

Jastrzębiec, 06.12.2021r.

Dr hab. Agnieszka Korwin-Kossakowska
ul. Ogrodowa1/1, 05-552 Jastrzębiec

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Joanny Grzegorzczak pt:
"Charakterystyka struktury populacji oraz identyfikacja unikalnych cech genomu gęsi
Białej Kołodzkiej"
napisanej pod kierunkiem
dr hab. Marii Oczkiewicz, prof. IZ

Formalny opis rozprawy

Rozprawa została opracowana na podstawie cyklu trzech oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2018, 2019 i 2021, w języku angielskim, w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym z listy JCR, ze wskaźnikami Impact Factor, odpowiednio: Annals of Animal Sciences - 2.090, Animals - 2.752, Genes - 4,096 .

Praca rozpoczyna się streszczeniami w języku polskim i angielskim. Sześciostronicowy wstęp wprowadza czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. W dalszej kolejności, po jednostronicowym przedstawieniu celów badań rozpoczyna się opis tematyki zawartej w cyklu publikacji naukowych. Następny rozdział to „Podsumowania i wnioski”. Rozprawa kończy się spisem literatury. Do manuskryptu dołączone zostały oryginały publikacji, w oparciu o które wykonano pracę oraz oświadczenia współautorów, określające ich wkład w przygotowanie pracy. Do manuskryptu dołączone zostały również materiały uzupełniające w formie elektronicznej.

Podsumowanie rozprawy

W ostatnim czasie istnieje coraz większe zapotrzebowanie mieszkańców naszego kraju na mięso gęsie, gdyż charakteryzuje się ono wybitnymi właściwościami zdrowotnymi - mięso to ma wyjątkowe wartości zarówno odżywcze, jak również smakowe. Jest chude, nawet to pozyskane od tłustej gęsi, ponadto zawiera składniki obniżające poziom cholesterolu i świetnie nadaje się do stosowania w dietach osób chorych na serce i układ krążenia. Hodowla gęsi staje się w Polsce coraz bardziej popularna. Polska należy do największych producentów gęsiny w Europie. Przez wiele lat gęsiną z naszego kraju trafiała głównie na eksport. Rok 2017 w eksporcie był nieco słabszy ze względu na ptasią gripę, ale w 2018 roku ta liczba powróciła do dawnego poziomu. Największymi odbiorcami mięsa gęsięgo produkowanego w Polsce byli

Niemcy i Francuzi, później także Hongkong. Ostatnio zwiększyła się promocja tego mięsa na rynku wewnętrznym, co wraz z powoływaniem się na polską tradycję narodową, przyczyniło się do wzrostu zainteresowania gęsiną. Szczególnie jest to widoczne w związku ze świętem Odzyskania Niepodległości 11 listopada. Obecnie spożycie tego mięsa drobiowego w naszym kraju sięga ok. 700 ton rocznie, natomiast eksport polskiej gęsiny do Niemiec to ponad 20 tys. ton rocznie.

Praca mgr Grzegorzczuk poświęcona jest charakterystyce populacji polskiej gęsi pod względem różnorodności genetycznej oraz genetyki populacji. W tym celu do badań zastosowano różne metody molekularne: badanie genomu mitochondrialnego, badanie polimorfizmu DNA 15 *loci* mikrosatelitarnych i wreszcie polimorfizm pojedynczego nukleotydu SNP.

Materiał stanowiły gęsi rasy Białej Kołudzkiej oraz przedstawiciele pozostałych 12 ras zachowawczych gęsi hodowanych w Polsce. Doktorantka podjęła próbę wykorzystania mitochondrialnego DNA do badań filogenetycznych gęsi, jednak przez wzgląd na obecność zjawiska heterozji metoda ta okazała się nieprzydatna. Natomiast wyniki analizy polimorfizmu mikrosatelitarnego wykazały wysoki stopień zróżnicowania genotypów u wszystkich badanych gęsi, jednakże nie dało się wyodrębnić charakterystycznych różnic pomiędzy poszczególnymi populacjami, a wyniki analiz sekwencji mikrosatelitarnych nie odzwierciedlają rozmieszczenia geograficznego, budowy ciała ani różnorodnego koloru upierzenia gęsi. Należy założyć, że odległości genetyczne między badanymi rasami są małe. Najbardziej zdystansowaną genetycznie rasą okazała się rasa słowacka, a kielecka i garbonosa wykazały największe pokrewieństwo. Wykorzystanie markerów mikrosatelitarnych na tym materiale nie pozwoliło na jednoznaczną identyfikację potomków odrębnych gatunków. Natomiast analiza GBS wykazała z kolei wysokie zdystansowanie genetyczne rasy romańskiej i kartuskiej. Dalsza analiza obejmująca polimorfizm SNP pozwoliła na wyodrębnienie trzech ugrupowań, co jest zgodne z filogenetycznym pochodzeniem badanych ras.

