

Siedlce 27.05.2024 r.

Prof. dr hab. Piotr Guliński
Wydział Nauk Rolniczych
Instytut Zootechniki i Rybactwa
Uniwersytet w Siedlcach

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Melanii Kunickiej pt: „**Analiza polimorfizmu w genach związanych z metabolizmem lipidów w kontekście doskonalenia cech użytkowości mlecznej krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej**”

przygotowanej pod kierunkiem Promotora – dr hab. Hanny Kulig, prof. ZUT

Podstawą wykonania recenzji było pismo prof. dr hab. Małgorzaty Ożgo – Przewodniczącej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie (L.dz:WBiHZ/RDZiR/52/2024)

Przedstawiona do oceny praca podejmuje problematykę związaną z oceną wpływu wybranych polimorfizmów genów *SLC27A1*, *LIPE* i *SCD1* na zmienność wybranych cech użytkowości mlecznej i rozplodowej krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Doktorantka w pierwszym etapie badań, z wykorzystaniem materiału biologicznego pochodzącego od łącznie 634 krów, przeprowadziła analizę polimorfizmów w trzech wybranych genach i oszacowała frekwencje genotypów i alleli. W drugim etapie określiła współzależności między poszczególnymi genotypami oraz genotypami kombinowanymi z wybranymi cechami użytkowości mlecznej krów. Do tej grupy cech zaliczyła: wydajności dobowe (kg) mleka, białka i tłuszczu, procentową zawartość białka, tłuszczu, laktozy, suchej masy oraz liczbę komórek somatycznych wyrażoną jako logarytm naturalny z rzeczywistej ich liczby. Jako ważny element pracy ocenić trzeba, przeprowadzoną przez Doktorantkę w trzeciej części badań ocenę współzależności pomiędzy polimorfizmem ocenianych w pracy genów i wybranymi wskaźnikami użytkowania rozplodowego zwierząt, do których zaliczono: wiek w momencie pierwszego wycielenia (dni), oraz długości okresów międzywycieleniowego (dni) i międzyciążowego (dni).

Praca składa się ze 91 stron komputeropisu, zawiera w zasadniczej części pracy 2 ryciny oraz 18 tabel, z których 4 zamieszczono w rozdziale „Materiał i metody”, 12 - w rozdziale „Wyniki” i 2 - w rozdziale Dyskusja. Dodatkowo w suplemencie znajdują się 1

rycina i 10 tabel. W tekście pracy wyróżniono 13 zasadniczych rozdziałów obejmujących Streszczenie w językach polskim i angielskim, które zajmuje 2 strony; Wstęp; Hipoteza badawcza; Cel pracy; Przegląd piśmiennictwa, który liczy 12 stron; Materiał i metody pracy zostały opisane na 8 stronach; rozdział Wyniki obejmuje 20 stron; Dyskusja – rozdział obejmuje 12 stron; rozdział Podsumowanie i wnioski autorka umieściła na dwóch stronach; Piśmiennictwo liczące łącznie 216 pozycji obejmuje 13 stron. Strukturę pracy uzupełniają ponadto rozdziały zawierające Spis tabel i rycin oraz Suplement, w którym zamieszczono szczegółowe wyniki badań związane z użytkowością rozplodową. Zasadnicze rozdziały pracy (Przegląd piśmiennictwa, Materiał i metody oraz Wyniki) zostały podzielone na podrozdziały. Uważam, że struktura i układ pracy są prawidłowe i typowe dla tego typu opracowań. Praca napisana jest poprawnym językiem. Także jej poziom edytorski ocenić należy jako staranny i nie budzący większych zastrzeżeń.

Oceniając podjętą w dysertacji doktorskiej przez Panią mgr Melanię Kunicką tematykę, przypomnieć należy, że wydajność mleka i jego skład chemiczny nie jest stały. Wysoka zmienność składu mleka krów, opisywana w wielu pracach naukowych, stawia duże wyzwania w racjonalnej ocenie mleczności i możliwości wykorzystania tych informacji w doskonaleniu krów. W świetle dotychczasowej wiedzy zmienność składu chemicznego mleka krów jest efektem występowania grupy czynników środowiskowych, które na poziomie produkcyjnym konsekwentnie różnicują poziom poszczególnych jego składników. Należą do nich: stadium laktacji, wiek krów, sezon produkcji, kondycja w okresie produkcji mleka, choroby (głównie metaboliczne i wymion) oraz stosowane technologie żywienia. Wiadomo również, że zmiany w wydajności i składzie mleka wynikają z założeń genetycznych zwierząt (ich genotypów). Oddziaływanie czynników środowiskowych i genetycznych na poziomie praktycznym prowadzi do ogromnego zróżnicowania użytkowości mlecznej poszczególnych krów, stad i całych populacji bydła. Według najnowszych danych źródłowych, zmienność zawartości głównych składników mleka, produkowanego w reprezentatywnej populacji krów utrzymywanych w warunkach krajowych, w przypadku wydajności rzeczywistej mleka oraz zawartości tłuszczu, białka, laktozy, suchej masy, mocznika oraz rzeczywistej liczby komórek somatycznych laktozy, białka i tłuszczu wynosiła odpowiednio: 39%, 20%, 13%, 5%, 13%, 37% i 223%.

