

Streszczenie

W dzisiejszych czasach prowadzone są intensywne badania, których celem jest poprawa jakości mięsa wieprzowego. Jakość mięsa to zespół cech decydujących o jego wartości użytkowej oraz cech precyzujących jego wartość odżywczą dla konsumenta. Jednak, dla współczesnego konsumenta spośród licznych parametrów charakteryzujących mięso, najważniejsze są: barwa, kruchość, soczystość oraz smak i zapach czyli parametry organoleptyczne. Przyczyny powyższego zjawiska posiadają wieloczynnikowy charakter i obejmują zarówno aspekty środowiskowe, jak i genetyczne. Ich poznanie pod kątem asocjacji z jakością mięsa wieprzowego może w przyszłości umożliwić selekcję zwierząt o preferowanym wariacie genetycznym, których mięso charakteryzować się będzie korzystniejszymi parametrami jakości mięsa. Jest to priorytetowe zagadnienie dla hodowców i producentów trzody chlewnej. W tym kontekście analiza wariantów polimorficznych genu *HK2* w aspekcie cech użytkowych świń i parametrów jakości mięsa wieprzowego można uznać za uzasadnione z powodu biologicznej roli w regulacji procesu glikolizy, a także z uwagi na charakter molekularny mechanizmu, wskazującego na zmienność kodowanych białek.

Cel pracy. Celem niniejszej pracy była detekcja polimorfizmów w genie kodującym heksokinazę 2 (*HK2*) u świni domowej (łac. *Sus scrofa domestica*) oraz ustalenie potencjalnych zależności pomiędzy genotypami analizowanych fragmentów genu a cechami użytkowymi świń (tucznymi i rzeźnymi) oraz wybranymi parametrami jakości mięsa.

Materiały i metody. Badaniami objęto 722 osobników 3 ras świń: polska biała zwisloucha, wielka biała polska i puławska. Zwierzęta utrzymywano w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh) Instytutu Zootechniki PIB w Balicach. Warunki utrzymania wszystkich osobników były takie same. Genomowe DNA wyizolowano z tkanki mięśnia najdłuższego grzbietu przy użyciu zestawów firmy A&A Biotechnology (Polska): Sherlock AX oraz Genomic Mini. W pierwszym etapie badań eksony w genie *HK2* zostały poddane analizie za pomocą metody PCR-HRM. Wytypowane za pomocą tej techniki fragmenty amplifikacji PCR, a otrzymane produkty zsekwencjonowano metodą Sangera. W analizowanych fragmentach genu *HK2* wykazano obecność 15 mutacji. Dla dwóch zidentyfikowanych polimorfizmów, zmian typu SNP znajdujących się: w regionie splicingowym eksonu 7 (g.68177052A>G) oraz w eksonie 12 (g.68167661C>T) opracowano odpowiednią metodę molekularną (odpowiednio PCR-RFLP oraz PCR-ACRS) pozwalającą na oznaczenie frekwencji wybranych mutacji na większej grupie zwierząt. Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu pakietu SAS/STAT.

Wyniki. Uzyskane frekwencje wariantów polimorficznych analizowanego genu pokazują, iż występuje zmienność w obrębie genu *HK2*. Zidentyfikowane polimorfizmy wykazują istotną asocjację z wybranymi cechami tucznymi, rzeźnymi oraz jakością mięsa u świń różnych ras.

Wnioski. Gen *HK2* może kandydować do miana genu markera genetycznego wybranych cech tucznych.

Katarzyna Woźniak
20.05.2022

Abstract

Nowadays, intensive research is conducted to improve the quality of pork. The quality of meat is a set of features that determine its utility value and features that determine its nutritional value for a consumer. However, for a modern consumer, among the numerous parameters that characterise meat, the most important are: colour, tenderness, juiciness, as well as taste and smell, i.e. organoleptic parameters. The reasons for the above phenomenon are multi-faceted and include both environmental and genetic aspects. Understanding them in terms of association with the quality of pork may, in the future, enable the selection of animals with a preferred genetic variant, whose meat will be characterised by more favourable meat quality parameters. This is a priority issue for pig farmers and producers. In this context, the analysis of polymorphic variants of the *HK2* gene in terms of the performance characteristics of pigs and pork quality parameters can be considered justified due to the biological role in the regulation of the glycolysis process, as well as due to the molecular nature of the mechanism indicating the variability of the encoded proteins.

The aim of this dissertation. The aim of this study was to detect polymorphisms in the gene encoding hexokinase 2 (*HK2*) in domestic pig (*Sus scrofa domestica*) and to determine the potential relationships between the genotypes of the analysed gene fragments and the performance characteristics of pigs (fattening and slaughter) and selected parameters of meat quality.

