



UNIwersytet Rolniczy

im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Katedra Żywnienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa

Kraków, dnia 3 listopada 2023 roku

Dr hab. inż. Maciej Murawski, prof. URK

Tel. 12-429-75-47

Fax: 12-429-75-47

e-mail: rzmmuraw@cyf-kr.edu.pl

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Angeliki Mąsior

pt.

Identyfikacja mieszańców lama x alpaka na podstawie analizy DNA.

wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Katarzyna Piórkowska, prof. IZ, Instytut Zootechniki

– Państwowy Instytut Badawczy w Balicach

Rola alpaki i lamy w rozwoju cywilizacyjnym tak zwanego Nowego Świata, czyli Ameryki Południowej jest podobna do tej, jaką odegrały owce w średniowiecznej Europie. Nawet współcześnie alpaki i lamy stanowią ważną część hodowli zwierząt gospodarskich będąc podstawą kultury rdzennych mieszkańców rozległych regionów a nawet wielu krajów Ameryki Południowej. Znaczenie gospodarcze tych zwierząt poza jucznym użytkowaniem, pozyskiwaniem mięsa, wynika przede wszystkim z możliwości otrzymywania głównie od alpaki cennego włókna, które z uwagi na swoje wyjątkowe właściwości z powodzeniem wykorzystywane jest do wyrobu odzieży oraz wielu innych produktów użytkowych.

Wzrost zainteresowania hodowlą tych egzotycznych zwierząt poza Ameryką Południową nastąpił głównie w latach 80. XX wieku. Pierwsze alpaki, poza ogrodami zoologicznymi, sprowadzono do Polski 2004 roku z Chile. Początkowo zwierzęta te hodowano jako zwierzęta towarzyszące głównie z uwagi na swój egzotyczny i przyjemny wygląd. Z upływem czasu alpaki zaczęto coraz częściej hodować i użytkować w celu pozyskania włókna i w alpakoterapii. W roku 2021 alpaki i lamy zostały uznane za zwierzęta gospodarskie, co wiąże się także z obowiązkiem objęcia tych zwierząt Systemem Identyfikacji i Znakowania Zwierząt. W tym samym czasie dla alpaki założono Księgi Hodowlane i umożliwiono hodowcom objęcie tych zwierząt kontrolą użytkowości. Niestety sprowadzane do Polski zwierzęta z różnych krajów nie zawsze były zwierzętami posiadającymi poprawną

dokumentację potwierdzającą pochodzenie, a nawet zdarzało się, że sprowadzane alpaki w dokumentacji widniały jako lamy.

Dlatego uważam, że przedłożona do oceny praca mgr inż. Angeliki Mąsior pt: „*Identyfikacja mieszkańców lama x alpaka na podstawie analizy DNA.*” porusza bardzo ważne zagadnienie dotyczące ustalania pochodzenia i spokrewnienia między osobnikami w obrębie gatunku, oraz pomiędzy alpakami i lamami utrzymywanymi w Polsce.