Generalnie obie metody - analiza GBS oraz polimorfizm markerów mikrosatelitarnych wskazują na fakt, że gęsi utrzymywane w Polsce są ze sobą ściśle spokrewnione a zróżnicowanie genetyczne pomiędzy nimi niewielkie.

Ocena merytoryczna pracy

Wstęp

W rozdziale tym Doktorantka pomieściła skondensowaną wiedzę leżącą u podstaw zagadnień będących przedmiotem rozprawy, podkreślając tylko istotne problemy. Dzięki temu czytelnik zostaje gładko wprowadzony w tematykę pracy. Wstęp jest stosunkowo krótki ale zawiera wszystkie potrzebne elementy.

Hipoteza i Cele

Hipoteza pracy nie jest jasno określona, Autorka wskazuje jedynie na brak publikacji na temat zmienności genetycznej gęsi ras zachowawczych utrzymywanych w Polsce oraz stopień pokrewieństwa między nimi, a także brak w literaturze naukowej charakterystyki genomu gęsi Białej Kołodzkiej .

Autorka wyznaczyła 5 głównych celów przeprowadzonych badań, obejmujących zarówno określenie zmienności genetycznej w obrębie rasy Białej Kołodzkiej, jak i różnorodności genetycznej ras rodzimych gęsi w Polsce, a także wyznaczenie dystansu genetycznego i stopnia pokrewieństwa pomiędzy rasą Białą Kołodzką a innymi rasami gęsi. Ostatni, piąty cel wydaje się szczególnie ciekawy, ma aspekt praktyczny tj. opracowanie narzędzi molekularnych pozwalających na ocenę produktów pozyskanych od gęsi Białej Kołodzkiej.

Materiał

Materiał do badań jest dobrze dobrany, różnorodność dostępnych ras robi wrażenie, również w miarę równe liczebności w grupach rasowych. Liczebności te są niewielkie, ale też dostępność i liczebność stad ras zachowawczych w Polsce jest niewielka.

Metody

Zaproponowane metody są odpowiednie do założonych zadań. W badaniach polimorfizmu mikrosatelitarnego analiza przeprowadzona została przy użyciu analizatora sekwencji firmy Applied Biosystems i oprogramowania Gen Mapper, a szereg narzędzi statystycznych zastosowano w celu oszacowania parametrów takich jak frekwencja alleli, heterozygotyczność obserwowana i spodziewana, wskaźniki zróżnicowania (N , N_a , N_e), współczynnik F_{st} (dystans genetyczny Wrighta) (oprogramowanie GenAIEx6), równowaga Hardy-Weinberga (oprogramowanie GENEPOP4.2.). Program Arequin 3.11. wykorzystano do przeprowadzenia analizy wariancji, program własny IMGBOVSTST IZOO PIB do kalkulacji

wskaźnika PIC, program Structure do szacowania struktury populacji itd. Pozwoliło to na dokładne przeanalizowanie otrzymanych wyników.

Podobnie przebiegało to w przypadku badań polimorfizmu pojedynczego nukleotydu czyli zastosowanie metody genotypowania poprzez sekwencjonowanie (GBS) i szeregu odpowiednich narzędzi statystycznych (FastQC, Tassels5 GBS, Bowtie2 Aligner, program ClustVis, oprogramowanie Grendist itd). Produkty sekwencjonowania DNA przeanalizowano również przy użyciu wspomnianego powyżej analizatora sekwencji 3500xl. Analiza zróżnicowania genetycznego badanych gęsi została przeprowadzona metodą PCA (analiza głównych składowych). Prawidłowość zastosowanych metod została już zweryfikowana na etapie recenzji artykułów, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach, a więc zagadnienie to nie podlega dalszej dyskusji.

Wyniki

Przeprowadzono analizę 15 loci mikrosatelitarnych, w obrębie których w sumie opisano 119 alleli występujących z różną częstością, a następnie wykorzystano je do oszacowania zmienności. Wyróżniono markery najbardziej polimorficzne, o najwyższej informatywności. Program Structure został wykorzystany do analizy pokrewieństwa pomiędzy populacjami i wyniki wskazały na występowanie 13 subpopulacji. Jednocześnie wykazano, że odległości genetyczne między badanymi rasami są małe. Najbardziej zdystansowaną genetycznie rasą jest rasa słowacka, a największe pokrewieństwo wykazują rasy kielecka i garbonosa.

W analizie PCA wykorzystano ostatecznie 791 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, co stanowiło niewielką liczbę w porównaniu np. z badaniami chińskimi. Autorka nie potrafi jednoznacznie powiedzieć co było tego przyczyną, wskazuje raczej na przyczyny metodyczne. Jednak opracowane w niniejszej pracy podejście metodyczne doboru markerów umożliwiło identyfikację SNP-ów o większej sile dyskryminacji analizowanych ras. Przeprowadzona analiza wykazała odrębność profili genetycznych gęsi garbonosej i kubańskiej. Generalnie badane rasy zakwalifikowano do trzech różnych grup.