Biorąc powyższe pod uwagę, podjętą przez doktorantkę problematykę dotyczącą poszukiwania przyczyn mającego miejsca w warunkach produkcyjnych wysokiego zróżnicowania cech użytkowości mlecznej krów, należy ocenić jako aktualną i niezwykle istotną z poznawczego i aplikacyjnego punktu widzenia. Pragę przy tej okazji wyrazić

przekonanie, że wyniki pracy doktorskiej Pani mgr Melanii Kunickiej, stanowiąc będą w krajowym piśmiennictwie specjalistycznym, istotny „punkt odniesienia” w dyskusji nad oddziaływaniem polimorfizmów wybranych genów na cechy użytkowości mlecznej podstawowej rasy bydła użytkowanej w Polsce. Uważam również, że oceniana może być cennym źródłem kompleksowej informacji dotyczącej kształtowania się cech produkcyjnych w populacji zwierząt rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, których genotypy charakteryzują się występowaniem różnych form polimorficznych genów decydujących o poziomie ważnych cech użytkowych.

Przechodząc do oceny merytorycznej sędzę, że do najważniejszych osiągnięć naukowo-badawczych ocenianej rozprawy doktorskiej należy zaliczyć:

- Analizę polimorfizmu trzech genów warunkujących cechy użytkowości mlecznej krów tj. genu *SLC27A1*, genu *LIPE* oraz genu *SCD1*. Wszystkie oceniane polimorfizmy związane były z podstawieniem pojedynczego nukleotydu w obrębie sekwencji kodującej.
- Oszacowanie częstości występowania alleli i genotypów dla każdego z analizowanych polimorfizmów w ocenianej populacji krów.
- Oszacowanie częstości występowania genotypów tzw. kombinowanych.
- Określenie użytkowości mlecznej dla 634 krów w laktacji I, 624 w laktacji II, 539 krów w laktacji III oraz dla 368, 247, 145, 65 i 11 krów, które ukończyły odpowiednio laktacje: 4, 5, 6, 7 i 8. Użytkowość mleczną charakteryzowano na podstawie następujących wskaźników: wydajności dobowej mleka (kg), białka (kg) i tłuszczu (kg), procentowej zawartości białka, tłuszczu, laktozy i suchej masy oraz liczby komórek somatycznych wyrażonej jako logarytm naturalny z rzeczywistej ich liczby.
- Ocenę użytkowości rozplodowej analizowanej populacji krów, którą przeprowadzono z na podstawie wielkości 3 podstawowych wskaźników tj. wieku pierwszego wycielenia (dni), długości okresów międzywycieleniowych (dni) i długości okresów międzyciążowych (dni).
- Określenie współzależności między genotypami *SLC27A1* g.14996C>G, *SLC27A1* g.14791C>T, *LIPE* g.13298A>C i *SCD1* g.10153G>A oraz genotypami kombinowanymi i analizowanymi cechami użytkowości mlecznej.
- Określenie współzależności między genotypami *SLC27A1* g.14996C>G, *SLC27A1* g.14791C>T, *LIPE* g.13298A>C i *SCD1* g.10153G>A oraz genotypami kombinowanymi i analizowanymi cechami użytkowości rozplodowej.

Do najważniejszych wyników pracy należy zaliczyć:

- Stwierdzenie obecności wszystkich trzech możliwych genotypów w każdym z analizowanych polimorfizmów.
- Stwierdzenie, że najczęściej występującymi genotypami w przypadku polimorfizmu: genu *SLC27A1* g.14996C>G był genotyp GG (0.65), genu *SLC27A1* g.14791C>T był genotyp CT (0.57), genu *LIPE* g.13298A>C - genotyp AC (0.53) i genu *SCD1* g.10153G>A - genotyp GA (0.48).
- Wykazanie, że obrębie poszczególnych genów najczęściej występującymi allelami były: allel G (0.82) - *SLC27A1* g.14996C>G, allel T (0.63) - *SLC27A1* g.14791C>T, allel A (0.60) - *LIPE* g.13298A>C, allel A (0.70) - *SCD1* g.10153G>A.
- Wykazanie wysokich i potwierdzonych statystycznie współzależności między analizowanymi w pracy polimorfizmami genów *SLC27A1* g.14996C>G, *SLC27A1* g.14791C>T, *LIPE* g.13298A>C oraz *SCD1* g.10153G>A a cechami użytkowości mlecznej krów rasy.
- Stwierdzenie, że mleko krów z genotypem AC dla genu *LIPE* g.13298A>C, charakteryzowało się istotnie niższą liczbą komórek somatycznych w porównaniu do innych genotypów i pozostałych polimorfizmów. Wynik ten ocenić trzeba jako szczególnie ważny w kontekście informacji, że ten genotyp reprezentowany był najczęściej w rozpatrywanej populacji krów. Preferowanie w hodowli osobników z genotypem AC mogłoby przyczynić się do zmniejszenia LKS, co mogłoby przełożyć się na poprawę zdrowotności wymion krów.
- Wykazanie, że występowanie genotypu GG dla genu *SCD1* g.10153G>A związane było z najwyższą procentową zawartością białka i tłuszczu w mleku. Wykorzystania tego faktu w hodowli mogłoby przyczynić się do zwiększenia poziomu tych cech w mleku krów.
- Potwierdzenie, że poziom cech użytkowości rozplodowej nie był uzależniony od występowania w populacji ani ocenianych genów ani ich poszczególnych genotypów.

Pragnę bardzo mocno zwrócić uwagę na twórczy wymiar przeprowadzonych przez Autorkę badań. Doktorantka przeprowadziła kompleksową i bardzo pracochłonną analizę polimorfizmu wybranych genów warunkujących ekspresję cech użytkowych w dużym stadzie bydła. Przeprowadziła szerokie analizy statystyczne dotyczące relacji pomiędzy określonym polimorfizmem a zmiennością wybranych cech użytkowości mlecznej. Uzyskała cały szereg

bardzo interesujących wyników, o wysokiej wartości poznawczej a w części także aplikacyjnej. Na szczególnie wysoką ocenę zasługuje eksperymentalna część badań, która wymagała ogromnego zaangażowania (próbki krwi pobierane były od każdej krowy) i wykorzystania bardzo zaawansowanych metod laboratoryjnych (metoda PCR-RFLP Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism).

Wykaz piśmiennictwa obejmuje łącznie 216 pozycji, z czego 212 to pozycje głównie angielskojęzyczne. W kompleksowej ocenie pracy na szczególne podkreślenie zasługują ponadto:

- Dobra znajomość tematyki badań udokumentowana w interesująco opracowanym przeglądzie piśmiennictwa.

Wykaz piśmiennictwa obejmuje wiele prac opublikowanych w czołowych światowych czasopismach z zakresu dyscypliny zootechniki i rybactwo tj. *Animal Genetics*, *Animals Science Papers and Reports*, *Genome Research*, *Journal of Animal Science*, *Journal of Animal Breeding and Genetics*, *Journal of Applied Animal Research*, *Journal of Dairy Science*, *Livestock Production Science* i inne,

- Zakres badań.

Doktorantka wykorzystała dane dotyczące Analizie poddano 634 krowy rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej odmiany czarno-białej. Wszystkie krowy miały ukończoną pierwszą laktację, 624 – ukończyły drugą, a 539 – trzecią laktację. Czwartą i kolejne laktacje, aż do ósmej ukończyło odpowiednio 368, 247, 145, 65 i 11 krów. Łączna liczba danych okresowych dotyczących użytkowości mlecznej krów wyniosła 26053.

- Zastosowane metody laboratoryjne.

Do izolacji DNA wykorzystano zestaw MasterPure™, DNA Purification Kit for Blood V.2 Genotypy były oznaczane z wykorzystaniem metody PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze trójblokowym, model T3 (Biometra®, obecnie Analytik Jena, Göttingen, Niemcy) po uprzedniej optymalizacji warunków termicznych i składu mieszaniny reakcyjnej. Rozdział produktów trawienia przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do elektroforezy poziomej (BIO-RAD, Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). W celu odczytania i zwizualizowania wyników użyty został system dokumentacji i analizy obrazów żeli elektroforetycznych (Vilber, Torcy, Francja).

- Sformułowanie wniosków wynikających z przeprowadzonych badań, które obok aspektów poznawczych mogą mieć duże wartości aplikacyjne.

Przechodząc do etapu dyskusji nad wynikami uzyskanymi w pracy myślę, że doskonalenie bydła mlecznego powinno opierać się na wiarygodnych źródłach odnoszących się do podstawowych źródeł zmienności poszczególnych cech użytkowości mlecznej. Ich uwzględnianie w programach hodowlanych może przyczynić się do przyspieszenia postępu hodowlanego. Przedstawiam pogląd, że wyniki ocenianej pracy, dotyczącej oceny związków pomiędzy polimorfizmem wybranych genów związanych i produktywnością podstawowej rasy bydła mlecznego w kraju, stanowią znakomite źródło wiedzy związanej z oddziaływaniem „elementów genetycznych” na ekspresję cech użytkowości mlecznej i rozplodowej krów.

