

Olsztyn, 21.11.2022 r.

Prof. dr hab. Urszula Czarnik
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
UWM w Olsztynie

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Mikszy-Cybulskiej
pt. Wykorzystanie mikromacierzy SNP do określania zróżnicowania genetycznego
krajowej populacji owiec górskich,
wykonanej pod kierunkiem **dr inż. Aldony Kawęckiej, prof. IŻ** i
promotora pomocniczego **dr. hab. Artura Gurgula, prof. IŻ**

Owce jako najwcześniej udomowiony gatunek zwierząt gospodarskich przez wiele lat stanowiły podstawę dobrobytu gospodarczego i bezpieczeństwa żywnościowego oraz dziedzictwa kulturowego wielu krajów. Wraz z rozwojem intensywnej produkcji rolnej hodowla owiec systematycznie zmniejszała się, co wyraźnie zaznaczyło się pod koniec minionego stulecia. Rasy rodzime mimo posiadania unikalnych cech użytkowych i adaptacyjnych nie spełniały wymogów wielkotowarowej hodowli i były wypierane przez rasy wysoko wydajne. Problem ten dotknął również rasy górskie, których ekstensywny wypas od zawsze służył zachowaniu krajobrazów cennych przyrodniczo i stanowił podstawę egzystencji lokalnej społeczności polskich Karpat. Konsekwencją tych zmian była systematyczna utrata zmienności genetycznej i zawężanie bioróżnorodności. Dlatego też Polska chcąc ochronić rodzime rasy zwierząt gospodarskich, w tym owce, włączyła się do programu ochrony zasobów genetycznych. Zarządzanie zasobami genetycznymi wymaga przede wszystkim pełnej wiedzy na temat ras, wielkości populacji, struktury genetycznej oraz zmienności w obrębie rasy i między rasami. Dlatego też uważam, że podjęta w przedłożonej do oceny rozprawie doktorskiej tematyka badawcza dotycząca charakterystyki struktury genetycznej ras górskich z wykorzystaniem nowoczesnych metod mikromacierzy SNP jest w pełni uzasadniona i wpisuje się w cykl badań Instytutu Zootechniki PIB w Balicach nad ochroną zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w Polsce.

Charakterystyka pracy

Praca doktorska mgr Anny Mikszy-Cybulskiej stanowi solidną syntezę wiedzy na temat możliwości wykorzystania mikromacierzy SNP do określania zróżnicowania

genetycznego krajowej populacji owiec górskich a następnie monitorowania zmian w jej strukturze genetycznej w celu skutecznej realizacji programu ochrony ras zagrożonych wyginięciem. Ma ona formę klasycznej rozprawy naukowej i obejmuje rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Stwierdzenia i wnioski oraz Piśmiennictwo, tworzące łącznie wraz ze spisem treści, wykazem stosowanych skrótów, spisem ilustracji oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim przejrzystą strukturę całości opracowania liczącą 99 stron maszynopisu. W pracy na 16. stronach zamieszczono również „Materiały uzupełniające” zawierające 6 suplementów odnoszących się do części wynikowej pracy. Dysertacja została napisana z zachowaniem właściwej sekwencji omawianych zagadnień a poszczególne fragmenty tekstu zawierają informacje podane w sposób uporządkowany i przejrzysty. Na podkreślenie zasługuje staranność przygotowana strony graficznej a zamieszczone ryciny umożliwiają śledzenie omawianych zagadnień. Wykaz cytowanej literatury jest obszerny i obejmuje 107 pozycji, z których 32 to prace polskojęzyczne, których uwzględnienie było niezbędne ze względu na fakt, że praca ta dotyczy ras polskich.