Materials and methods. The research covered 722 pigs of 3 breeds: Polish Landrace, Polish Large White and native breed Puławska. The animals were kept at Pig Tests Stations (National Research Institute of Animal Production) in Balice, Poland. Feeding and housing conditions were consistent for all animals. Genomic DNA was isolated from *longissimus dorsi* muscle with the use of A&A Biotechnology (Poland) sets: Sherlock AX and Genomic Mini. In the first phase of the research, exons in the gene *HK2* had to go through PCR-HRM method. Fragments of PCR amplification selected by this technique, and the obtained products were sequenced using the Sanger method. 15 mutations were found in the analysed *HK2* gene fragments. For two identified polymorphisms, SNP type located in the splicing region of exon 7 (g.68177052A> G) and in exon 12 (g.68167661C> T), an appropriate molecular method was developed (PCR-RFLP and PCR-ACRS, respectively) allowing to determine the frequency of selected mutations on a larger group of animals. Statistical analysis was performed using the SAS / STAT software.

Results. The obtained frequencies of the polymorphic variants of the analysed gene show that there is variability within the *HK2* gene. The identified polymorphisms show a significant association with selected fattening and slaughter characteristics as well as meat quality in pigs of various breeds.

Conclusions. The *HK2* gene may be a candidate gene for a genetic marker gene of selected fattening traits.

Katarzyna Woźniak
20.05.2022r.

Jastrzębiec 29 czerwca 2022r.

Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Woźniak
pt. **“ ANALIZA STRUKTURALNA GENU HK2
W ASPEKCIE CECH UŻYTKOWYCH ŚWIŃ
ORAZ PARAMETRÓW JAKOŚCI MIĘSA WIEPRZOWEGO”**

wykonanej
w Katedrze Genetyki Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego
w Szczecinie

pod kierunkiem promotora
dr hab. inż. Arkadiusza Termana, prof. ZUT
promotora pomocniczego
dr hab. inż. Katarzyny Ropki-Molik, prof. IZ

W Polsce wieprzowina jest jednym z najczęściej spożywanych rodzajów mięs, jej konsumpcja wynosi ok. 40 kg rocznie w przeliczeniu na jednego mieszkańca, co jednocześnie wynosi od 60-70 % ogólnego spożycia mięsa wg GUS w Polsce. Wiele elementów decyduje o tym, że mięso w tym wieprzowina jest i będzie jeszcze przez wiele lat bardzo ważnym składnikiem diety w wielu krajach świata jako źródło białka witamin oraz niezbędnych aminokwasów. Mimo pojawiających się opinii o niekorzystnym wpływie na zdrowie człowieka zwłaszcza w kontekście rozwoju chorób metabolicznych, w tym układu krążenia, ponieważ może stymulować wzrost poziomu tzw. „złego cholesterolu” (frakcja LDL), to wciąż racjonalne odżywianie nie zakłada całkowitej rezygnacji ze spożywania mięsa. Tym niemniej, aby ograniczyć negatywny wpływ spożywania mięsa prowadzona jest stała praca hodowlana w celu poprawy jego jakości, uwzględniając też aspekt prozdrowotny. Dzięki nowym technologiom molekularnym możliwe jest dokładna weryfikacja podłoża genetycznego różnych cech użytkowych zwierząt w tym jakości mięsa. Tak szeroka analiza obejmująca poziom genomu pozwala identyfikować regiony genomu, w których zlokalizowane są loci cech ilościowych QTL sprzężonych z pożądanym fenotypem zwierząt

oraz polimorfizmy wskazując tzw. geny kandydujące. Właściwa selekcja z wykorzystaniem markerów genetycznych oraz narzędzi genetyki molekularnej umożliwia w dalej w sposób precyzyjny określić i wyeliminować z hodowli trzody chlewnej niepożądane warianty genów obniżających jakość mięsa. Przykładowym była eliminacja wariantu genu RYR1, która zmniejszyła istotnie częstość występowania mięsa wadliwego typu PSE.

Tym niemniej, poligeniczny charakter wielu cech użytkowych świń powoduje, że należą do cech nisko odziedziczalnych, co ogranicza wykorzystanie w selekcji pojedynczych markerów genetycznych. Stałe doskonalenie świń, w dużej mierze odbywa się w oparciu metody genetyki populacji, które uwzględniają również parametry jakości mięsa, w tym takich jak: kwasowość, wodochłonność, barwa i przewodność elektryczną oraz zawartość tłuszczu śródmięśniowego, który decyduje o wartości wieprzowiny w procesach przetwórczych i walorach kulinarnych. Mimo to i prowadzonych szeroko badań molekularnych wciąż nie otrzymaliśmy wyczerpującej odpowiedzi na wiele kwestii dotyczących genetycznego podłoża wielu cech jak i interakcji genotypu z czynnikami środowiskowymi. Dlatego też, kompleksowe analizy genomiczne i transkryptomiczne, w szczególności uwzględniające weryfikację polimorfizmu licznych kluczowych genów uczestniczących w przemianach metabolicznych zachodzących w organizmie zwierząt, są niezbędne nie tylko do charakterystyki zmian strukturalnych i funkcjonalnych w komórkach mięśni, ale też opracowania skutecznych optymalnych systemów żywienia zwierząt odpowiadających na zapotrzebowanie organizmu jak i gwarantujących otrzymanie produktu o pożądanych właściwościach.

