

**Prof. dr hab. Brygida Ślaska**  
Zakład Genetyki Ogólnej i Molekularnej  
Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, dn. 06.06.2019 r.

## Ocena

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Miszczak**  
**pt.: „Opracowanie metod identyfikacji gatunkowej i osobniczej psów (*Canis familiaris*) w oparciu o analizę mtDNA oraz mikrosatelitarnego DNA” wykonanej**  
**pod kierunkiem naukowym dr hab. Anny Radko prof. IZ PIB**

W naukach zootechnicznych badania z zakresu genetyki molekularnej obejmują szerokie spektrum analiz i realizowane są w kierunku charakterystyki i identyfikacji markerów wykorzystywanych w hodowli i produkcji zwierzęcej. Jednym z kierunków jest typowanie markerów wykorzystywanych w kontroli pochodzenia i identyfikacji osobniczej zwierząt. Pomimo wielu lat badań i dostępności paneli markerów mikrosatelitarnych zalecanych przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG), istnieje stała potrzeba ich weryfikacji. Wynika to z faktu różnego poziomu zmienności występującego w poszczególnych populacjach zwierząt tego samego gatunku, zamieszkujących różne obszary kuli ziemskiej. Dyskutowana tematyka nabiera szczególnego znaczenia w przypadku psów (*Canis lupus familiaris*), które ewoluowały poprzez wzajemne, korzystne relacje z człowiekiem. W ostatnich stuleciach ludzie prowadzili kierunkową selekcję psów, tym samym powstały rasy naśladujące ludzkie zachowania, jak też wspierające potrzeby człowieka. Psy hodowano również mając na celu uzyskanie pożądanych cech fenotypowych. W wyniku tych działań wyhodowano ponad 400 współczesnych ras, różniących się między sobą wielkością, kształtem czaszki, umaszczeniem, strukturą włosa *etc.* Wysoki poziom zmienności międzyrasowej jest jednym z powodów stałych modyfikacji składu markerów w panelach mikrosatelitarnych wykorzystywanych w kontroli pochodzenia proponowanych przez ISAG. Ponadto w ostatnich latach wzrosło wykorzystanie genetyki molekularnej w kryminalistyce i sądownictwie. Dotyczy to m.in. identyfikacji osobniczej materiału biologicznego psów występującego na miejscu zdarzenia. Z uwagi na bliskie relacje psów i ludzi, dzielących wspólną przestrzeń życiową i źródła żywności, niejednokrotnie materiał biologiczny psów staje się dowodem poszlakowym w sprawach karnych. Ze względu na

ogromne zróżnicowanie fenotypowe i genetyczne między rasami psów, niezbędne jest uwzględnienie w panelach sekwencji mikrosatelitarnych markerów wysoce polimorficznych we wszystkich rasach. Opisane sytuacje wymuszają stałą weryfikację i modyfikacje składu multipleksów opracowanych dla psów, dlatego uważam, że tematyka rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Miszczak jest aktualna i wartościowa a wybór tematu – trafny i w pełni uzasadniony.

### **Charakterystyka rozprawy doktorskiej**

Oceniana praca została przygotowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla klasycznej rozprawy naukowej. Liczy ona 86 stron, na których zawarto 17 tabel i 15 rysunków. Opracowanie ma przejrzystą strukturę i układ typowy dla eksperymentalnych rozpraw doktorskich i składa się z pięciu głównych rozdziałów: *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiał i metody*, *Wyniki i ich omówienie* oraz *Wnioski*. W pracy zawarto również wykaz cytowanego piśmiennictwa źródłowego, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis niektórych skrótów i oznaczeń. Zamieszczono w niej również zasadnie wyodrębniony rozdział *Materiały uzupełniające* zawierający 7 tabel odnoszących się do części wynikowej pracy. Dysertacja została napisana z zachowaniem właściwej sekwencji opisu, w którym zawarte informacje przedstawione są w sposób uporządkowany. Praca jest dobrze zredagowana a jej tytuł jest adekwatny do treści.

Rozprawa doktorska porusza, w sposób pełny i merytorycznie poprawny, zagadnienia z zakresu pełniejszego poznania przydatności do celów identyfikacyjnych podstawowego i uzupełniającego panelu sekwencji mikrosatelitarnych oraz analizy zastosowania do identyfikacji gatunkowej specyficznych dla psa domowego sekwencji mitochondrialnego genu 12S rRNA. Autorka w tym zakresie (m.in. str. 18, 44 i 76) używa pojęcia *sekwencji mtDNA rybosomalnego białka 12S*, nie jest to właściwe sformułowanie, ponieważ gen 12SrRNA nie koduje białka.