1. Ogólne podsumowanie pracy doktorskiej

Praca doktorska przedłożona do recenzji swoim zakresem obejmuje analizę mitochondrialnego i jądrowego DNA umożliwiającą charakterystykę odrębności genetycznej alpak od lam oraz ustalenie stopnia spokrewnienia pomiędzy tymi gatunkami i ich hybrydami, a także różnorodności genetycznej alpak utrzymywanych w Polsce. Badania przeprowadzono korzystając z materiału genetycznego pozyskanego od 216 alpak i 18 lam utrzymywanych w pięciu hodowlach. Do wykonania analizy struktury genetycznej i identyfikacji hybrydyzacji alpak hodowanych w Polsce Doktorantka przeprowadziła badania stosując analizę amplifikacji 17 markerów mikrosatelitarnych otrzymanych w reakcji multipleks PCR, rozdziału fragmentów STR (krótkich powtórzeń tandemowych) mikrosatelitarnego DNA w elektroforezie kapilarnej. Zastosowano także, klastrowanie bayesowskie i analizę genetyczną populacji oraz zmienności genetycznej alpak, posługując się programami: GalenAlex 6.5, HP-RARE 1.0, CERVUS 3.0.7 i GENEPOP 4.7.5. Otrzymane dane przeanalizowano metodami bioinformatycznymi, wykonując również dendogram genetyczny według algorytmu UPGMA i programu iTOL v6. Natomiast do rozpoznania stopnia hybrydyzacji w populacji alpak utrzymywanych w Polsce pani mgr Angelika Mąsior posłużyła się analizą niekodującego regionu kontrolnego d-loop w mtDNA i genu DBY zlokalizowanego na chromosomie Y wykorzystując metodę PCR, reakcję sekwencjonowania Sangera i po sekwencyjny elektroforetyczny rozdział produktów PCR sekwenatorem 3500xl. Otrzymane wyniki doktorantka poddała analizie bioinformatycznej sporządzając dendogram metodą tzw. „łączenia sąsiadów”, zwizualizowała sieci haplotypów w programie STRUCTURE 2.3.4, wygenerowała wykres głównych współrzędnych dla regionu d-loop oraz określiła zmienność genetyczną u alpak w programi DanSP 6. Szczegółowy opis metod został umieszczony w dwóch publikacjach (Podbielska i wsp. 2021 oraz Podbielska i Piórkowska 2022a) z trzech które wraz z opisem polskim stanowią przedłożoną do oceny pracę doktorską.

Za cel badań Doktorantka obrała określenie poziomu stopnia hybrydyzacji oraz zmienności genetycznej alpak utrzymywanych w Polsce, z wykorzystaniem dostępnych

narzędzi z zakresu biologii molekularnej i oceny przydatności tych narzędzi do identyfikacji hybryd dla tego gatunku. Poniżej zasadniczego celu rozprawy Doktorantka podała zagadnienia jakie zostały objęte niniejszą dysertacją. Jednakże w moim przekonaniu należało je przedstawić nie jako zagadnienia lecz jako cele szczegółowe, które podjęto do realizacji celu głównego. Tymi celami szczegółowymi było:

1. Przygotowanie panelu markerów mikrosatelitarnych do identyfikacji osobniczej oraz kontroli pochodzenia alpak i lam, a następnie wykorzystanie go do identyfikacji osobników zhybrydyzowanych oraz określenia różnorodności genetycznej alpak utrzymywanych w Polsce.
2. Ocena zmienności regionu d-loop mitochondrialnego DNA alpak, a następnie wykorzystanie jej do identyfikacji osobników zhybrydyzowanych oraz określenia różnorodności genetycznej alpak utrzymywanych w Polsce.
3. Ocenę zmienności genu DBY zlokalizowanego na chromosomie Y, a następnie wykorzystanie jej do identyfikacji osobników zhybrydyzowanych oraz określenia różnorodności genetycznej samców alpak utrzymywanych w Polsce.

Doktorantka podaje jeszcze jeden, czwarty cel szczegółowy dotyczący wykorzystania techniki GBS w aspekcie identyfikacji hybryd międzygatunkowych alpaka × lama, który opisuje w trzeciej publikacji przeglądowej autorów Podbielska i Piórkowska 2022b. Co prawda, praca ta bardzo syntetycznie i jasno przedstawia możliwości zastosowania metody GBS do identyfikacji osobników hybrydowych u wielu gatunków zwierząt i poświadcza rozległą wiedzę Doktorantki na ten temat, jednakże nie jest to praca doświadczalna prezentująca wyniki badań własnych. Dlatego też wyłączam ją z oceny przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki oryginalnych badań przedstawione w dwóch artykułach powiązanych ze sobą tematycznie są badaniami pionierskimi w Polsce w tym zakresie. Charakterystyka struktury genetycznej alpak i lam w Polsce nie była jak dotychczas analizowana w żaden sposób, tym bardziej z zastosowaniem metod biologii molekularnej. Z pewnością kontynuowane w przyszłości badania w tym zakresie zawsze będą odnoszone do wyników opublikowanych w tych dwóch pracach przedłożonych do recenzji jako praca doktorska.

2. Najciekawszymi osiągnięciami tej pracy są:

1. Stwierdzenie wysokiej różnorodności genetycznej na podstawie analizy zmienności markerów mikrosatelitarnych alpak utrzymywanych w Polsce.