Pani **mgr Katarzyna Woźniak** w prezentowanej rozprawie doktorskiej podjęła się szczegółowej analizy polimorfizmu jednego z genów, który można uznać za gen kandydujący, genu kodującego enzym heksokinazę 2 (HK2) u świni domowej (*Sus scrofa domestica*) celem ustalenia potencjalnych zależności pomiędzy polimorfizmem tego genu a cechami użytkowymi świń (tucznymi i rzeźnymi) oraz wybranymi parametrami jakości mięsa. Rozprawa doktorska została przygotowana w formie monografii, w skład której wchodzi 7 rozdziałów takich jak: Wstęp, Przegląd literatury, Cel Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Streszczenia w języku polskim i angielskim, Suplement, Spis Rycin, Tabel oraz Bibliografię.

Praca liczy 96 strony tekstu, 106 pozycji literaturowych, 16 stron wprowadzenia obejmującego przegląd literaturowy, 1 stronicowy szczegółowo opisany cel pracy, 16 stron opisu materiału i zastosowanych metod badawczych, 21 stron opisu uzyskanych wyników, 7 stron dyskusji oraz 1 stronę wniosków. Ponadto do pracy dołączyła dodatkowe informacje

uzupełniające w postaci obszernego suplementu (12 stron) zawierającego ryciny przedstawiające wyniki identyfikacji polimorfizmów. Przedstawiona praca jest zgodna z wymogami formalnymi stawianymi rozprawie doktorskiej,

Ocena Merytoryczna

1. *Oryginalność tematyki i wartość poznawcza pracy*

Prezentowana praca podejmuje temat, który jest wciąż aktualny wymagający dokładnej charakterystyki. Ponadto praca zawiera właściwie sprecyzowane cele badawcze i hipotezy. Prezentowane badania, metody i uzyskane wyniki zostały omówione skrupulatnie, uwzględniając aktualne dane literaturowe z przedmiotowego obszaru wiedzy. Poza tym że Doktorantka w sposób wnikliwy uzasadniła konieczność podjętych badań, we wstępie zdefiniowała również syntetycznie kwestie dotyczące cech jakości mięsa wpływających na wartość technologiczną i kulinarną mięsa. Prezentując obecny stan wiedzy podkreśliła istotę badań wykorzystujących narzędzia molekularne na przykładzie genu wrażliwości na stres RYR1. Co jest oczywiście słuszne biorąc pod uwagę znaczenie i wykorzystanie testowania stad hodowlanych pod kątem niepożądanego wariantu genu RYR1. Tym niemniej można byłoby dokonać szerszego przeglądu zidentyfikowanych mutacji przyczynowych wybranych innych genów kandydujących dla cech jakości mięsa. Z punktu widzenia jakości mięsa Autorka podkreśliła i opisała znaczenie glikolizy jako jednego z istotnych procesów metabolicznych związany z przemianami zachodzącymi *post mortem*, jako procesu decydującego o właściwościach fizykochemicznych mięsa, oraz wskazała istotną rolę heksokinaz, enzymów uczestniczących w tym procesie. Przedstawiony przegląd piśmiennictwa w mojej ocenie nie tylko w pełni przekonuje o zasadności podjętego tematu badań, który wciąż wymaga dokładnego scharakteryzowania w kontekście wpływu polimorfizmu wybranych genów na cechy użytkowe świń, ale też informuje czytelnika o obecnym stanie wiedzy.

Zdefiniowanie celów/ hipotez badawczych

Doktorantka w sposób jasny i adekwatny zdefiniowała cel pracy, którym była identyfikacja polimorfizmów w genie kodującym heksokinazę 2 (*HK2*) u świni domowej (*Sus scrofa domestica*) oraz charakterystyka potencjalnych zależności pomiędzy genotypami opartym na zidentyfikowanych polimorfizmach genu a cechami użytkowymi świń (tucznymi i rzeźnymi) oraz wybranymi parametrami jakości mięsa, oraz hipotezę badawczą: „W sekwencji genu kodującego heksokinazę 2 występują zamiany polimorficzne, które w istotny sposób mogą wpłynąć na cechy fenotypowe badanych osobników.”

Zakres i metody badań

Jako materiał do badań w prezentowanej pracy Autorka wybrała 722 loszki trzech ras: wielka biała polska (wbp) i polska biała zwisłoucha (pbz) oraz rasy puławskiej jako rasy zachowawczej. Ocena zwierząt pod kątem cech użytkowych była przeprowadzona zgodnie z metodyką stacyjną dla trzody chlewnej, obejmującą parametry jakości mięsa oraz wyniki użytkowości tucznej i rzeźnej w Stacji Kontroli Użytkowości Trzody Chlewnej (SKURTCh) zlokalizowanej w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Chorzelowie. W trakcie oceny stacyjne pobierano też próbki mięśnia do dalszych badań, co nie wymaga dodatkowej zgody Komisji Etycznej ds Doświadczeń na Zwierzętach. Dalsze procedury dotyczące izolacji DNA oraz analiz identyfikujących zmiany w sekwencji w eksonach 1-18 genu HK2 w oparciu o genotypowanie metodą PCR-HRM i sekwencjonowanie metodą Sanger, są opisane w sposób skrupulatny i klarowny. Doktorantka opracowała metodycznie odpowiednie parametry dla testów molekularnych PCR-RFLP oraz PCR-ACRS wykorzystanych do ustalenia frekwencji wybranych polimorfizmów na większej grupie zwierząt. Uzyskane wyniki zostały też poddane odpowiedniej analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu SAS 8.02 z zastosowaniem właściwych dla tych analiz testów.

