 2016, poz. 882 t. j.). Dlatego też przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie **Pana mgra inż. Błażeja Nowaka** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.