W rozdziale **Wstęp** Autorka zamieściła dokładną charakterystyką trzech ras owiec górskich uwzględnionych w badaniach, tj.: cakiel podhalański, polska owca górska i polska owca górska odmiany barwnej wraz z historią ich tworzenia oraz kierunkami użytkowania. W dalszej części omówiła zagadnienia dotyczące ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich z uwzględnieniem chronologii wdrażania programów ochrony ras i gatunków owiec zagrożonych wyginięciem. W rozważaniach tych odniosła się do roli Instytutu Zootechniki w Balicach jaką pełni w ich opracowywaniu i wdrażaniu. Dużo miejsca poświęciła na omówienie zagadnień dotyczących metod molekularnych wykorzystywanych do oceny zróżnicowania i analizy struktury genetycznej populacji. Uwzględniając kolejność ich stosowania na przestrzeni ostatnich lat dokonała kompletnego przeglądu wiedzy na temat roli polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnych (STR, ang. Short Tandem Repeats), zmienności mitochondrialnego DNA (mtDNA) oraz polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP, ang. Single Nucleotide Polymorphism) uzyskanego techniką mikromierzy i genotypowania poprzez sekwencjonowanie (GBS, genotyping-by-sequencing). Następnie Autorka skupiła się na omówieniu możliwości wykorzystaniu mikromacierzy SNP w badaniach genetycznych, w tym w analizie struktury genetycznej populacji ze szczególnym uwzględnieniem możliwości monitorowania zmian struktury i zmienności w populacji owiec.

Reasumując w tej części rozprawy Autorka przedstawiła skondensowaną wiedzę z obszaru badawczego, w którym mieści się przygotowana rozprawa a wielowątkowa i staranna kompilacja wyników badań krajowych i zagranicznych świadczy o dobrej znajomości zagadnienia. Właściwy dobór pozycji bibliograficznych pozwolił Autorce wytyczyć cel pracy z pięcioma celami szczegółowymi, które odzwierciedlają poszczególne etapy przeprowadzonych badań i analiz. Należy sądzić, że przy przygotowaniu pracy do druku całość opracowania zostanie podzielona na mniejsze fragmenty, co zmusi Autorkę do przeredagowania celu pracy. Obecnie w 1 zadaniu zamieszczonym w 6-ciu wierszach zawarła zbyt dużo informacji, przez co stał się on mało przejrzysty. Szkoda też, że przy tak szerokim spektrum badań Autorka nie podjęła się trudu sprecyzowania hipotezy badawczej.

W rozdziale **Materiał i metody** Autorka opisała zgromadzony do badań materiał zwierzęcy, przeprowadzone analizy laboratoryjne, techniki molekularne oraz kolejność działań z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych i statystycznych zmierzających do osiągnięcia założonego celu pracy. W badaniach Autorka uwzględniła 3 rasy owiec górskich tj.: cakiel podhalański, polska owca górską i polska owca górską odmiany barwnej, uwzględniając w każdej grupie prawie identyczną liczbę osobników (odpowiednio: 100 szt., 103 szt. i 97 szt.), co jest niewątpliwie dużym atutem rozprawy. Na podkreślenie zasługuje również zestawienie tabelaryczne materiału badawczego wraz informacją o miejscu pochodzenia. Należy podkreślić, że materiał zwierzęcy jest odpowiednio liczny, zaproponowane metody analityczne są dobrze dobrane do uzyskania odpowiedzi na postawione cele pracy. Wrażenie robi również bogaty panel badanych parametrów, który Autorka dokładnie opisuje w kolejnych podrozdziałach części metodycznej pracy. Reasumując rozdział ten został opracowany z bardzo dużą starannością i dbałością o możliwości percepcyjne czytelnika.

Rozdział – **Wyniki** - zawiera opisową, graficzną i tabelaryczną prezentację uzyskanych wyników. W tej części Autorka w sposób wiarygodny, wręcz fotograficzny omówiła uzyskane wyniki z kolejnych etapów badań i przeprowadzonych analiz. W pierwszej części dokonała charakterystyki parametrów panelu markerów użytych do analiz. Po przeprowadzeniu filtrowania wszystkich uzyskanych markerów SNP pochodzących z mikromacierzy Ovine SNP50 BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA), ostatecznie w dalszych analizach Autorka uwzględniła 47 592 markerów SNP. Ujednolicenia wymaga jednak informacja dotycząca procentowego udziału odrzuconych markerów SNP