Wyniki zrealizowanych badań

Na uwagę zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych przez Doktorantkę analiz molekularnych obejmujących różne techniki molekularne oraz analizy jakościowe DNA przeprowadzone w 18 fragmentach eksonów genu HK2. Dzięki temu doktorantka zidentyfikowała 12 polimorfizmów typu SNP oraz 3 polimorfizmy typu insercja-delecja, w obrębie 5 eksonów, 2 intronów oraz regionu 3'UTR genu HK2. Po dalszej weryfikacji Doktorantka wytypowała 2 polimorfizmy jako najbardziej obiecujące. Pierwszy był synonimiczny, ale znajdujący się w regionie splicingowym eksonu 7 (*g.68177052A>G* czy *tu nie powinno być T>C*) przez co potencjalnie mogący mieć wpływ na proces transkrypcji a tym samym regulację ekspresji genu HK2. Drugi wybrany polimorfizm był zlokalizowany w eksonie 12, niesynonimiczny (*g.68167661C>T* czy *tu nie powinno być G>T*) skutkujący zmianą w sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym z waliny na metioninę. Analiza wybranych polimorfizmów pozwoliła Doktorantce też określić zależności zmiany w częstości alleli genu HK2 u badanych ras świń.

Doktorantka wykazała, że w przypadku analizy I polimorfizmu najczęściej występującym genotypem, był genotyp homozygotyczny TT (79%) podczas gdy heterozygoty TC stanowiły 18% całej badanej populacji. W szczególności istotną

przewagę homozygot TT zaobserwowano w przypadku rasy wbp i pbz, genotyp występował odpowiednio w 95% i 83%, genotyp TC – 5% i 16%). Natomiast wśród osobników rasy puławskiej genotypy TT występowały w 57% a TC 34%. Ponadto, stwierdzono, że rasy pbz oraz puławska znajdowały się w stanie równowagi Hardy-Weinberga. Analiza II polimorfizmu wykazała, że Genotyp homozygotyczny GG (frekwencja: 0,64) występował dwa razy częściej niż genotyp heterozygotyczny GA (frekwencja: 0,32) u wszystkich ras łącznie. Najrzadziej występującym genotypem był układ homozygotyczny AA, nie występował w ogóle w rasie wbp, najwyższą frekwencję zidentyfikowano w rasie puławska jako zachowawcze gdzie wynosił 11%, rozkład pozostałych genotypów GG oraz GA był bardzo zbliżony i wynosił odpowiednio 47 oraz 42%. Stwierdzono też, podobnie że grupa świń reprezentująca rasę wbp nie znajdowała się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga.

Cechy a polimorfizm

Przeprowadzone przez Doktorantkę analizy statystyczne wykazały, że I z polimorfizmów był istotnie związany z średnią grubością słoniny z pięciu pomiarów u rasy pbz ($p \leq 0,05$), u rasy puławskiej ($p \leq 0,05$) oraz u osobników wszystkich ras analizowanych łącznie ($p \leq 0,01$). U świń rasy pbz najmniejszą grubością słoniny charakteryzowały się osobniki heterozygotyczne TC (1,26 cm), natomiast u świń rasy puławskiej najmniejszą grubość słoniny można było zaobserwować u osobników homozygotycznych TT (1,58 cm). We wszystkich przypadkach największą wartością średniej grubości słoniny charakteryzowały się osobniki homozygotyczne CC.

Co jest interesujące, że na podstawie uzyskanych przez Doktorantkę wyników można hipotetycznie założyć, że efektem presji selekcyjnej na niską grubość słoniny i wysoką mięsność, mogła być preferencja selekcyjna obserwowana w formie najwyższej frekwencji genotypu TT, i na odwrót najniższa mięsność występowała u osobników o genotypie CC, który to wykazywał też najniższą frekwencję w badanej grupie zwierząt szczególności ras wbp i pbz. Podobnie sugestywnym jest wynik wskazujący, że osobniki o najczęściej występującym genotypie TT charakteryzowały się największymi przyrostami. Co jest w pewnym sensie oczekiwanym efektem selekcji zwierząt. Podobne spostrzeżenia dotyczyły zużycia paszy, które najwyższe było u zwierząt o genotypie CC - najrzadziej obserwowanym genotypem u wszystkich ras w szczególności rasy wbp i pbz.

Podobnie wyniki dotyczące najniższej wodochłonności, która była obserwowana u osobników o genotypie o najwyższej frekwencji, mogą stać się pomocne z punktu widzenia oczekiwanych efektów prowadzonej selekcji świń.

Powyższe obserwacje są bardzo interesujące przez co zasługują na uwagę w kontekście wyboru markerów do selekcji. Interesującym byłoby zestawienie obydwu genotypów razem, dla sporządzenia porównań kombinowanych genotypów. Czy Doktorantka podejmowała takie próby? Pobrany materiał w postaci wycinków mięśnia mógł również posłużyć do analiz weryfikujących poziom ekspresji badanych genów w zależności od zidentyfikowanych mutacji. Takie analizy mogłyby dostarczyć szerszej wiedzy dotyczącej oddziaływania i znaczenie analizowanych polimorfizmów na i inne geny. Czy Doktorantka wykonywała takie analizy czy są one planowane w przyszłych badaniach?

