Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań
tel. +48 61 848 71 87, e-mail: genetyka@up.poznan.pl

Prof. dr hab. Dorota Cieślak tel. +4861 846117 email dorota.cieslak@up.poznan.pl

Poznań, 30.12.2022

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej
pt. ” *Analiza polimorfizmu DNA oraz ekspresji wybranych genów związanych ze zróżnicowaną przydatnością plemników knura do kriokonserwacji”* przygotowanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Leylanda Frasera oraz prof. dr hab. Przemysława Sobiecha

Podsumowanie rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy poszukiwania markerów genetycznych cechy przydatności do mrożenia plemników knura. Praca obejmuje szerokie spektrum metod badawczych oraz bogaty materiał biologiczny (plemniki knurów). Plemniki zostały poddane następującym analizom: ocena wybranych cech jakościowych (parametry ruchliwości CASA, integralność błony komórkowej oraz akrosomu, potencjał błon mitochondriów, fragmentacja DNA *Comet assay*, peroksydacja lipidów) oraz analizy molekularne DNA i RNA (identyfikacja polimorficznych sekwencji RNA *Variant calling*, genotypowanie *KASP*, sekwencjonowanie DNA *metoda Sangera*, określenie poziomu transkryptów *RT-qPCR SYBR Green*, sekwencjonowanie transkryptów *RNAseq*, analiza bioinformatyczna transkryptomu *GO enrichment*, analiza białek *Western blotting*, *SDS PAGE*).

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono doświadczenie obejmujące plemniki knurów produkujących nasienie o dobrej (GSF) i obniżonej (PSF) przydatności do mrożenia. Knury przyporządkowano do jednej z dwóch grup bazując na parametrach jakościowych plemników. Pierwsza część doświadczenia (artykuł nr 1) obejmuje szerokie spektrum analiz na dużej populacji knurów (40), z podziałem na grupy GSF (21) i PSF (19). Bazę sekwencji RNA uzyskaną w wyniku analizy transkryptomu plemników (296 ejakulatów, RNAseq) użyto do identyfikacji miejsc polimorficznych (ponad 1000 SNP; *variant calling*), z których na podstawie analizy bioinformatycznej (funkcje genów *GO enrichment*) wybrano 40 SNP do genotypowania (KASP). Wśród genów kandydujących zidentyfikowano 8 charakteryzujących się związkiem z jakością mrożonych plemników. **Wykazano zatem związek polimorfizmu genów, których transkrypty stwierdzono w plemnikach, z parametrami jakościowymi mrożonych plemników knura**.

W drugiej części doświadczenia (artykuł nr 2) skoncentrowano się na analizie dwóch genów (*STK35, IFT27*), które wybrano na podstawie wcześniejszych badań zespołu wykazujących ich wyższą ekspresję w nasieniu samców o obniżonej przydatności do mrożenia (PSF). Wykonano sekwencjonowanie sekwencji promotorowych genów identyfikując w sumie 3 miejsca polimorficzne, dla których przeprowadzono analizę *in silico* wiązania czynników transkrypcyjnych. Dwie grupy knurów różniły się pod względem frekwencji alleli. Stwierdzono zmiany liczby miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych (zanik jednego oraz pojawienie się 3 nowych). W odniesieniu do ekspresji białka wykazano niższą ilość STK35 w nasieniu obu grup samców oraz wyższą ilość IFT27 w nasieniu knurów GSF. Podsumowując, **wykazano związek polimorfizmu promotorów obu badanych loci z przydatnością plemników do mrożenia wynikający ze zmian miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych i przez to z potencjalną modyfikacją ekspresji genów.**

