



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa

Dr hab. Urszula Kaczor prof. URK

Ocena

rozprawy doktorskiej Pani **mgr inż. Joanny Grzegorzcyk** pt. *Charakterystyka struktury populacji oraz identyfikacja unikalnych cech genomu gęsi Białej Kołodzkiej®*

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Grzegorzcyk pt. *„Charakterystyka struktury populacji oraz identyfikacja unikalnych cech genomu gęsi Białej Kołodzkiej®”* została wykonana w Instytucie Zootechniki - Państwowym Instytucie Badawczym pod kierunkiem promotora naukowego Pani dr hab. Marii Oczkiewicz prof. IZ.

Podstawą dysertacji są trzy prace naukowe, w tym dwie prace oryginalne i jedna praca przeglądowa oraz poprzedzające je polskojęzyczne opracowanie. Przedstawione do oceny publikacje naukowe ukazały się w latach 2018 - 2021 w międzynarodowych czasopismach indeksowanych w bazie ICR (Journal Citation Reports), jednocześnie umieszczonych w wykazie Ministra Edukacji i Nauki (lista A). Sumaryczny współczynnik wpływu IF (Impact Factor) czasopism, w których zamieszczono prace wyniósł 7,99 a suma punktów w wykazie czasopism MEiN to 300 (w roku opublikowania prac).

Przedstawione publikacje są wieloautorские (od 4 do 6 autorów), co jest w pełni zrozumiałe w aspekcie wykorzystania złożonych metod, ilości prezentowanych wyników oraz ich kompleksowego opracowania. Pani mgr Joanna Grzegorzcyk jest pierwszym autorem we wszystkich trzech publikacjach. Zgodnie z dołączonymi do rozprawy oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Doktorantki w każdej z prac był więcej niż wiodący (50-70%) i polegał na opracowaniu koncepcji, zebraniu literatury, interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu. Tak znaczący wkład mgr Joanny Grzegorzcyk w powstanie poszczególnych prac nie budzi wątpliwości. Należy zwrócić uwagę, że



przedstawione do oceny dwie publikacje oryginalne stanowią spójną całość i dotyczą wyraźnie wyodrębnionego problemu, który dotyczy:

- określenia zmienności genetycznej w populacji gęsi rasy Białej Kołudzkiej®,
- wyznaczenia dystansu genetycznego i stopnia pokrewieństwa pomiędzy tą rasą a innymi rasami gęsi w oparciu o polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych oraz zidentyfikowane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP),
- oceny różnorodności genetycznej polskich ras gęsi za pomocą *loci* mikrosatelitarnych i markerów SNP,
- określenia przydatności technik sekwencjonowania do genotypowania (GBS) i analizy zmienności genetycznej ras gęsi utrzymywanych w Polsce.

Podjęta przez doktorantkę tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i jest po części kontynuacją naukowych zainteresowań Zespołu badawczego w którym Doktorantka realizowała badania do pracy doktorskiej.

Badania struktury genetycznej prowadzone są dla wszystkich gatunków zwierząt gospodarskich. Dla większości z nich sformułowano zestawy markerów mikrosatelitarnych służące poznaniu zmienności genetycznej wewnątrz i między populacjami. Zastosowanie sekwencji mikrosatelitarnych w badaniach drobiu dotyczy kur, przepiórek, indyków i kaczek oraz gęsi, przy czym u tych dwóch ostatnich gatunków wartości oszacowanych wskaźników zmienności genetycznej są znacznie zróżnicowane. Najwięcej badań genetycznych drobiu przeprowadzono u kur a szeroko zaplanowane projekty jak m. in. AVIANDIV przyniosły informacje na temat zróżnicowania genetycznego u kury domowej. Podejmowane są także próby zastosowania markerów mikrosatelitarnych specyficznych dla jednego gatunku w badaniach innych gatunków drobiu.