Wprowadzeniem do rozprawy jest liczący 21 stron komputeropisu *Wstęp* nakreślający, na tle bogatego piśmiennictwa, problematykę ściśle związaną z założonymi w pracy celami badań. Został on prawidłowo podzielony na podrozdziały, w których mgr inż. Małgorzata Miszczak, z wykorzystaniem właściwie dobranych artykułów naukowych scharakteryzowała dotychczasowe wyniki wykorzystania analizy DNA w identyfikacji zwierząt oraz wykazała zasadność wykorzystania zestawów sekwencji mikrosatelitarnych w kontroli pochodzenia zwierząt, jak też mtDNA w identyfikacji gatunkowej. W tej części Autorka omówiła również szczegółowo wykorzystanie metod biostatystycznych w analizie STR oraz parametry oceny zestawu markerów mikrosatelitarnych, których znajomość jest niezbędna do przeprowadzenia prawidłowej walidacji metody. W tym rozdziale mgr inż. Małgorzata Miszczak wykazała się bardzo dobrą orientacją w problematyce z zakresu tematyki podjętych badań. Szkoda, że przy tak szerokim spektrum badań Autorka nie podjęła się trudu wyodrębnienia hipotezy badawczej. Uzasadnienie podjętych badań mgr inż. Małgorzata Miszczak zamieściła w różnych fragmentach rozdziału *Wstęp*, jednak wydają się one zbyt ogólne, ale z pewnością ujmują najważniejsze problemy poruszane w pracy.

Właściwy dobór pozycji piśmiennictwa pozwolił Autorce wytyczyć sześć jasno sprecyzowanych i prawidłowo sformułowanych celów szczegółowych dysertacji, odzwierciedlających poszczególne etapy przeprowadzonych badań. Podkreślić należy wartość celów rozprawy, ponieważ ich realizacja wymagała od Autorki znajomości wielu metod i technik z zakresu biologii molekularnej, ale też bioinformatyki i biostatystyki.

W rozdziale *Materiał i metody* mgr inż. Małgorzata Miszczak przedstawiła uwzględniony w badaniach materiał zwierzęcy i zastosowane techniki molekularne, przeprowadzone analizy laboratoryjne i bioinformatyczne jak też biostatystyczne, na podstawie których przygotowała rozprawę. Autorka starannie zaplanowała i wykonała część doświadczalną pracy. Godnym uznania jest zgromadzony materiał biologiczny w postaci prób od 612 psów należących do dziewięciu ras, jak również liczba i opis analiz laboratoryjnych i biostatystycznych, w którym Autorka podaje pełną argumentację wykorzystanych narzędzi. Informacje zawarte w tym rozdziale upoważniają mnie do stwierdzenia, że doświadczenie zostało zaprojektowane właściwie, z uwzględnieniem prawidłowo wybranych metod badawczych. Należy również zwrócić uwagę na ogromną czaso- i pracochłonność zastosowanych technik. Materiał i metody opisane zostały w sposób precyzyjny i możliwy do odtworzenia. Dobór materiału, zakres analizowanych parametrów, metody badawcze i analityczne są właściwe w kontekście przyjętych celów badawczych.

W rozdziale *Wyniki i ich omówienie* Autorka przedstawiła uzyskane rezultaty z kolejnych etapów badań w uporządkowany sposób. Wyniki zestawiono w 18 tabelach (w tym materiały uzupełniające) i na 9 rysunkach i zaprezentowano w logiczny i konsekwentny sposób; ich układ jest przejrzysty i komunikatywny. Na uwagę w tym rozdziale zasługuje wysoka jakość i czytelność elektroforegramów z analizatora genetycznego zamieszczonych w pracy. Świadczą one o precyzyjnym wykonaniu doświadczeń. Wyniki rozprawy, o istotnym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym, odpowiedziały na postawione cele pracy. Autorka, uwzględniając dziewięć ras psów, z wykorzystaniem panelu STR złożonego z 18 markerów mikrosatelitarnych i genu amelogeniny, określiła 196 alleli, w tym 35 alleli prywatnych, których obecność świadczy o odrębności rasowej psów. Dane te posłużyły do przeprowadzenia analiz biostatystycznych, na podstawie których stwierdziła wysoki poziom bioróżnorodności w ośmiu, z dziewięciu objętych badaniami rasach psów.