Celem trzeciej części doświadczenia (artykuł 3) było wykazanie, czy ekspresja 3 genów związanych ze stresem komórkowym (*TXNRD1, HSPA4L, ATP1B1*) na poziomie mRNA i białka ma związek z przydatnością plemników do mrożenia. Wybór genów oparto na wynikach wcześniejszych badań zespołu, które nie wykazały ich zróżnicowanej ekspresji w nasieniu knurów GSF i PSF. Przeprowadzono analizę wybranych parametrów jakości plemników m.in. fragmentacji DNA, integralności błony, na postawie których podzielono próby plemników na 2 grupy. Dokonano analizy ekspresji 3 genów na poziomie mRNA i białka. Określono także profil białkowy nasienia obu grup (SDS-PAGE) oraz analizę bioinformatyczną transkryptomu (*GO enrichment*). Wykazano związek poziomu mRNA i białka zarówno z grupą knurów (GSF, PSF) jak i stanem nasienia (świeże, mrożone). Przykładowo, ekspresja mRNA genu *TXNRD1* była wyższa w nasieniu mrożonym grupy PSF w porównaniu z nasieniem świeżym tej grupy, podczas gdy ekspresja białka tego genu była wyższa w nasieniu świeżym i mrożonym grupy PSF w porównaniu z nasieniem świeżym grupy GSF. Więcej białek stwierdzono w świeżym nasieniu grupy PSF oraz mrożonym nasieniu grupy GSF, przy czym nie analizowano związku poszczególnych frakcji białek z przydatnością plemników do mrożenia. Biorąc pod uwagę różnorodność opisanych zależności należy stwierdzić, że **analizowane geny mogą być uznane za markery różnych procesów kształtujących przydatność plemników do mrożenia np. gen *ATP1B1* może być markerem dla nasienia świeżego.**

Do najciekawszych osiągnięć niniejszej pracy zaliczam:

1. Kompleksową charakterystykę jakości plemników pozyskanych od knurów produkujących nasienie o dobrej (GSF) i obniżonej (PSF) przydatności do mrożenia.
2. Identyfikację potencjalnych markerów genetycznych dla cechy przydatności plemników knura do mrożenia m.in. warianty polimorficzne 8 genów ulegających ekspresji w plemnikach knura, poziom mRNA genu *ATP1B1* w nasieniu świeżym, poziom białka IFT27 w nasieniu mrożonym

Uwagi szczegółowe

1. Oceniana rozprawa doktorska obejmuje **opracowanie w języku angielskim** (19 stron) poprzedzone streszczeniami w j. angielskim i polskim, oraz **trzy opublikowane, oryginalne artykuły**. Artykuły opublikowano w indeksowanych czasopismach z IF, w tym jeden w *Theriogenology*, uznanym czasopiśmie z zakresu rozrodu zwierząt oraz dwa w *International Journal of Molecular Sciences* na platformie MDPI prezentującej szeroki panel zagadnień z zakresu badań na zwierzętach. We wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszą autorką z wiodącym udziałem między 60-65% (zgodnie z oświadczeniami autorów).

2. **Opracowanie w j. angielskim** zawiera wykaz skrótów, krótkie wprowadzenie, wykaz szczegółowych celów, opis materiałów i metod, omówieniem wyników z podziałem na poszczególne artykuły oraz spis referencji. Pragnę zwrócić uwagę na brak hipotezy oraz głównego celu pracy doktorskiej. Te dwa elementy są o tyle ważne, że jednoznacznie wskazują na założenia i cel doktoratu, a nie poszczególnych artykułów. Opracowanie w j. angielskim przedstawia opis genetycznego podłoża jakości plemników, które stanowi główny wątek badawczy pracy doktorskiej. Wprowadzenie nie omawia jednak dobrze udokumentowanej kwestii zróżnicowania plemników knurów pod względem przydatności do mrożenia i wynikającego stąd podziału na knury produkujące plemniki o dobrej (GSF) i obniżonej (PSF) przydatności do mrożenia. Ten aspekt jest kluczowy dla pracy doktorskiej i łączy wszystkie publikacje. Ponadto, opis jest ogólny i nie pokazuje jednoznacznie sekwencji doświadczeń ocenianej pracy, a skupia się na poszczególnych publikacjach. Badania rozpoczęto od szerokiego spektrum analiz na bogatym materiale biologicznym, po czym zawężono je do wybranych genów i parametrów plemników. W opisie brakuje pewnych istotnych szczegółów odnośnie układu poszczególnych doświadczeń i związku między nimi np. podstawą wyboru 3 genów do

