

Bydgoszcz, dnia 03 grudnia 2022 roku

dr hab. inż. Ewa Grochowska, prof. PBŚ

Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Politechnika Bydgoska im. J. i J. Śniadeckich

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Mikszy-Cybulskiej

pt. „Wykorzystanie mikromacierzy SNP do określania zróżnicowania genetycznego krajowej populacji owiec górskich”.

Praca doktorska Pani mgr Anny Mikszy-Cybulskiej została wykonana w Zakładzie Hodowli Owiec i Kóz Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego (IZ PIB) w Balicach pod kierunkiem dr hab. Aldony Kawęckiej, prof. IZ PIB oraz dra hab. Artura Gurgula, prof. UR.

Podstawą do wydania opinii jest pismo Pana dra Krzysztofa Dudy, dyrektora IZ PIB (nr RN/I/6/22) oraz przesłana rozprawa doktorska.

Przedstawiona do oceny dysertacja Pani mgr Anny Mikszy-Cybulskiej dotyczy kwestii zróżnicowania genetycznego oraz analizy struktury genetycznej krajowej populacji owiec górskich w kontekście ochrony ich zasobów genetycznych, w związku z czym wpisuje się w zagadnienia z dyscypliny naukowej zootechnika i rybactwo. Trzy rasy owiec objęte badaniami: cakiel podhalański, polska owca górka oraz polska owca górka odmiany barwnej są obecnie objęte programem ochrony zasobów genetycznych, który ma na celu zachowanie tych ras, ich wzorców rasowych oraz stabilizację i zachowanie zmienności genetycznej tych populacji. Tematyka rozprawy jest więc aktualna i wpisuje się w ogólnoświatowe trendy badań w zakresie analizy zróżnicowania genetycznego, struktury populacji i presji selekcyjnej w różnych populacjach zwierząt gospodarskich. Należy zauważyć, iż w ostatnich kilkunastu latach miało miejsce bardzo szybki rozwój genetyki molekularnej oraz idący za tym rozwój narzędzi statystycznych i bioinformatycznych, co stworzyło naukowcom możliwości analizy nie tylko wybranych odcinków DNA, ale całego genomu zwierząt gospodarskich. Takie podejście jest o wiele bardziej informatywne niż stosowanie markerów mikrosatelitarnych czy sekwencji mitochondrialnego DNA do badania zróżnicowania genetycznego zwierząt. Pozwala na bardziej szczegółową analizę populacji i dostarcza dużo więcej danych na temat ich genomu. Ze względu

na fakt, iż populacje objęte ochroną zasobów genetycznych charakteryzują się stosunkowo niską liczebnością ważna jest systematyczna kontrola ich struktury genetycznej oraz zróżnicowania genetycznego. W tym ujęciu zastosowanie macierzy SNP stwarza nowe możliwości, a pojęty problem polegający na walidacji ich przydatności w rutynowej kontroli zróżnicowania genetycznego w populacji owiec górskich objętych ochroną zasobów genetycznych w Polsce uważam za zagadnienie warte rozpoznania, które ma nie tylko charakter naukowy, ale również praktyczny. Warto zwrócić uwagę, iż problematyka ta w odniesieniu do owiec górskich w Polsce, w dostępnym piśmiennictwie, nie jest zbyt powszechnie podejmowana. Praca wnosi więc nową wiedzę, a uzyskane wyniki mają znaczenie poznawcze. W tym miejscu należy również zaznaczyć, iż badania przeprowadzone w ramach przedstawionej do oceny dysertacji zostały sfinansowane ze środków projektu „Kierunki wykorzystania i ochrony zasobów genowych zwierząt gospodarskich w zrównoważonym rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego Programu Badań i Rozwoju „Środowisko, Rolnictwo i Leśnictwo” – BIOSTRATEG (BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016), co dodatkowo dowodzi aktualności podjętego przez Doktorantkę tematu w ramach rozprawy doktorskiej.

Dysertacja Pani mgr Anny Mikszy-Cybulskiej napisana jest w języku polskim w formie jednolitej monografii. Układ pracy i podział treści rozprawy jest tradycyjny. Rozprawa liczy 115 stron i składa się z następujących siedmiu rozdziałów głównych: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Stwierdzenia i wnioski, Piśmiennictwo. Ponadto autorka zawarła w dysertacji streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz prezentujący Objasnienia skrótów i symboli, Spis ilustracji oraz Materiały uzupełniające. Szata graficzna pracy jest staranna.