Rząd Anseriformes jest zróżnicowaną grupą ptaków wykazującą biologiczną i morfologiczną różnorodność i charakteryzuje się bliskim spokrewnieniem pomiędzy blisko 150 gatunkami ptaków. Spośród występujących w Anseriformes trzech rodzin: Anhimidae (skrzydłoszpony), Anseranatidae (bezpłetwce) oraz Anatidae (kaczkowate) właśnie ta ostatnia zasługuje na uwagę hodowców. Wśród Anatidae, gęś domowa jako zwierzę nie uznawane jako modelowe nie posiada w pełni opracowanego genomu referencyjnego, a zróżnicowanie



genetyczne oraz pokrewieństwo pomiędzy większością gatunków gęsi pozostaje słabo zidentyfikowane na poziomie molekularnym. Jak już wspomniałam obecnie podstawowym narzędziem umożliwiającym scharakteryzowanie zmienności genetycznej zwierząt hodowlanych jest analiza polimorfizmów mikrosatelitarnego DNA. Zalecany panel markerów mikrosatelitarnych stosowany do identyfikacji gęsi domowej nie został jeszcze dopracowany i liczy 10 gatunkowo-specyficznych markerów. W ostatnich latach, do badań populacyjnych zaczęto stosować technologie wykorzystujące polimorfizm pojedynczego nukleotydu czyli mikromacierze DNA. Ich zastosowanie poprzedzane jest użyciem techniki wykorzystującej sekwencjonowanie do genotypowania (GBS).

Przechodząc do recenzji, rozprawa doktorska Pani Joanny Grzegorzczak wpisuje się w przedstawione zagadnienia poznania struktury populacji gęsi ras krajowych a przede wszystkim gęsi Białej Kołudzkiej stanowiącej 95% populacji gęsi utrzymywanych w Polsce. Zagadnienia poruszane przez doktorantkę są aktualne i godne uwagi a przedstawione wyniki umożliwiają wielopłaszczyznową analizę zmienności ras gęsi krajowych, w tym gęsi Kołudzkiej.

W pierwszej pracy przeglądowej stanowiącej rozprawę doktorską, opublikowanej w **Annals of Animal Science** Doktorantka zamieściła najnowsze wyniki badań filogenetycznych przede wszystkim u ptaków na podstawie 45 pozycji literatury. Wykazała, że badania dotyczące charakterystyki regionu kontrolnego mtDNA u Anseriformes opisują największą różnorodność wśród rodziny kaczkowatych. Interesująca Autorkę podrodzina rodzina Anserinae wykazuje wysoki stopień pokrewieństwa, przy czym filogeneza rzędu Anseriformes wciąż wykazuje pewne braki w systematyce, wymagające dalszych badań nad filogenetyką i różnorodnością tej dużej grupy drobiu. Autorka omówiła również wyniki badań dotyczących filogenezy dotychczas przebadanych przedstawicieli Anserinae pochodzących w większości z analiz azjatyckich i amerykańskich. W odniesieniu do ras gęsi europejskich niewielkie zróżnicowanie genetyczne mtDNA wskazuje bliski związek ewolucyjny między gatunkami Anserinae.

Publikacja ta nie jest przeglądem literatury dotyczącym tematyki dwóch pozostałych prac oryginalnych ale jest uzupełnieniem możliwości badań filogenetycznych gęsi w oparciu o badania mitochondrialnego DNA a w szczególności zmienności w regionie kontrolnym mtDNA.



Celem drugiej pracy opublikowanej w czasopiśmie **Animals** było określenie polimorfizmu mikrosatelitarnego u gęsi Białej Kołudzkiej® i 12 spośród 14 ras gęsi zachowawczych utrzymywanych w Polsce: kieleckiej, podkarpackiej, garbonosej pomorskiej, rypińskiej, landes, lubelskiej, suwalskiej, kartuskiej, romańskiej, słowackiej i kubańskiej. Analizę przeprowadzono łącznie na dużym materiale biologicznym, liczącym 396 próbek. Autorzy podjęli próbę zbadania polimorfizmu DNA w 15 *loci* mikrosatelitarnych. W 14 sekwencjach mikrosatelitarnych zidentyfikowano 119 alleli, a liczba alleli w pojedynczym *locus* wahała się od 3 do 13. Oszacowano podstawowe parametry statystyczne zmienności w każdym *locus* dla każdej badanej populacji gęsi: częstotliwości alleli, standardowych wskaźników różnorodności (N , N_a , N_e), heterozygotyczności obserwowanej (H_o) i oczekiwanej (H_e), wskaźników polimorficzności PIC i utrwalenia F_{ST} . Analizowano pokrewieństwo pomiędzy badanymi populacjami gęsi i sprawdzono czy dane populacje tworzą odrębne grupy genetyczne. Wyniki dogłębnej analizy wykazały, że jednoznaczne odróżnienie poszczególnych ras gęsi nie jest możliwe przy użyciu zastosowanych markerów STR. Autorzy wykazali, że wysoka zmienność w populacji gęsi kołudzkiej jest zjawiskiem korzystnym, wskazującym na wysoki potencjał selekcyjny tej rasy.