Użycie szeregu zróżnicowanych narzędzi pozwoliło na otrzymanie ogromnej liczby bardzo ciekawych wyników, które zostały przeanalizowane bardzo dokładnie, a następnie przeprowadzono równie wnikliwą dyskusję. Brak wybitnie spektakularnych rezultatów pracy wynika po części z niedużej liczebności poszczególnych grup rasowych, a to z kolei wynika z realiów jakie występują w naszym kraju, z drugiej zaś strony braku informacji na temat genomu gęsi w dostępnych bazach danych (genom gęsi nie został dotąd zsekwencjonowany). Doktorantka wykazała się tu ogromną wiedzą z zakresu analiz molekularnych, znajomością

wielu narzędzi molekularnych i bioinformatycznych oraz ogromną wnikliwością. Można powiedzieć, że udało jej się uzyskać maksimum informacji na podstawie ograniczonej ilości materiału właśnie dzięki ogromnej wiedzy z tego zakresu.

Dyskusja obejmuje kilka zagadnień przedstawionych na tle literatury lub wcześniejszych badań, m.in. wybór metod selekcji markerów i ich efektywność.

Publikacje będące składową tego doktoratu charakteryzują się dużą liczbą tabel i grafów, również barwnych, które pozwalają na lepsze przyswojenie sobie otrzymanych wyników. Publikacje kończą się syntetycznie przedstawionymi podsumowaniami.

Co ciekawe, badania przedstawione w publikacjach zostały sfinansowane całkowicie w ramach środków własnych Instytutu Zootechniki.

Wnioski

Wnioski są właściwie podsumowaniem wyników, które sformułowano w 10 punktach. Jedyne wnioski, jakie można wysnuć z otrzymanych wyników to ten, że gęsi utrzymywane w Polsce są ze sobą ściśle spokrewnione, występuje małe zróżnicowanie genetyczne między rasami i stąd przy użyciu znanych narzędzi molekularnych trudne do odróżnienia.

Brak jest ustosunkowania się do ostatniego celu postawionego na wstępie doktoratu tj. opracowanie narzędzi pozwalających na weryfikację zgodności produktów pozyskanych od gęsi Białej Kołudzkiej, co mogłoby mieć ogromne znaczenie komercyjne.

Uwagi krytyczne :

Mimo bardzo wysokiej oceny przedstawionej mi pracy doktorskiej, pragnę zwrócić uwagę na kilka uchybień:

- brak jest w pracy hipotezy badawczej
- wnioski są właściwie podsumowaniem wyników. Brak ustosunkowania się do wniosku ostatniego, piątego.
- we wstępie znajduje się kilka niezgrabnych sformułowań, powtórzeń lub niekonsekwencji np. na stronie 8: „, Dotychczas, spokrewnienie, identyfikacja osobnicza oraz taksonomia ptaków były prowadzone w oparciu o dostępną dokumentację oraz cechy fenotypowe zwierząt, natomiast obecnie opierają się one również na ~~analizie~~ analizie genomu osobnika (Gonzalez i wsp., 2009; Donne-Goussé i wsp., 2002)”, lub też na str. 10 powtórzone zdanie : ”.....i w rezultacie szerokie zastosowanie markerów genetycznych w badaniach populacyjnych oraz charakterystyce genomu zwierząt dla których nie opracowano dotychczas pełnej sekwencji genomu oraz odpowiednich macierzy. „,

Podsumowanie

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona mi do oceny praca **mgr inż. Joanny Grzegorzcyk** pt. "Charakterystyka struktury populacji oraz identyfikacja unikalnych cech genomu gęsi Białej Kołudzkiej" ma charakter nowatorski i w istotny sposób poszerza dotychczasowy stan wiedzy na temat wykorzystania danych genotypowych do rozróżniania ras i analizy struktury genetycznej. Duże spektrum badanych parametrów, zaawansowane procedury badawcze oraz jakość uzyskanych wyników sprawiają, że bez wątplenia są i będą publikowane w renomowanych czasopismach. Pomimo kilku krytycznych uwag, które jednak dotyczą w większości drobnych uchybień, uważam, że przedstawiona do recenzji praca zawiera oryginalne dane weryfikujące postawione hipotezy i całkowicie spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Zakończenie

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz.595; z 2005 r. Nr 164, poz.1365; z 2010 r. Nr 96, poz.620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki PIB w Balicach o dopuszczenie **mgr inż. Joanny Grzegorzcyk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Agnieszka Korwin-Kossakowska