2. Potwierdzenie wysokiej przydatności przetestowanego zbioru 17 *loci* STR do potwierdzania pochodzenia potomka przypisywanym rodzicom.
3. Wprowadzenie do bazy danych GenBank (NCBI) 34 nowych haplotypów zidentyfikowanych w trakcie przeprowadzonych analiz regionu d-loop w mtDNA u alpaka.
4. Zidentyfikowanie i potwierdzenie czterech miejsc w genie DBY, które potencjalnie mogłyby posłużyć jako markery w diagnostyce identyfikacji alpaka, lama i ich hybryd płci męskiej, co wymaga dalszych badań na większej liczbie samców obu gatunków.

3. Uwagi szczegółowe

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr inż. Angeliki Mańsior składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, krótkiego 4 stronicowego wstępu i omówienia kolejno trzech publikacji. Tę część pracy opatrzone spisem 48 pozycji literatury. Kolejną część pracy stanowiły dwa oryginalne artykuły i jedna praca przeglądowa. Do manuskryptu dołączono również 4 oświadczenia współautorów potwierdzające wiodącą rolę Pani mgr inż. Angeliki Mańsior (Podbielskiej) w przygotowaniu artykułów do druku i wyrazili swoją zgodę na wykorzystanie tych prac przez Doktorantkę jako części rozprawy doktorskiej.

Artykuły opublikowano w uznanych czasopismach naukowych, pierwszy w *Animals* o IF=3,14 i 100 pkt MNiSW, drugi w *Small Ruminant Research* o IF=1,893 i 100 pkt MNiSW oraz trzeci w *Annals of Animal Science* o IF=2,667 i 140 pkt MNiSW. Na podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką i jednocześnie autorką korespondującą, co utwierdza mnie w przekonaniu o zaangażowaniu, nie tylko w przygotowaniu manuskryptów do druku, ale także o dużej samodzielności w przeprowadzaniu opublikowanych badań.

Treść zawartą w pracy odniosłem do jej tytułu, który brzmi „*Identyfikacja mieszańców lama × alpaka na podstawie analiz DNA.*” Jest oczywiste, że tytuł pracy został wcześniej ustalony i jako taki nie podlega zmianie. Jednakże z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę, że tak sformułowany, tylko częściowo zarysowuje treść dysertacji. W moim przekonaniu przedstawiony w następujący sposób „*Charakterystyka różnorodności genetycznej alpaka i lama utrzymywanych w Polsce oraz identyfikacja ich mieszańców na podstawie analizy DNA.*” znacznie pełniej odzwierciedlałby tematykę przeprowadzonych badań i treść pracy.

4. Opis części pracy w języku polskim

Streszczenie w języku polskim jest tożsamy streszczeniu w języku angielskim i w bardzo syntetyczny, przejrzysty i zrozumiały sposób przedstawia treść pracy. Wstęp bardzo dobrze wprowadza w zagadnienie konieczności podjęcia badań różnicowania genetycznego alpak i lam utrzymywanych w Polsce, a także zarysowując wagę i skalę problematyki poruszonej w treści pracy. Pomimo iż Streszczenie i Wstęp nie wzbudza moich zastrzeżeń merytorycznych, to moją uwagę, w kilku miejscach tekstu, zwróciło nieprecyzyjne posługiwanie się przez Doktorantkę językiem polskim lub używanie żargonu. Na przykład: ostatnie zdanie pierwszego akapitu: „*Kolejne pokolenia płodnych mieszańców ciężko jest odróżnić tylko oceniając ich fenotyp.*” Zdanie brzmiało by lepiej gdyby zamiast słowa „ciężko” użyć słowo „trudno”. W pierwsze zdaniu drugiego akapitu, zapewne autorka chciała wyrazić, że alpaki dostarczają włókna, które uchodzi za surowiec wysokiej jakości służący do produkcji wyrobów luksusowych. Natomiast użyte przez Doktorantkę następujące sformułowanie: „*Alpaki słyną z produkcji włókna, które uchodzi za materiał luksusowy.*” jest skrótem myślowym. Bardzo bym prosił o wyjaśnienie pojęcia „stopień włosowatości” użytym w 5 wersie drugiego akapitu Streszczenia i kilku dalszych miejscach pracy.