W podsumowaniu swojej pracy Doktorantka jednak krytycznie zauważa, że przeprowadzone badania wskazują na brak możliwości bezpośredniego wykorzystania badanych mutacji genów, z czym trudno się nie zgodzić. Zwłaszcza, że do selekcji wspieranej markerami konieczne są dokładne badania walidacyjne. Tym niemniej nierówna frekwencja genotypów, może wskazywać, że geny te były pod presją selekcyjną. Co może być przesłanką do bardziej kompleksowych badań tych genów, jako kandydujących do roli markerów związanych poprawą jakości wieprzowiny.

Przedstawione powyżej opisane przez Doktorantkę obserwacje, są tylko częścią bardzo szczegółowo analizowanego tematu prezentowanej rozprawy. Należy stwierdzić, że Autorka wykazała się dużą skrupulatnością i pracowitością zarówno wykonując analizy molekularne jak i analizy statystyczne oraz adekwatnie omawiając wyniki w kontekście danych literaturowych.

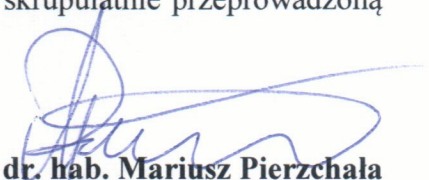
Wysoko oceniając wartość przedstawionej pracy stwierdzam, że są pewne elementy, które wymagałyby korekty, bądź bardziej klarownego wyjaśnienia:

1. Czy zidentyfikowane przez autorkę mutacje były nowymi, czy pokrywały się z mutacjami już zidentyfikowanymi w bazie GeneBank?
2. Czy autorka podejmowała próbę zestawienia haplotypów analizowanych mutacji i ich wpływu na cechy?
3. Do badań molekularnych wykorzystywane były próbki pobrane poubojowo z mięśnia najdłuższego grzbietu, czy w związku z tym były podejmowane próby oceny poziomu ekspresji *HK2*.
4. Czy był analizowany wpływ polimorfizmów, które zmieniały sekwencje aminokwasów, typu in-del, czy powodujące zmianę sposobu składania genów, na ekspresję innych genów?
5. Biorąc pod uwagę wyniki przedstawione na rycinie 2. „Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 7 eksonu genu *HK2*”, mam pytanie czy w opisie

polimorfizmu g.68177052A>G nie powinno być jednak T>C? Czy podobnie też na rycinie 8. „Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 12 eksonu genu HK2 (g.68167661C>T)” nie powinno być G>T?

Wymienione uwagi nie umniejszają wartości rozprawy i prezentowanych w niej wyników. Niniejszą pracę oceniam bardzo wysoko, zarówno od strony merytorycznej jak i formy.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że niniejsza praca doktorska spełnia wymogi art.13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 56 poz. 595 z 2003 r. z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczeniu mgr Katarzyna Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na duży zakres zrealizowanych badań, dokładnie i skrupulatnie przeprowadzoną analizę wnoszę o wyróżnienie niniejszej rozprawy.



Prof. dr. hab. Mariusz Pierzchała

UCHWAŁA NR 255
Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 10 października 2022 r.

w sprawie nadania mgr Katarzynie Woźniak
stopnia doktora

Na podstawie art. 179 ust. 1 i 3 pkt 2b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.) w związku z art. 14 ust. 2 pkt 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, z późn. zm.) uchwala się, co następuje:

§ 1.

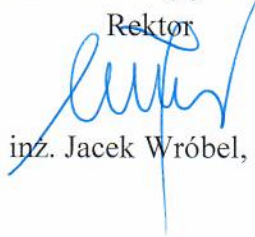
Senat Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie nadaje mgr Katarzynie Woźniak stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

§ 2.

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodniczący Senatu

Rektor


dr hab. inż. Jacek Wróbel, prof. ZUT



Bydgoszcz, dnia 12.07.2022

dr hab. inż. Beata Anna Sitkowska, prof. PBS
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Woźniak

**pt. „Analiza strukturalna genu HK2 w aspekcie cech użytkowych świń oraz parametrów
jakości mięsa wieprzowego”**

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Woźniak została wykonana na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, w Katedrze Genetyki Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, pod kierunkiem promotora Pana dr hab. inż. Arkadiusza Termiana, prof. ZUT oraz promotora pomocniczego Pani dr hab. inż. Katarzyny Ropki-Molik, prof. IZ z Instytutu Zootechniki, Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach.

Podstawą formalną wykonania przeze mnie recenzji jest uchwała Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z dnia 2 czerwca 2022 roku.