doświadczenia przedstawionego w publikacji nr 3 były wyniki wcześniejszych doświadczeń zespołu wykazujące brak zróżnicowania poziomu transkryptów tych genów w nasieniu knurów GSF i PSF. Opis liczby zwierząt i pozyskanych ejakulatów jest mało precyzyjny. Z moich obliczeń wynika, że w sumie badaniami objęto 61 knurów (40+11+10), natomiast liczba ejakulatów nie jest jasna. Autorka wymienia jedynie liczbę ejakulatów wykorzystanych w artykule nr 3 (69), podczas gdy w artykule 1 (str. 53) wymieniono 51 oraz 296 ejakulatów. W opracowaniu zastosowano mało intuicyjne skróty odpowiadające plemnikom świeżym (PF *fresh pre-freeze*) oraz mrożonym (FT *post-thaw, frozen-thawed*), a skrót FT został rozwinięty tylko w Abstract. Forma przedstawienia wyników odpowiada wybranym fragmentom poszczególnych artykułów.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej stwierdzam, że w przedstawionym opisie w j. angielskim przedstawiono założenia, cele i wyniki poszczególnych publikacji, brakuje natomiast całościowego ujęcia pracy doktorskiej, uzyskanych wyników oraz ich podsumowania.

3. Zdaję sobie sprawę, ze **opublikowane prace** zostały poddane ocenie eksperckiej podczas procesu publikowania. Jednak do obowiązków recenzenta należy ocena całej rozprawy doktorskiej. Postanowiłam przedstawić uwagi do poszczególnych publikacji w postaci pytań do Doktorantki z prośbą o ustosunkowanie się podczas obrony pracy:

Publikacja pierwsza

Mańkowska A, *Brym P, Paukszto Ł, Jastrzębski JP, Frazer L. (2020) Gene polymorphisms in boar spermatozoa and their associations with post-thaw semen quality. International Journal of Molecular Sciences, 21(5):1902; IF= 6.208; 140 pkt)*

1. Proszę podać liczbę knurów, dawców nasienia oraz liczbę ejakulatów poddanych poszczególnym analizom.
2. Większość miejsc polimorficznych (67%) zlokalizowano w regionie 3`UTR. Czy jest to sytuacja porównywalna z innymi typami komórek/tkanek?
3. Proszę zweryfikować liczbę SNP wykorzystanych w genotypowaniu: na str. 19 podano 37, na str. 32 - 40.

Publikacja druga

Mańkowska A, *Brym P, Sobiech P, Frazer L. (2022) Promoter polymorphisms in STK35 and IFT27 genes and their associatons with boar sperm freezability.* Theriogenology 189:199; IF=2.86 140 pkt)

1. Proszę podać liczbę knurów, dawców nasienia oraz liczbę ejakulatów poddanych poszczególnym analizom. Czy były to zwierzęta objęte doświadczeniem 1?
2. Proszę podać dane charakteryzujące skuteczność procedury izolacji RNA z plemników: koncentracja (zakres i średnia) oraz czystość
3. Wcześniej wykazano, że geny poddane analizie (*STK35, IFT27*) charakteryzowały się wyższym poziomem transkryptów w plemnikach knurów produkujących nasienie o obniżonej przydatności do mrożenia. Proszę przedstawić przesłanki, którymi kierowali się autorzy w wyborze tych genów do doświadczenia 2.

Publikacja trzecia

Mańkowska A, *Gilun P, Zasiadczyk Ł, Sobiech P, Frazer L. (2022) Expression of genes TXNRD1, HSPA4L and ATP1B1associated with the freezability of boar sperm. International Journal of Molecular Sciences, 23(16):9320; IF= 6.208; 140 pkt)*

1. Proszę podać liczbę knurów, dawców nasienia oraz liczbę ejakulatów poddanych poszczególnym analizom. Czy były zwierzęta objęte doświadczeniami 1 i 2?
2. Wcześniej wykazano, że geny poddane analizie (*TXNRD1, HSPA4L, ATP1B1*) nie charakteryzowały się zróżnicowaną ekspresją w nasieniu knurów o dobrej i obniżonej przydatności do mrożenia. Proszę przedstawić przesłanki, którymi kierowali się autorzy w wyborze tych genów do doświadczenia 3.