W tym rozdziale na str. 48 Autorka stwierdza: *Najniższą na poziomie 4,2 alleli w locus odnotowano u rasy Golden Retriever, co może być spowodowane niewielką liczbą przebadanych osobników.* W mojej opinii 56 psów to nie jest mała liczba. Jak inaczej może Pani wytłumaczyć otrzymany wynik? Opisując relacje filogenetyczne psów na str. 52-53, w tym w tab. 10, Autorka myli pojęcie i interpretację dystansu genetycznego i podobieństwa genetycznego, co powinno zostać skorygowane.

Autorka w pracy przeprowadziła również walidację poszerzonego o trzy markery mikrosatelitarne zestawu STR i z jego wykorzystaniem objęła badaniami psy rasy wilczarz irlandzki. Podkreślić należy, że sposób określenia parametrów weryfikacyjnych dla zestawu 21 markerów mikrosatelitarnych DNA (próg analizy, liniowość, powtarzalność

i odtwarzalność uzyskiwanych wyników, balans heterozygotyczny oraz czułość i jakość otrzymywanych profili DNA) świadczą o ugruntowanej wiedzy Autorki i dużych umiejętnościach prowadzenia analiz laboratoryjnych i analitycznych. Autorka zweryfikowała przydatność zestawu 18 *loci* oraz genu amelogeniny do kontroli pochodzenia dziewięciu ras psów, zwracając uwagę na konieczność śledzenia zmian zachodzących w poszczególnych *loci* i oceny ich przydatności w badaniach identyfikacyjnych. Ponadto mgr inż. Małgorzata Miszczak stwierdziła możliwość wykorzystania zestawu 21 *loci* STR w rutynowych badaniach identyfikacji osobniczej oraz kontroli rodowodów psów. Proszę Autorkę o opinię na temat ewentualnej przewagi stosowania jednego z multipleksów: złożonego z 21 markerów STR lub złożonego z 18 *loci*. Interesującą częścią wyników jest praktyczne wykorzystanie opracowanych multipleksów w profilowaniu DNA dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości.

Interpretacja wyników na tle piśmiennictwa świadczy o należyтым przygotowaniu mgr inż. Małgorzaty Miszczak do problemu badawczego podjętego w pracy doktorskiej. Dyskusja jest zwięzła, merytoryczna i skoncentrowana wokół wyników. Autorka zacytowała 101 pozycji piśmiennictwa, z których ponad 95% to artykuły obcojęzyczne publikowane w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Oceniając treść merytoryczną tego rozdziału stwierdzam, że mgr inż. Małgorzata Miszczak wykazała się dobrą orientacją w piśmiennictwie naukowym dotyczącym problematyki badań oraz umiejętnością jego wykorzystania przy dyskusji własnych rezultatów. Lektura rozdziału skłania do stwierdzenia, że Autorka w pełni odpowiedziała na postawione cele pracy a opis wyników i ich dyskusja są kompletne.

Rozprawę kończy rozdział *Wnioski* uzasadniający otrzymane wyniki i odpowiadający na postawione cele pracy. Wnioski: 1, 4, 6 i 7 są wynikami, a nie wnioskami. Wniosek powinien odpowiadać na pytanie *co z tego wynika?* Takie uzasadnienie można znaleźć w opisie wyników, ale nie we wnioskach. Pozostałe wnioski są poprawne, tak w kontekście wyników, jak i w świetle dyskusji.

Moja ogólna ocena wartości merytorycznej pracy jest wysoka. W uzasadnieniu podkreślić należy szeroki zakres badań i fakt, że praca wnosi nowe wartości poznawcze i ma znaczenie praktyczne. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością planowania i przeprowadzenia eksperymentu badawczego oraz umiejętnością analizy uzyskanych wyników. Autorka podjęła się pracochłonnego zadania, w którym założone cele badań zostały w pełni zrealizowane.

Moja ocena strony technicznej i redakcyjnej rozprawy jest również wysoka. Praca została napisana poprawnym językiem, jest czytelna i logicznie skonstruowana.

Podkreślić należy, że drobne uwagi, które zawarłam w recenzji dotyczą głównie aspektów techniczno-redakcyjnych w żaden sposób nie umniejszają wysokiej wartości rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Miszczak.

## Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Miszczak, pt.: *Opracowanie metod identyfikacji gatunkowej i osobniczej psów (Canis familiaris) w oparciu o analizę mtDNA oraz mikrosatelitarnego DNA* **spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim** określone w Ustawie z dn. 14. marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr. 65 z 2003r., z późn. zm.), natomiast Autorka wykazała wszelkie umiejętności niezbędne dla otrzymania stopnia doktora nauki, a niniejsza rozprawa może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika. Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego **wniosek o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Miszczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Bożena Sulek