Rozprawa doktorska napisana jest w formie jednolitej monografii. Przy ocenie rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Woźniak uwzględniono zasadność podjęcia tematu, w dalszej kolejności jakość formalną, metodologiczną oraz merytoryczną pracy. Ocenie poddano problem badawczy, układ pracy, cel i zaproponowaną hipotezę, przyjętą metodykę badań oraz ujęcie problemu badawczego i jego prezentację. W recenzji przedstawiono również moje uwagi oraz sugestie, które umieściłam przy ocenie każdej części pracy.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr Katarzyny Woźniak napisana jest w języku polskim, jest rozprawą liczącą 99 stron. Układ pracy oraz podział treści jest raczej tradycyjny i z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń. Praca zawiera kolejno: *Spis treści* (strony 3-4), *Wykaz skrótów* (strony 5-8), *Wstęp* (strona 9), *Przegląd literatury* (strony 10-25), *Cel pracy* (strona 26), *Materiał i metody* (strony 27-42), *Wyniki* (strony 43-63), *Dyskusję* (strony 64-70), *Podsumowanie i wnioski* (strona 71), *Streszczenie* (strony 72-73), *Abstract* (strony 74-75), *Suplement* (strony 76-83), *Spis tabel* (strony 84-85), *Spis rycin* (strony 86-87), *Bibliografię* (strony 88-99). Rozprawa zawiera 106 pozycji literatury, 29 tabel oraz 20 rycin. Szata graficzna nie budzi zastrzeżeń.

Ocena merytoryczna pracy

Oryginalność i zasadność podjętego tematu

Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Woźniak wpisuje się w obszar dyscypliny zootechnika i rybactwo. Podjęte badania dotyczą ważnego dla hodowców trzody chlewnej oraz konsumentów aspektu – cech użytkowych świń oraz parametrów jakości mięsa.

Podjęte przez Doktorantkę badania uważam za aktualne i uzasadnione z naukowego punktu widzenia.

Uzasadnienie badań

Uzasadnienie podjętych badań przedstawiono w rozdziałach Wstęp oraz Przegląd piśmiennictwa. Liczą one 16 stron, z czego Przegląd literatury podzielony został na 4 podrozdziały, z których 1 zawiera jeszcze 5 podrozdziałów. W rozdziale tym Autorka wprowadza czytelnika w tematykę badawczą, omawia zagadnienia związane z jakością mięsa, z procesem glikolizy, przystępnie opisuje kluczowy w badaniach enzym heksokinazę oraz gen *HK2*. Całość poparta jest prawidłowo dobranymi pozycjami piśmiennictwa, co dowodzi znajomości zagadnienia przez Autorkę. Do tej części pracy mam kilka drobnych uwag, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, ale ich uwzględnienie może poprawić czytelność dysertacji:

-- Doktorantka w pierwszym akapicie przeglądu literatury powołuje się na normy ISO, może warto dodać ich pełne nazwy w spisie piśmiennictwa;

- Przed oddaniem pracy do druku w czasopiśmie naukowym warto przeredagować bądź skrócić niektóre zdania, które w obecnej formie są trudne do zrozumienia, np. na stronie 17: „pH 45 minut po uboju w mięśniu najdłuższym grzbietu pomiar wykonywany jest między ostatnim kręgiem piersiowym i pierwszym kręgiem lędźwiowym po odsłonięciu warstwy tłuszczu podskórnego i dokonaniu nacięcia mięśnia na głębokość około 2 cm w głąb i całkowitym wbiciu

elektrody szklanej w miejscu nacięcia.”. Zdania na stronie 17: „Gen *RYS1* zbudowany jest z 28080 par zasad i został zmapowany w chromosomie 6p11-6q21.”;

- Na stronie 19 pojawia się niezrozumiały zapis (EC 2.7.1.1), „Pierwszy etap glikolizy katalizowany jest przez enzym heksokinazę (EC 2.7.1.1), która fosforyluje glukozę do glukozo-6-fosforanu.”;

- W odwołaniu do Ryciny 5 wskazano źródło pochodzące ze strony NCBI, sugeruję dodać link do konkretnej strony w spisie piśmiennictwa;

- Na stronie 24 proszę o sprawdzenie podanego numeru *HK2* (ENSSSCG00000008261), wydaje mi się, że powinno być: ENSSSCG00055013579 oraz numeru wariantu HK2-202 powinien być: ENSSSCT00055026781.1, natomiast jest: ENSSSCG00055013579.1. *HK2* ENSSSCG00055013579 ma 2 warianty splicingowe, natomiast ENSSSCG00000008261 tylko jeden. Może warto również zaznaczyć z jakiej bazy pochodzą te oznaczenia i podać odwołanie do strony ENSEMBL;

- Na stronie 25 sugeruję przeredagować zdanie: „Transkrypcja genu *HK2* może być regulowana insuliną; a mianowicie wykazano, że insulina podnosi ekspresję tego genu (Tan i Miyamoto 2015, Jun i in. 2006, Jun i in. 2012).”

Cel badań

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła cel i hipotezę badawczą. Określono cel pracy: „Celem niniejszych badań była detekcja polimorfizmów w genie kodującym heksokinazę 2 (*HK2*) u świni domowej (*Sus scrofa domestica*) oraz ustalenie potencjalnych zależności pomiędzy genotypami analizowanych fragmentów genu a cechami użytkowymi świń (tucznymi i rzeźnymi) oraz wybranymi parametrami jakości mięsa.”