W trakcie przygotowywania i opracowywania wyników autorka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości, które wymagają wyjaśnień i korekty zwłaszcza przy przygotowaniu pracy do druku w czasopismach naukowych:

- W metodyce pracy (rozdział *Material*) autorka podaje w pierwszym akapicie, że „Analizie poddano 634 krowy” i w następnym akapicie uzupełnia informacją, że „Wszystkie krowy miały ukończoną pierwszą laktację, 624 – ukończyły drugą, a 539 – trzecią laktację. Czwartą i kolejne laktacje, aż do ósmej ukończyło odpowiednio 368, 247, 145, 65 i 11 krów”. Dane te w nie do końca precyzyjny sposób odnoszą się do struktury wiekowej ocenianego stada bydła. Dlatego też proszę o podanie rzeczywistej struktury wiekowej stada krów w momencie realizacji eksperymentu tj. pobierania próbek krwi. Proszę o przedstawienie tej informacji w trakcie obrony.
- Metodykę pracy należałoby uzupełnić o podanie czasu – terminu, w którym przeprowadzono badania. Myślę także, że należałoby podać szczegółowe źródła pochodzenia danych dotyczących użytkowości mlecznej i rozplodowej krów oraz opisać potrzebę przeprowadzenia transformacji danych dotyczących rzeczywistej liczby komórek somatycznych w mleku.
- W suplemencie doktorantka w tabelach A1-A10 podała dane dotyczące długości okresów międzywycieleniowych i międzyciążowych krów. Wynika z nich, że w przypadku krów najmłodszych ich pierwsze okresy międzyciążowe były najkrótsze (\approx 120 dni) a pierwsze okresy międzywycieleniowe były najdłuższe (\approx 530 dni). Podane w ten sposób dane wymagają wyjaśnienia, ponieważ w wersji aktualnej oznaczają, że długość ciąży u tych krów znacznie przekraczała 9 miesięcy.

- W modelu liniowym wykorzystanym do obliczeń statystycznych (rozdział Analiza statystyczna) podano efekty miesiąca próbnego udoju, sezonu wycielenia i dnia laktacji. Przeprowadzoną w dalszej części pracy analizę wyników doktorantka ograniczyła wyłącznie do wieku krów (laktacji). Proszę o wyjaśnienie dlaczego (wiek krów) laktacja a nie np. okres laktacji został uwzględniony jako zasadniczy czynnik w oparciu, o który przeprowadzono ocenę oddziaływania poszczególnych polimorfizmów?
- W opinii recenzenta szerszego komentarza wymagają przedstawione w tabelach pracy wielkości odchyłeń standardowych dla poszczególnych cech mleka. Wartości te informują o wysokiej zmienności tych cech w obrębie poszczególnych genotypów co sugeruje występowanie innych źródeł ich zmienności. Powstaje zatem pytanie, które kieruje do doktorantki: jakie znaczenie miałyby w ocenie wyników pracy ograniczenie danych wyłącznie do krów w pełni zdrowych (bez stanów zapalnych wymion, ketozy i kwasicy) żywionych w pełni zbilansowanymi dawkami pokarmowymi?
- W pracy zdarzają się drobne niekonsekwencje edytorskie. I tak w rozdział Piśmiennictwo wymaga prawostronnego justowania, odstępy (liczba wierszy) pomiędzy tytułami rozdziałów i tekstem pracy nie są jednolite. Prace Lamponidis i in. 2011 (str.7), Nayeri Stothard 2016 (str.10), Graulet 2014 (str.11), Nogalska i in. 2017 (str.11), Vernom i in. 1996 (str.14), Lafontan i in. 2007 (str.19), Keating i in. 2005 (str.24), Wu i in. 2013 (str.57) są cytowane w tekście a nie ma ich w wykazie piśmiennictwa.

Wymienione uwagi oczywiście nie obniżają wartości poznawczej i przydatności aplikacyjnej ocenianej rozprawy, którą oceniam bardzo wysoko.

Reasumując pragnę wyrazić opinię, że przedstawione przez Panią mgr Melanię Kunicką opracowanie, ze względu na zaprezentowany poziom naukowy i wartości poznawcze oraz uzyskane na reprezentatywnym materiale wyniki spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipa 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Biorąc powyższe pod uwagę, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, wniosek o przyjęcie dysertacji doktorskiej Pani mgr Melanii Kunickiej i dopuszczenie Jej autorki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Potr Cukinski