3. Proszę wyjaśnić jakie dane odnośnie transkryptomu plemników były poddane analizie bioinfomatycznej. W rozdziale M&M tego artykułu nie ma informacji na temat sekwencjonowania RNAseq.
4. Ponieważ stwierdzono dużą różnorodność w zakresie różnic poziomu mRNA i białka dla poszczególnych genów w próbach plemników knurów istotnie różniących się przydatnością do mrożenia (GSF, PSF), proszę omówić to zjawisko na przykładzie genu *TXNRD1*, który charakteryzował się wyższym poziomem transkryptów w mrożonych plemnikach knurów PSF (w porównaniu ze świeżymi plemnikami PSF) i wyższym poziomem białka w świeżych i mrożonych plemnikach knurów PSF (w porównaniu ze świeżymi plemnikami GSF).

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona praca doktorska **mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej** stanowi cykl 3 publikacji tworzących tematyczną całość poświęconą poszukiwaniu markerów genetycznych dla cechy przydatności do mrożenia plemników knurów. Rozprawa zawiera elementy nowatorskie, w istotny sposób poszerzające dotychczasowy stan wiedzy w zakresie parametrów różnicujących plemniki pozyskanych od knurów produkujących nasienie o dobrej i obniżonej przydatności do mrożenia oraz wskazujące potencjalne markery genetyczne dla tej cechy. Moje krytyczne uwagi dotyczą głównie opracowania w j. angielskim, które odnosi się do poszczególnych publikacji zamiast całościowego podsumowania pracy doktorskiej.
Podsumowując uważam, że przedstawiona do recenzji praca zawiera oryginalne dane weryfikujące postawione hipotezy i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi określone *w Art. 187* ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce *(tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.)* i wnioskuję do **Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie** o dopuszczenie Pani **mgr inż. Anny Katarzyny Mańkowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

D. Cieślak

……..
Prof. dr hab. Dorota Cieślak

Poznan University of Life Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science
Department of Genetics and Animal Breeding
Wolyńska 33, 60-637 Poznan
phone +48 61 848 71 87, e-mail: genetyka@up.poznan.pl

Prof. dr hab. Dorota Cieślak phone +4861 846117 email dorota.cieslak@up.poznan.pl

Poznań, 30.12.2022

A review of the doctoral dissertation of **Anna Katarzyna Mankowska, MSc**
entitled ” *Analysis of DNA polymorphisms and expression of selected genes associated with different freezability of boar spermatozoa”*
supervised by prof. dr hab. Leyland Fraser and prof. dr hab. Przemysław Sobiech

Summary of the dissertation

The doctoral thesis submitted for evaluation concerns the search for genetic markers of the trait of freezability of porcine sperm cells. The thesis covers a wide spectrum of research methods and extensive biological material (boar sperm). Sperm cells were subjected to the following analyses: assessment of selected qualitative features (motility *CASA*, integrity of sperm membrane and acrosome, potential of mitochondrial membrane, DNA fragmentation *Comet assay*, lipid peroxidation) and molecular analyses of DNA and RNA (polymorphic sites of RNA *Variant calling*, genotyping *KASP*, DNA sequencing *Sanger method*, transcript abundance *RT-qPCR SYBR Green*, RNA sequencing *RNAseq*, bioinformatics of transcriptome data *GO enrichment*, protein abundance *Western blotting*, proteins profile SDS PAGE). The doctoral thesis included experiment on the sperm of boars producing semen with good (GSF) and poor (PSF) freezability. Boars were assigned to one of two groups based on sperm quality parameters.

The first part of the experiment (article no. 1) covers a wide spectrum of analyzes on a large population of boars (40), divided into groups of GSF (21) and PSF (19). The RNA sequence database obtained as a result of sperm transcriptome analysis (296 ejaculates, *RNAseq*) was used to identify polymorphic sites (over 1000 SNPs; *variant calling*), from which 40 SNPs were selected for genotyping (*KASP*) based on bioinformatics analysis (GO gene functions). Among the candidate genes, 8 were identified that were associated with the quality of the frozen sperm. Thus, the relationship between the polymorphisms of genes whose transcripts were found in spermatozoa and the qualitative parameters of frozen boar spermatozoa was demonstrated.