Hipoteza badawcza pracy sformułowana została rzeczowo i zwięźle: „W sekwencji genu kodującego heksokinazę 2 występują zamiany polimorficzne, które w istotny sposób mogą wpłynąć na cechy fenotypowe badanych osobników.”

- Sugeruję przeredagować hipotezę badawczą, moim zdaniem w obecnej formie jest ona zbyt ogólna (warto wyjaśnić jakie „zamiany” autorka ma na myśli oraz jakich cech fenotypowych dotyczy badanie).

Metodyka badań

Dla zrealizowania założeń rozprawy doktorskiej wykorzystano materiał badawczy (nazwany doświadczalnym) pochodzący od 722 loszek należących do trzech ras. Rozdział ten

zredagowano z dbałością o poprawność językową oraz szczegóły przeprowadzonych analiz molekularnych, co oceniam bardzo wysoko i gratuluję pracy włożonej w tak przemyślaną analizę.

W rozdziale Materiał i metody brakuje mi kilku istotnych informacji:

- W jakich latach prowadzone były badania? Gdzie wykonywane były analizy molekularne?

- Odwołanie do Ryciny 7 na stronie 30, w obecnej formie brzmi: „Analiza asocjacji zidentyfikowanych polimorfizmów w genie *HK2* obejmowała następujące cechy (Rycina 7):” moim zdaniem należy te cechy krótko opisać w tekście, podobna uwaga odnosi się do innych opisów umieszczonych w dysertacji;

- Na stronie 31 pod koniec 3 akapitu „wodochłonność (zgodnie z metodyką Grausa-Hamma) – zabrakło roku publikacji, na którą powołuje się doktorantka;

- Sugeruję wyróżnić osobnym podrozdziałem analizy genetyczne, przed podrozdziałem 4.2. Izolacja genomowego DNA (strona 31);

- Na stronie 32 znajduje się zdanie: „Sekwencje nukleotydowe użytych starterów, temperatury ich przyłączania oraz długości otrzymanych produktów PCR zamieszczono w Tabeli 5.” Moim zdaniem chodziło o tabelę 8;

- Kolejna uwaga dotycząca odwołania do tabel na stronie 37, cytuję: „Do amplifikacji poszczególnych fragmentów genu użyto starterów flankujących fragmenty genu przedstawione w Tabeli 3. Do uzyskania powyższych amplikonów wykorzystano polimerazę AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems, Polska). Skład oraz przebieg reakcji przedstawiono w Tabeli 4 oraz Tabeli 5.” Tabela 3 zawiera skład poszczególnych pasz zastosowanych w żywieniu świń, Tabela 4 przedstawia parametry pokarmowe pasz;

- Na stronie 39 w Tabeli 12 przy eksonie 7 genu *HK2* nie podano sekwencji starterów, a tylko ich umowne oznaczenia: F1 i R1;

- Analiza statystyczna – strona 42 – nie wspomniano, że szacowano miary położenia i zmienności, a przedstawiono je w tabelach 21-23;

- Co zostało uwzględnione w modelu statystycznym rok czy dzień uboju? W metodyce podany jest rok, w tabelach dzień. W modelu statystycznym brakuje poziomów uwzględnionych czynników.

Wyniki i Dyskusja

Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione i udokumentowane w formie tabel oraz rycin, opis wyników zaprezentowano na 20 stronach, a dyskusja została przedstawiona na 6 stronach.

Uwagi dotyczące wyników:

- W tabelach 16, 17 i 18 autorka drugą kolumnę nazwała „Nazwa mutacji”, ponieważ zawiera ona kilka informacji proponuję zmienić jej nazwę;
- W tabelach 19-20 przedstawiono frekwencje genotypów oraz alleli analizowanych polimorfizmów. Dlaczego nazwa PUŁAWSKA zapisana jest z wielkich liter? Dlaczego ostatni wiersz nazwany został SUMA, proszę o doprecyzowanie.
- Moje wątpliwości dotyczą również tabel od 21 do 28, ponieważ ich układ jest podobny uwagi przedstawiam zbiorczo:
 - Powtarzają się sformułowania „Istotności GLM”, moim zdaniem nie jest to właściwa forma;
 - Proszę sprawdzić czy oznaczenia istotności oraz przypisy pod tabelami są prawidłowe;
 - Wykazane istotności w poziomie cech w przypadku rasy puławskiej prawdopodobnie mogą zostać wyjaśnione przez frekwencję poszczególnych genotypów. W grupach zwierząt ras wbp oraz pbz zdecydowanie dominował tylko jeden wariant allelu;
 - W tabelach 21-23 zapis „istotności GLM” jest identyczny jak w tabelach 24-28, uważam że można go pominąć, lub dla lepszej interpretacji zastąpić podając wartości współczynnika p ;
 - Czy w tabelach 21-23 „Dane przedstawiono w postaci średnich LSM”? Tak sugeruje podpis pod tabelami, jednak w nagłówku tabeli wpisana jest średnia, a dalej odchylenie standardowe i współczynnik zmienności;
 - W niektórych przypadkach moje wątpliwości budzi sposób odniesienia do wyników prezentowanych w tabelach, np. na stronie 34, powinno zostać zmodyfikowane zdanie: „Profil termiczny reakcji przedstawiał się następująco (Tabela 7):”.