W przedostatnim zdaniu drugiego akapitu **...”była ocena markerów...”**, przypuszczam, że powinno być **...”była ocena przydatności markerów...”** i dalej **...zlokalizowanych na chromosomie Y jako narzędzi do identyfikacji hybrydyzacji wśród alpak...”** słowo „narzędzi” zastąpiłbym słowem „wskaźników”. Na stronie 4 w drugim akapicie niefortunnie sformułowano pierwsze zdanie używając żargonu. Proponowałbym jego przeredagowanie na przykład w następujący sposób: Stosując analizę markerów mikrosatelitarnych oszacowano w genomie alpaki procentowy udział genów pochodzących od gatunku lama, jednakże trudno stwierdzić kiedy ta hybrydyzacja nastąpiła.

We Wstępie, w drugim akapicie, w drugim wersie żargonowe sformułowanie **„w tym temacie”** zastąpiłbym zwrotem **„w tym zakresie”**. Pierwsze zdanie drugiego akapitu jest skrótem myślowym i stwierdzeniem stereotypowym nieznajującym potwierdzenia w literaturze naukowej. Ponadto przyjęło się, że określenie **„wełna”** stosuje się tylko w odniesieniu do okrywy włosowej owiec. Natomiast określenie **„włókno”** stosowane jest do charakteryzowania włosów przednych innych gatunków zwierząt. Alpaki i lamy posiadają okrywę włóknistą i niezręcznie jest nazywać ją wełną, chociaż w języku potocznym często określenia te stosowane są zamiennie. Na Stronie 9, w akapicie trzecim, wersie drugim, sugerowałbym słowo **„narzędzi”** zastąpić słowem **„wskaźników”**. Podobnie na stronie 10, w akapicie drugim, w wersie pierwszym słowo **„narzędziem”** sugerowałbym zastąpić słowem **„wskaźnikiem”**.

Rozdział 4. Cel i zakres badań. W tej części manuskryptu sugerowałbym ograniczyć się jedynie do zapisania celu głównego i celów szczegółowych, co uczyniło by część bardziej wyrazistą i czytelną. Tekst poprzedzający cel główny proponowałbym przenieść do Wstępu.

Rozdział 5. Cykl publikacji naukowych. W tej części pani mgr inż. Angelika Maśior w treściwy sposób opisała każdą z publikacji z osobna, dzieląc treść na podrozdziały Materiał, Metody: analizy laboratoryjne oraz Wyniki i dyskusja. W mojej opinii w tej części pracy zabrakło całościowego przedstawienia przeprowadzonych badań ujętych zarówno w pierwszej jak i w drugiej publikacji. Streszczenie pracy, wydawało się, że zapowiada takie ujęcie tematyki badawczej objętej rozprawą doktorską. Spodziewałem się zilustrowania najważniejszych i zebrania w tabelach najciekawszych wyników i osiągnięć jakie niewątpliwie uzyskano przeprowadzając badania różnorodności genetycznej alpak i lam oraz ich hybryd utrzymywanych w Polsce. Ponadto, Doktorantka mogłaby w ten sposób dodatkowo wykazać się umiejętnością redagowania tekstów naukowych, co niewątpliwie było mocną stroną opublikowanych prac stanowiących podstawę pracy doktorskiej, a czytelnikowi ułatwiłoby zrozumienie poruszanej problematyki i jej istoty.

Rozdział 6. Podsumowanie i wnioski. Z uwagi na treść i nie stylistyczne sformułowanie wniosków oraz stwierdzeń nie uwypuklają one wystarczająco mocno poczynionych ustaleń i uzyskanych niewątpliwych osiągnięć będących wynikiem przeprowadzonych badań w ramach pracy doktorskiej. Podsumowanie nie jest oparte o wyniki badań własnych lecz o ustalenia wynikające z badań innych autorów. Powinno ono odnosić się do wyników, które zebrano w przeprowadzonych i opublikowanych badaniach własnych na temat różnorodności genetycznej alpak i lam oraz ich hybryd utrzymywanych w Polsce. Ponadto, ostatnie zdanie podsumowania jest sprzeczne z wnioskiem pierwszym. Natomiast wniosek pierwszy, jest w sprzeczności z wnioskiem siódmym. Podrozdział Wnioski składa się nie tylko z wniosków lecz znajdują się w nim także stwierdzenia w pozycji 3, 4, 5 i 10. Dlatego tytuł tego rozdziału powinien brzmieć Podsumowanie, stwierdzenia i wnioski.