Rozdział „Wstęp” podzielony jest na pięć podrozdziałów i liczy 21 stron. W pierwszym podrozdziale autorka wprowadza czytelnika w tematykę badawczą prezentując historię hodowli i chowu owiec górskich w Polsce, omawiając wzorce rasowe tych zwierząt oraz prezentując zmiany stanu pogłowia tych ras owiec w latach 2008-2020. Opisany jest również sposób użytkowania owiec górskich oraz ich znaczenie zarówno dla społeczności, jak i ekosystemów Podhala, Beskidów i Podkarpacia. Rozdział uzupełniony został jednym wykresem oraz 8 zdjęciami, co podnosi walory estetyczne pracy i ułatwia analizę danych dotyczących pogłowia owiec w latach 2008-2020. W kolejnym podrozdziale Doktorantka przedstawiła tematykę ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich zwracając uwagę na znaczenie bioróżnorodności w zachowaniu bezpiecznej puli genetycznej zwierząt oraz problem spadku pogłowia owiec w Polsce. Przybliżyła również założenia i realizację „Programu ochrony zasobów genetycznych owiec” realizowanego w Instytucie Zootechniki w Krakowie. Podrozdział ten warto byłoby uzupełnić o definicję bioróżnorodności oraz opis metod ochrony zasobów genetycznych zwierząt

gospodarskich. W kolejnych podrozdziałach opisano molekularne metody stosowane w celu charakterystyki bioróżnorodności z uwzględnieniem mikromacierzy SNP i ich zastosowanie w hodowli owiec. Informacje zostały przedstawione w sposób przejrzysty i zrozumiały, co dowodzi dobrej znajomości tematu przez Doktorantkę i uzasadnia celowość podjętych badań. Opisy w tej części pracy powinny jednak zostać w kilku miejscach (np. str. 17, 18, 21, 23, 26) poparte odpowiednio dobranymi pozycjami z literatury. Odpowiednie uwagi naniosłam w przekazanym Autorce maszynopisie. Ze względu na fakt, iż rozdział „Wstęp” zawiera przegląd literatury z zakresu tematyki rozprawy doktorskiej, zalecam zmianę tytułu tego rozdziału na „Przegląd piśmiennictwa” oraz dodanie rozdziału „Wstęp”.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Cel pracy” Doktorantka przedstawiła ogólny cel badań oraz cele szczegółowe. Cele sformułowane są rzeczowo i poprawnie. Na uwagę zasługuje bardzo szeroki i kompleksowy zakres zaplanowanych przez Doktorantkę analiz statystycznych i bioinformatycznych. W tym rozdziale powinna zostać dodatkowo sformułowana hipoteza badawcza, a tytuł powinien być zmieniony na następujący: „Hipoteza badawcza i cel pracy”.

W rozdziale „Materiał i metody” opisano układ doświadczenia, pobrany materiał badawczy oraz zastosowane w pracy metody badawcze z zakresu genetyki molekularnej, genomiki, statystyki i bioinformatyki. Rozdział ten liczy 6 stron i składa się z 3 podrozdziałów. Do osiągnięcia zamierzonego celu Doktorantka pobrała materiał biologiczny (krew) od trzech ras owiec górskich: cakiel podhalański, polska owca górską i polska owca górską odmiany barwnej, co opisała w podrozdziale 3.1. Owce każdej rasy były odchowane w dwóch różnych stadach w różnych lokalizacjach. Ten podrozdział warto byłoby uzupełnić o dane dotyczące spokrewnienia badanych zwierząt w stadach. Ta informacja jest ważna w kontekście analiz statystycznych. Tytuł Tabeli 1 sugerowałabym zmienić na następujący „Liczebność grup owiec i miejsca pobrania materiału biologicznego”. Przy Rycinie 1 należy podać źródło, z którego zaczerpnięto mapę. W następnym podrozdziale Doktorantka opisała przeprowadzone analizy molekularne. Z pobranej krwi wyizolowano DNA i przeprowadzono genotypowanie przy użyciu mikromacierzy SNP OvineSNP50 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA). Wybór tego narzędzia badawczego oceniam jako poprawny i interesujący w kontekście celu badań w ramach rozprawy doktorskiej. Sformułowanie „kontrola stężenia” na str. 35 powinno być jednak zmienione na „Analiza ilościowa i jakościowa DNA”, natomiast na str. 36 na „pomiar stężenia DNA”. Wartościowe w tym punkcie byłoby również przeprowadzanie analizy jakościowej DNA w żelu agarozowym. W podrozdziale 3.3. Doktorantka opisała metody statystyczne oraz specjalistyczne programy komputerowe zastosowane w celu oceny poziomów błędów genotypowania, szacowania wskaźnika zmienności genetycznej, efektywnej wielkości populacji, identyfikacji sygnatur