Dyskusja zaprezentowana w recenzowanej przeze mnie rozprawie jest merytoryczna, krótko przeprowadzona i udokumentowana cytowanymi źródłami.

Na podkreślenie zasługuje umiejętność Autorki w przeprowadzeniu opisanych badań laboratoryjnych. Jak podkreśla doktorantka „opracowane metody detekcji polimorfizmów genu HK2 mogą stanowić szybki i tani test diagnostyczny pod kątem opracowanych markerów.”. Szkoda, że doktorantka nie pokusiła się o przedstawienie wyceny tego typu analiz, prawdopodobnie spowodowane było to zmianami cen na rynkach.

Autorka sformułowała 6 wniosków końcowych, ich treść jest uzasadniona.

Spis literatury zawarty został na 11 stronach. Analiza bibliografii zawarta w pracy została oparta na 106 pozycjach literatury, pochodzących w większości z czasopism o zasięgu

międzynarodowym, przy czym należy podkreślić wartość zacytowanych prac. Prace pochodzą z lat 1951– 2021. Uwagi edytorskie dotyczące spisu piśmiennictwa:

- W bibliografii występują dwie pozycje autorstwa Tyra i Żak z 2012 roku, sugeruję wprowadzić dodatkowe oznaczenia przy roku np. a i b;
- Na stronie 13 – przy pozycji literatury Wood 2008, powinno być Wood i in. 2008;
- Pozycja 66 dwaj autorzy: Parra i Petle, 1995, natomiast w tekście na stronach 20 i 21 praca cytowana jest jako Parra i in. 1995, proszę o doprecyzowanie;
- Nie znalazłam cytowania w tekście: pozycja 7– Blicharski i in. 2015, pozycja 20 – Forlemu i in. 2007, pozycja 64 – O’Neill i in.;
- W bibliografii pozycja 67 – PIC, USA, 2020 –w tekście cytowana jako PIC, 2020 – proszę ujednolicić zapis;
- W bibliografii brak pozycji, do której odnosi się Autorka na stronach 31 (Reed i in. 2007) oraz 32 (Żebrowska i in. 2011).

Dodatkowo nasuwa mi się jeszcze uwaga dotycząca stosowanych w dysertacji skrótów, jest to bardzo cenne, ponieważ pozwala, podczas czytania i analizy tekstu, w każdym momencie wrócić do tej części. Moje wątpliwości budzi: dlaczego skróty i ich wyjaśnienia są powtórzone w tekście? Moim zdaniem nie jest to już konieczne. Dodatkowo w tekście pojawiają się skróty, które nie zostały umieszczone w spisie, np. na stronie 12 „FA” czy na stronie 16: „AM (tzw. mięso kwaśne)”. Część skrótów ma również inne wytłumaczenie w tekście a inne w spisie, np. w tabeli 1 na stronie 16: Typ mięsa – Normalne (RFN), podczas gdy w wykazie skrótów „mięso odpowiedniej jakości”. Zdarzają się również skróty bez wyjaśnienia, np. na stronie 23 „VDAC”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa zawiera również streszczenia w języku polskim i angielskim, które zostały podzielone zgodnie z podziałem rozdziałów pracy. Autorka przedstawiła w nich najważniejsze fakty merytoryczne oraz najważniejsze osiągnięcia poznawcze uzyskane w prowadzonych analizach.

Z obowiązku recenzenta chciałam zwrócić uwagę, że zarówno w rozdziale *Materiał i metody* oraz w *Streszczeniach* warto w przypadku odwołania do programu SAS powołać się na pozycję literatury. W *Streszczeniach* jest zapis: „Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu pakietu SAS/STAT” natomiast w rozdziale *Materiał i metody* „Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu SAS v. 8.02...”. Odwołanie do literatury pozwoli na ujednolicenie stosowanej nomenklatury.

Przedstawione przeze mnie uwag i sugestii, które nasunęły się po przeczytaniu dysertacji, dotyczą głównie aspektów techniczno-redakcyjnych i nie wpływają na wartość merytoryczną

recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej. Uwagi mogą zostać uwzględnione przez Doktorantkę podczas przygotowywania prezentowanych wyników badań do druku.

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i spostrzeżenia mają charakter głównie redakcyjny i w żaden sposób nie wpływają na jednoznacznie pozytywną ocenę dysertacji. W mojej opinii uzyskane wyniki badań stanowią spójne i kompleksowe opracowanie podjętego problemu badawczego. Wyciągnięte wnioski stanowią podstawę do dalszych badań w tym zakresie, być może prowadzonych na większej populacji zwierząt. Niniejszą pracę oceniam bardzo wysoko pod względem merytorycznym, głównie zaprezentowanego warsztatu z zakresu badań i analiz molekularnych.

Wniosek końcowy:

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona do oceny dysertacja Pani mgr Katarzyny Woźniak „Analiza strukturalna genu HK2 w aspekcie cech użytkowych świń oraz parametrów jakości mięsa wieprzowego” stanowi bardzo wartościowe opracowanie problemu naukowego i tym samym w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. z dnia 14 marca.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) oraz ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z tym przedkładam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. inż. Beata Anna Sitkowska, prof. PBŚ