The second part of the experiment (article no. 2) was focused on the analysis of two genes (*STK35*, *IFT27*), which were selected on the basis of the previous research by the team showing their higher expression in the sperm cells of males with poor freezability (PSF). Gene promoter sequences were sequenced, identifying a total of 3 polymorphic sites for which *in silico* transcription factor binding analysis was performed. The two groups of boars differed in allele frequencies. Changes in the number of transcription factor binding sites were identified (removal of the original one and generation of 3 new ones). With regard to protein expression, a lower amount of STK35 was found in the semen of the two groups of males and a higher amount of IFT27 in the semen of GSF boars. To sum up, the relationship between the promoter polymorphisms of the both examined loci and the sperm freezability, resulting from changes in the binding sites of transcription factors, and thus from the potential modification of gene expression, was demonstrated.

The aim of the third part of the experiment (article no. 3) was to show whether the expression of 3 genes related to cellular stress (*TXNRD1, HSPA4L, ATP1B1*) at the mRNA and protein levels is related to the sperm freezability. The selection of genes was based on the results of previous research by the team, which did not show their differential expression in the semen of GSF and PSF boars. Selected sperm quality parameters were analyzed, e.g. DNA fragmentation, membrane integrity, based on which sperm samples were divided into 2 groups. The expression of 3 genes was analyzed at the mRNA and protein levels. The semen protein profile of the both groups (*SDS-PAGE*) and bioinformatics analysis of the transcriptome (*GO enrichment*) were also determined. The relationship between mRNA and protein levels was demonstrated both with the group of boars (GSF, PSF) and semen quality (fresh, frozen). For example, mRNA expression of the *TXNRD1* gene was higher in frozen semen of the PSF group (compared with fresh PSF semen) , while protein expression of this gene was higher in fresh and frozen semen of the PSF group (compared with fresh GSF semen). More proteins were found in the fresh PSF semen and the frozen GSF semen, but the relationship between individual protein fractions and the sperm freezability was not analyzed. Taking into account the variety of the described relationships, it should be concluded that the analyzed genes can be considered as markers of various processes shaping the sperm freezability, e.g. the *ATP1B1* gene can be a marker for fresh semen.

The most interesting achievements of this work include:

1. Comprehensive quality characterization of the sperm donated by boars producing semen with good (GSF) and poor (PSF) freezability
2. Identification of potential genetic markers for the trait of freezability of porcine sperm cells, e.g. polymorphic variants of 8 genes expressed in boar sperm, *ATP1B1* mRNA level in the fresh semen, IFT27 protein level in the frozen semen

Detailed comments

1. The doctoral dissertation includes a summary in English (19 pages) preceded by abstracts in English and Polish, and three published, original articles. The articles were published in IF-indexed journals, including one in *Theriogenology*, a recognized journal in the field of animal reproduction, and two in *International Journal of Molecular Sciences* on the MDPI platform presenting a broad panel of topics in the field of animal research. In all publications, the PhD student is the first author with a leading share of 60-65% (according to the authors' statements).

2. The summary in English contains a list of abbreviations, a short introduction, a list of specific goals, a description of materials and methods, a discussion of the results divided into individual articles and a list of references. I would like to point out the lack of a hypothesis and the main goal of the doctoral thesis. These two elements are important because they clearly indicate the assumptions and purpose of the doctoral dissertation, not individual articles.

The summary in English presents a description of the genetic background of sperm quality, which is the main research topic of this doctoral thesis. However, the introduction does not address the well-documented issue of the variability of boar sperm in terms of suitability for freezing and the resulting division into boars producing sperm with good (GSF) and poor (PSF) freezability. This aspect is crucial for the doctoral thesis and connects all publications. In addition, the description is general and does not clearly show the sequence of experiments of the evaluated thesis, but focuses on individual publications.

The research began with a wide spectrum of analyzes on extensive biological material, and then narrowed it down to selected genes and sperm parameters. The description lacks some important details regarding the sequence of experiments and the relationship between them e.g. the basis for the selection of 3 genes for the experiment presented in publication no. 3 were the results of the

team's previous experiments showing the lack of differentiation of transcript levels of these genes in the semen of GSF and PSF boars.
The description of the number of animals and the ejaculates obtained is not very precise. According to my calculations, a total of 61 boars (40+11+10) were tested, but the number of ejaculates is not clear. The author lists only the number of ejaculates used in article no. 3 (69), while article no. 1 (p. 53) mentions 51 and 296 ejaculates. The study uses non-intuitive abbreviations corresponding to fresh (PF fresh pre-freeze) and frozen (FT post-thaw, frozen-thawed) spermatozoa, and the abbreviation FT was explained only in the *Abstract*. The way of presenting the results corresponds to selected fragments of individual articles.
Summing up this part of the doctoral dissertation, I state that the summary in English presents the assumptions, goals and results of the individual publications, but there is no comprehensive presentation of the doctoral thesis, the results obtained and their summary.