różnicującej selekcji pomiędzy badanymi rasami, identyfikacji sygnatur kierunkowej selekcji, analizy regionów genomu podlegających różnicującej bądź kierunkowej selekcji pod kątem kodowanych przez nie genów, wizualizacji zmienności i zróżnicowania genetycznego. Metody statystyczne i narzędzia bioinformatyczne zostały dobrane prawidłowo i adekwatnie do zamierzonych celów dysertacji. Na uwagę zasługuje szeroki i zaawansowany zakres pojętych analiz statystycznych i bioinformatycznych. Zdobyte tak szerokiej wiedzy z zakresu statystyki, genetyki molekularnej i genomiki oraz umiejętności stosowania różnorodnych metod statystycznych i programów bioinformatycznych wymagały od Doktorantki na pewno dużego wysiłku intelektualnego. W tym podrozdziale program PLINK v1.9, baza Ensembl, narzędzie DAVID oraz definicja efektywnej wielkości populacji powinny zostać poparte cytowaniami odpowiednich artykułów naukowych.

Rozdział „Wyniki” podzielono na 8 podrozdziałów. Uzyskane rezultaty analiz statystycznych i bioinformatycznych są zgodne z zakładanymi celami badań rozprawy doktorskiej. Obszerne wyniki badań Doktorantka zestawiała w formie 23 wykresów i 10 tabel. Przedstawione wyniki są interesujące. Mają nie tylko wartość poznawczą, ale również praktyczną. Mogą bowiem zostać wykorzystane w hodowli owiec górskich. Do tego podrozdziału mam drobne uwagi, głównie o charakterze edytorskim:

- proszę doprecyzować parametry SNP, które zostały zastosowane do kontroli jakości zbioru danych (filtrowania) przed obliczeniami statystycznymi. Zauważyłam rozbieżności w tej kwestii między parametrami opisanymi w rozdziale „Materiał i metody” i „Wyniki”;
- sugeruję zmianę sformułowania „markery bardzo silnie odchylające się od stanu równowagi” na „markery wykazujące odchylenie od prawa Hardy’ego-Weinberg’a na poziomie istotności $p < 0,0001$ ” na str. 36, 40, 42, 43. Podobna korekta powinna zostać naniesiona konsekwentnie w całej pracy.
- efektywna wielkość populacji objętych badaniami ras owiec została przedstawiona w Tabeli 6. Wykres 10 jest powtórzeniem tych samych wyników, dlatego powinien zostać usunięty.

Uzyskane wyniki zostały przedyskutowane w rozdziale „Dyskusja” składającym się z trzech podrozdziałów. Redakcja tej części dysertacji wskazuje na znajomość piśmiennictwa światowego z zakresu prowadzonych badań. W pierwszym i trzecim podrozdziale Doktorantka powinna jednak zacząć dyskusję poszczególnych problemów w pierwszej kolejności od omówienia i interpretacji własnych wyników badań, a następnie przedstawić efekty badań innych autorów. W podrozdziale drugim kolejność omawianych wyników jest poprawna. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę, iż w niektórych miejscach dyskusja ma charakter przeglądu literatury, a nie krytycznej interpretacji wyników własnych analiz w kontekście

rezultatów uzyskanych przez innych naukowców. Prowadzenie dyskusji w postaci syntetycznej konfrontacji wyników badań własnych z danymi literaturowymi to umiejętność, którą doskonalili się jednak przez lata pracy naukowej. Z tego względu dyskusję uznaję za zadowalającą na obecnym etapie rozwoju naukowego Doktorantki.

Dysertacja została zakończona rozdziałem „Stwierdzenia i wnioski”. Sformułowane stwierdzenia i wnioski wynikają z założonych celów dysertacji, a ich treść jest zgodna z otrzymanymi przez Doktorantkę wynikami badań. Następujący wniosek „Możliwość uzyskania kompleksowych informacji na temat genetycznej różnorodności badanych populacji wskazuje na przydatność mikromacierzy SNP do określenia zmienności genetycznej rodzimych ras owiec” pojawiał się dwukrotnie na pozycji 8. i 10. listy. Wniosek powinien zostać usunięty z pozycji 8.