Kolejna publikacja zamieszczona w **Genes** miała na celu zastosowanie sekwencjonowania do genotypowania gęsi Białej Kołudzkiej i 12 ras gęsi zachowawczych. Materiał użyty w tym doświadczeniu był zatem zbliżony do użytego w publikacji drugiej. Wykazano, że markery SNP otrzymane metodą GBS charakteryzują się wyższym poziomem informatywności w porównaniu do markerów mikrosatelitarnych. Podobne rezultaty uzyskano stosując trzy metody: zróżnicowania genetycznego PCA, dystansu genetycznego oraz hierarchicznego genotypowania, co wskazuje, że przy wykrywaniu zróżnicowania genetycznego polskich gęsi, wierniejsze odzwierciedlenie danych filogenetycznych, zyskujemy posługując analizą GBS vs do użycia STR. Jednocześnie wykazano, że wyniki analizy GBS słabo odzwierciedlają pochodzenie geograficzne gęsi oraz występowanie cech fenotypowych, takich jak masa ciała czy kolor upierzenia. Analiza GBS oraz badania oparte na markerach mikrosatelitarnych wykazały, że gęsi utrzymywane w Polsce są ze sobą ściśle spokrewnione, a zróżnicowanie genetyczne między rasami jest niewielkie, co utrudnia ich odróżnienie.



W trakcie lektury powyższych publikacji, które zostały już uprzednio zrecenzowane, nie znalazłam problematycznych elementów. Prace stanowią spójny układ, są napisane zrozumiale z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem metod badawczych oraz wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Dane przedstawione w pracach oryginalnych, szczególnie w ostatniej z cytowanych publikacji mają charakter nowatorski. Należy podkreślić, że prace już opublikowane w czasopismach z listy JCR ułatwiają zadanie recenzentowi. Wartość naukowa i uzyskanych wyników potwierdzona jest przecież przez recenzentów oraz edytorów czasopism, w których się ukazały.

Jak już zauważyłam powyżej, dwie prace oryginalne i jedna przeglądowa, składające się na rozprawę doktorską, opatrzone są krótkim 35 stronicowym omówieniem zawierającym: streszczenie w języku polskim i angielskim, „Wstęp” będący syntetycznym przeglądem literatury, cele pracy, materiał i metody, wyniki omawiające poszczególne publikacje, podsumowanie i wnioski a także wykaz 59 publikacji.

Opracowanie jest przedstawione w sposób bardzo przejrzysty i merytoryczny, chociaż znajdują się w tej części nieliczne błędy edytorskie jak np.: bezpłetwce a nie bezpławce, Anseriformes a nie Anserfiormes (str. 8), rządzie a nie rządzie (str. 15), skróty myślowe nie wpływające na wysoką ocenę dysertacji.

W podrozdziale „Wstęp” Autorka przedstawiła w sposób spójny dotychczasowy stan wiedzy w zakresie omawianego zagadnienia i wyjaśniła unikatowość materiału badawczego (gęsi Białej Kołodzkiej oraz innych krajowych ras zachowawczych). Rozdział napisano w sposób bardzo dojrzały prowadząc do celów pracy, co świadczy o zrozumieniu omawianego tematu przez panią mgr Joannę Grzegorzyczkę. Cele pracy zostały sformułowane poprawnie w postaci wyróżnionych szczegółowych zadań badawczych konsekwentnie realizowanych w kolejnych podrozdziałach.

W rozdziale „Materiał i metody” Autorka przedstawiła opis grup zwierząt wykorzystanych w poszczególnych badaniach, oraz zastosowane metody i techniki analityczne wraz z opisem poszczególnych doświadczeń. Podkreślić należy różnorodność wykonanych analiz, co świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę bardzo nowoczesnego warsztatu badawczego. Pani mgr Grzegorzyczkę podjęła się po raz pierwszy w kraju analizy polimorfizmu mikrosatelitarnego u ras gęsi utrzymywanych w Polsce z wykorzystaniem



programu Structure oraz innowacyjną metodę zastosowania sekwencjonowania do genotypowania (GBS).