3. I am aware that the published articles have been subjected to expert evaluation during the publishing process. However, the reviewer's duties include evaluating the entire doctoral dissertation. I decided to present comments to individual publications in the form of questions to the PhD student asking for her opinion during the defense of the thesis:

The article no 1
Mańkowska A, *Brym P, Paukszto Ł, Jastrzębski JP, Frazer L. (2020) Gene polymorphisms in boar spermatozoa and their associations with post-thaw semen quality. International Journal of Molecular Sciences, 21(5):1902; IF= 6.208; 140 pkt**)***

4. Please specify the number of boars, semen donors and the number of ejaculates subjected to individual analyses.
5. Most polymorphic sites (67%) were located in the 3'UTR region. Is this comparable to other cell/tissue types?
6. Please verify the number of SNPs used in genotyping: 37 on page 19, 40 on page 32.

The article no 2
Mańkowska A, *Brym P, Sobiech P, Frazer L. (2022) Promoter polymorphisms in STK35 and IFT27 genes and their associatons with boar sperm freezability.* Theriogenology 189:199; IF=2.86 140 pkt)

4. Please specify the number of boars, semen donors and the number of ejaculates subjected to individual analyses. Were these animals included in the experiment 1?
5. Please provide data characterizing the effectiveness of the RNA isolation procedure from spermatozoa: concentration (range and average) and purity
6. It was previously shown that the analyzed genes (*STK35, IFT27*) were characterized by a higher level of transcripts in the sperm of PSF boars. Please provide the rationale that guided the authors in selecting these genes for the experiment 2.

The article no 3
Mańkowska A, *Gilun P, Zasiadczyk Ł, Sobiech P, Frazer L. (2022) Expression of genes TXNRD1, HSPA4L and ATP1B1associated with the freezability of boar sperm. International Journal of Molecular Sciences, 23(16):9320; IF= 6.208; 140 pkt**)***

5. Please specify the number of boars, semen donors and the number of ejaculates subjected to individual analyses. Were these animals included in the experiments 1 and 2?

6. It was previously shown that the analyzed genes (*TXNRD1*, *HSPA4L*, *ATP1B1*) were not characterized by differentiated expression in the semen of GSF and PSF boars. Please provide the rationale that guided the authors in selecting these genes for experiment 3.
7. Please explain what data on the sperm transcriptome were subjected to bioinformatics analysis. There is no information on RNAseq in the M&M section of this article.
8. Since a great diversity was found in the differences in mRNA and protein levels for individual genes in samples of spermatozoa of boars significantly different in their suitability for freezing (GSF, PSF), please discuss this phenomenon on the example of the *TXNRD1* gene, which was characterized by a higher level of transcripts in frozen spermatozoa PSF boar sperm (compared to fresh PSF sperm) and higher protein levels in fresh and frozen PSF boar sperm (compared to fresh GSF sperm).

In conclusion, I would like to emphasize that the presented doctoral thesis of Anna Katarzyna Mankowska, MSc is a series of 3 publications addressing the issue of the search for genetic markers for the trait of sprem freezablity. The dissertation contains innovative elements, significantly extending the current state of knowledge on parameters differentiating spermatozoa obtained from boars producing semen with good and poor freezability, and indicating potential genetic markers for this trait. My critical remarks mainly concern the summary in English, which refers to individual publications instead of a comprehensive summary of the doctoral thesis.
In conclusion, I believe that the work submitted for review contains original data verifying the hypotheses and meets the requirements for doctoral theses in the discipline of zootechnics and aquaculture.
Considering the above, I declare that the doctoral dissertation submitted for evaluation meets the requirements set out in Article 187 of the Act of 20 July 2018 Law on Higher Education and Science (consolidated text: Journal of Laws of 2022, item 574, as amended .) and I apply to the Zootechnics and Aquaculture Discipline Council of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn to admit Anna Katarzyna Mankowska MSc Eng. for further stages of the doctoral procedure.

D. Cieślak

……..
Prof. dr hab. Dorota Cieślak