5. Publikacje powiązane tematycznie stanowiące rozprawę doktorską

Do oceny przedłożono cykl trzech powiązanych tematycznie publikacji, z których dwie zawierają opis prac badawczych przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej i jedna jest pracą przeglądową. Z uwagi na wymogi stawiane rozprawom doktorskim, które między innymi wyrażają, że są one wynikiem pracy badawczej, to z formalnego punktu widzenia praca przeglądowa nie spełnia tego kryterium i dlatego zostaje wyłączona z oceny cyklu tematycznie powiązanych ze sobą prac badawczych przedłożonego manuskryptu.

Opublikowane prace były już oceniane przez ekspertów przed ich drukiem. Dlatego z obowiązku recenzenta oceniającego całą pracę ograniczę się tylko do komentarza. W mojej opinii obie prace są bardzo dobrze, starannie opracowane redakcyjnie, opatrzone wstępami jasno wprowadzającymi w treść pracy i prezentowane dane. Analizę danych oraz omówienie wyników przeprowadzono w odniesieniu do współczesnej wiedzy zawartej w dostępnej najnowszej literaturze światowej. Przedłożone do oceny prace stanowią wartościowe opracowania naukowe dające podstawę do dalszego rozwoju badań w zakresie różnorodności genetycznej alpak, lam i ich hybryd utrzymywanych w Polsce. Należy mocno podkreślić, że są to prace pionierskie, po raz pierwszy opisujące strukturę genetyczną tych zwierząt w naszym kraju i choćby z tego powodu są nie do przecenienia. Są to badania o charakterze nie tylko podstawowym ale o dużym znaczeniu użytkowym dla raczkującej od dwóch hodowli alpak i lam w Polsce, kiedy to, te egzotyczne zwierzęta uzyskały formalnie status zwierząt gospodarskich, a następnie założono dla nich Księgi Hodowlane i rozpoczęto prowadzenie kontroli użytkowości.

Zaspokajając swoją ciekawość chciałbym skierować do Doktorantki następujące pytania:

1. W swoich badaniach opublikowanych w pierwszej pracy z 2021 roku oznaczała Pani 17 markerów mikrosatelitarnych rekomendowanych przez ISAG metodą reakcji multiplex PCR w celu określenia struktury genetycznej alpak i lam i ich hybryd utrzymywanych w Polsce. Czy są znane inne markery mikrosatelitarne, które mogłyby być wykorzystane, w badaniach struktury genetycznej tych zwierząt?
 2. Przeprowadzając analizę mtDNA u samców analizowała Pani gen DBY na chromosomie Y metodą PCR w celu rozróżnienia dwóch haplotypów, jeden charakterystyczny dla alpak drugi dla lam. Czy są znane inne geny na chromosomie Y, które są charakterystyczne tylko dla alpak lub tylko dla lam i także mogłyby posłużyć do rozróżniania ich między sobą?
- 6. Podsumowując** chcę mocno zaznaczyć, że dwie z trzech publikacji przedłożonych przez panią mgr inż. Angelikę Maśior, jako podstawy pracy doktorskiej, stanowią spójną tematycznie całość odnoszącą się do charakterystyki zróżnicowania genetycznego alpak, lam i ich hybryd utrzymywanych w Polsce. Przeprowadzone badania z tego zakresu, u tych gatunków zwierząt są innowacyjne, wykonane po raz pierwszy w naszym kraju i zapewne będą stanowić podwalinę do dalszych prac. Moje krytyczne uwagi odnoszą się jedynie do części pracy napisanej po polsku, które dotyczą głównie poprawności językowej oraz redakcyjnej i nie wpływają na jej ocenę merytoryczną.

W moim przekonaniu przedłożona do recenzji dysertacja charakteryzuje się oryginalnością i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Z uwagi na powyższe stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku: o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789 ze zm.) 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 wnioskuję do **Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach** o dopuszczenie Pani **mgr inż. Angeliki Mąsior** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. inż. Maciej Murawski, prof. URK