Kolejny rozdział zatytułowany „Piśmiennictwo” zawiera spis 107 pozycji literatury oraz wykaz 11 stron internetowych. Warty uwagi jest fakt, iż w przeważającej części są to artykuły anglojęzyczne, które ukazały się w ostatnich 10 latach w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym. Niestety nie wszystkie pozycje piśmiennictwa oraz strony internetowe cytowane w tekście zostały umieszczone w spisie literatury. Również niektóre pozycje z wykazu piśmiennictwa nie zostały zacytowane w tekście pracy. Ponadto wykaz stron internetowych powinien zostać opatrzony datami dostępu do informacji zawartych na tych stronach i posortowany alfabetycznie. Styl cytowania prac nie jest jednolity pod względem formatu i wymaga korekty edytorskiej w tej kwestii.

Kolejnym elementem dysertacji, który Doktorantka umieściła po rozdziale „Piśmiennictwo”, jest wykaz zatytułowany „Spis ilustracji”. Zestawienie to zawiera nie tylko wykaz 8 zdjęć, ale również spis 11 tabel i 24 wykresów. W związku z tym tytuł spisu powinien zostać zmieniony i odpowiednio dopasowany do jego zawartości.

Ostatnia część dysertacji zatytułowana „Materiały uzupełniające” zawiera 5 zestawień w formie tabelarycznej, które zawierają informacje na temat genów zlokalizowanych w obszarach sygnatur selekcji dla każdej badanej rasy osobno i trzech ras łącznie, jak również procesów biologicznych kontrolowanych przez geny wykryte w regionach podległych różnicującej selekcji pomiędzy rasami owiec górskich. Pojedyncze zestawienia zajmują od 2 do 4 stron. Umieszczenie nagłówek tabeli na każdej nowej stronie zestawienia ułatwiłoby czytelnikowi analizę prezentowanych w tabelach danych. Ponadto nagłówki kolumn w zestawieniach tabelarycznych powinny zostać przetłumaczone na język polski.

Autorka zawarła w dysertacji również streszczenie w języku polskim i angielskim, które w odpowiedni sposób przedstawia zasadność podjętej tematyki badawczej, prezentuje założone

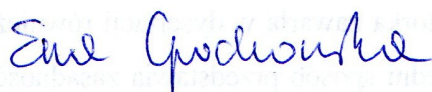
cele rozprawy doktorskiej, materiał do badań, zastosowanie metody analiz, otrzymane przez Doktorantkę rezultaty badań oraz wnioski końcowe.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia edytorskie w dysertacji, które zaznaczyłam w maszynopisie pracy przekazanej Doktorantce. Do strony edytorskiej rozprawy mam dodatkowo kilka drobnych uwag:

- w rozdziale „Wstęp” wszystkie zdjęcia powinny być cytowane w tekście pracy;
- na wykresie 1 należy nadać nazwy osiom X i Y;
- należy ujednoczyć sposób cytowania piśmiennictwa w całej rozprawie doktorskiej. Doktorantka powinna wybrać jeden format np. Sabeti i wsp. (2002) lub Sabeti i in. (2002) i konsekwentnie stosować go w całej pracy;
- geny, SNP, markery, itd., znajdują się „w chromosomach” nie „na chromosomach”;
- w tabelach, które zajmują więcej niż jedną stronę, nagłówki kolumn powinny być powtórzone na każdej nowej stronie. Taka prezentacja ułatwia czytelnikowi analizę danych w tabelach.

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Pani mgr Anna Miksza-Cybulska wykazała się znajomością problematyki badawczej z zakresu tematu pracy. Potrafi zastosować odpowiednie metody badawcze oraz statystyczne do opracowania wyników. Umie analizować wyniki badań własnych. Przedstawione w niniejszej opinii uwagi i spostrzeżenia mają charakter pomocniczy. W przeważającej części są to uwagi o charakterze edytorskim, które w żadnym stopniu nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej. W mojej opinii efekty badań Doktorantki są ciekawe i stanowią dobre opracowanie podjętego problemu badawczego.

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska autorstwa Pani mgr Anny Mikszy-Cybulskiej stanowi oryginalne opracowanie problemu naukowego i tym samym odpowiada wymogom stawianym dysertacją doktorskim w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) oraz Ustawie z dnia 3 lipca 2018 roku. - Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.). W związku z tym przedkładałam Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Mikszy-Cybulskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. inż. Ewa Grochowska, prof. PBŚ