W rozdziale „Wyniki” opisano w skróconej formie główne rezultaty zebrane z opublikowanych prac, konfrontując je ze stanem współczesnej wiedzy i właściwie dobierając literaturę odnoszącą się do tematyki badania struktury populacji, filogenezy i różnorodności rasowej gęsi domowej. Rozdział ten podzielono na podrozdziały, z których każdy dotyczył osobnej pracy badawczej. Niestety, w rozdziale tym autorka pominęła część tabeli i wykresów jakie znajdowały się w opublikowanych pracach z suplementami, co utrudniało analizę uzyskanych wyników.

Polskojęzyczne opracowanie zamyka krótki rozdział „Podsumowanie” i 10 wniosków, które pokazują zrealizowanie założonych celów a przede wszystkim stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat struktury genetycznej krajowych ras zachowawczych oraz gęsi Białej Kołodzkiej.

Po przeczytaniu opracowania nasunęły mi się następujące spostrzeżenia i pytania dotyczące pracy:

1. Autorka w streszczeniu wspomina, że podjęła próbę identyfikacji zmienności mitochondrialnego DNA u gęsi Białej Kołodzkiej, ale nie wykazała zjawiska heterozji i odstąpiła od analizy filogenetycznej tego gatunku. Czy podjęto próby analizy regionu kontrolnego u pozostałych 12 krajowych ras zachowawczych? Jeśli tak to jakie rezultaty uzyskano.

2. U gęsi Białej Kołodzkiej wyodrębnia się ród żeński W11 oraz męski W33. Czy wśród materiału biologicznego użytego w doświadczeniach był materiał biologiczny pochodzący od gęsi rodów W11 i W33 czy mieszańców W31?

3. W dysertacji polskojęzycznej można było zamieścić tabele, które omówiono w tekście. Dotyczy to omówienia wyników zamieszczonych w czasopiśmie Animals np. tabeli S2 zawierającej informacje na temat liczby alleli w poszczególnych *loci*. Tym bardziej, że tabeli tej oraz tabeli S1 nie zamieszczono w załączonej publikacji w języku angielskim. Znajdujemy tam jedynie informację o linku do suplementów.

Do zamieszczonej w dysertacji publikacji z czasopisma Genes również należało wprowadzić informacje wydrukowane w suplementach.



4. Na stronie 19, wiersz 2 umieszczono informację, że „była to pierwsza analiza obejmująca materiał biologiczny gęsi Białej Kołodzkiej®”. Polimorfizm mikrosatelitarny gęsi tej rasy analizowano w pracy doktorskiej pana dr Łukasza Wrzaszcza (w 2011 r.) p.t. „Ocena genetycznego zróżnicowania populacji gęsi na podstawie polimorfizmu DNA” Autor badał 14 *loci* mikrosatelitarnych, w tym 5 identycznych jak Doktorantka.

5. Doktorantka sformułowała 10 interesujących i trafnych wniosków dotyczących całego materiału badawczego tj. wszystkich 13 ras gęsi. Jednak nawiązując do tematu rozprawy doktorskiej zabrakło sformułowania końcowych wniosków dotyczących struktury genetycznej oraz obecności/braku unikalnych cech genomu gęsi Białej Kołodzkiej.

Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy Pani mgr inż. Joanny Grzegorzczak uznaję wykorzystanie po raz pierwszy u gęsi domowej innowacyjnej techniki wykorzystującej sekwencjonowanie nowej generacji do analizy różnorodności genetycznej ras krajowych.

Podsumowując, rozprawę Pani mgr inż. Joanny Grzegorzczak oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne, interesujące i nowatorskie opracowanie dostarczające nowych informacji na temat struktury genetycznej populacji ras gęsi krajowych. Uzyskane wyniki mają wartość poznawczą ale i mogą stanowić podstawę do kontynuacji badań w formie nowych eksperymentów. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania wymagały od Autorki opanowania bardzo skomplikowanych technik molekularnych i zaawansowanych programów bioinformatycznych oraz znajomości najnowszej literatury.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Grzegorzczak pt. „*Charakterystyka struktury populacji oraz identyfikacja unikalnych cech genomu gęsi Białej Kołodzkiej®*” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami) stawiane pracom doktorskim i w związku z



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Żywienia, Biotechnologii Zwierząt i Rybactwa

powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach z wnioskiem o dopuszczenie mgr inż. Joanny Grzegorzcyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 10 stycznia 2022 roku