z brakującymi genotypami. W części metodycznej na str. 36 podała, że ich udział wynosił 10%, natomiast w części wynikowej str. 40 – 20%. Wykorzystując bogaty zestaw markerów SNP określiła szeroki panel wskaźników zmienności genetycznej wskazując, że badane rasy różnią się strukturą genetyczną z zachowaniem pewnej puli genów wspólnych, co może wskazywać na ich tożsame pochodzenie filogenetyczne. Istotną informacją było wykazanie, że badane populacje charakteryzują się niską wartością współczynnika inbredu, co świadczy o braku zagrożenia chowem wsobnym oraz, że najwyższe wartości dystansu genetycznego występują między POG i POGB a najniższe między CP i POG. Po szczegółowej analizie wszystkich uzyskanych wyników Autorka jednoznacznie wskazała, że informacje genomyczne mogą być wykorzystywane w monitoringu i zarządzaniu populacjami zagrożonych wyginięciem.

W mojej ocenie opis wyników jest kompletny i szczegółowy. Wyniki przeprowadzonych badań Autorka zamieściła w 10. tabelach i na 23. wykresach. Mnogość otrzymanych wyników jest możliwa do weryfikacji dzięki dobrej konstrukcji tabel i czytelności wykresów. Dodatkowym atutem tego rozdziału jest zachowanie sekwencyjności interpretacji wyników z zgodnie z informacjami zamieszczonymi w części metodycznej pracy.

Dyskusja wyników jest merytoryczna, bezpośrednio nawiązuje do zakresu przeprowadzonych badań i została napisana z dużą znajomością zagadnienia i literatury źródłowej. Pani mgr Anna Miksz-Cybulska rzetelnie omówiła znaczenie uzyskanych wyników na tle badań przeprowadzonych przez innych autorów. Uważam, że jest to bardzo interesująca część rozprawy.

Rozprawa zakończona jest jedenastoma (jeden powtórzony) logicznie sformułowanymi stwierdzeniami i wnioskami. Na ogół zamieszczone w punktach informacje stanowią podsumowanie uzyskanych wyników. Autorka wskazuje przydatność mikromacierzy SNP do określania zmienności genetycznej rodzimych ras owiec, przy czym informacja ta została podana aż dwukrotnie. Jako wniosek należy uznać pkt ostatni zamieszczony na str. 86, w którym Autorka wskazuje, że informacje genomyczne mogą być wykorzystywane w monitoringu i zarządzaniu populacjami zagrożonymi wyginięciem. Należy podkreślić dużą ostrożność Autorki przy formułowaniu wniosków.

Podsumowanie

Reasumując stwierdzam, że praca doktorska mgr Anny Mikszy-Cybulskiej pt. **Wykorzystanie mikromacierzy SNP do określania zróżnicowania genetycznego krajowej populacji owiec górskich**, jest cenną, nowatorską i perspektywicznie ważną pozycją piśmiennictwa naukowego. Wnosi oryginalne wyniki, istotnie poszerzające wiedzę z zakresu wykorzystania mikromacierzy SNP do określenia zróżnicowania genetycznego owiec ras górskich, mających szczególne znaczenie w kulturze górali i kształtowaniu krajobrazu górskiego. Wartość rozprawy powiększa fakt, iż uzyskane informacje genomowe dotyczą ras rodzimych o zagrożonej egzystencji i objętych programem ochrony zasobów genetycznych. Należy podkreślić, że w Polsce w hodowli owiec, dotychczas nie stosowano programów doskonalenia zwierząt wspomaganych genomicznie. Z pewnością będzie to cytowana pozycja literatury naukowej. Wszechstronność przeprowadzonych analiz świadczy o dużej wiedzy merytorycznej oraz doskonałym opanowaniu nowoczesnych technik analitycznych i statystycznych. Zgromadzone informacje z zakresu genetyki molekularnej, bioinformatyki i statystyki umiejętnie powiązane ze sobą są niewątpliwie walorem rozprawy. Wymienione w recenzji nieliczne uwagi mają wyłącznie charakter porządkowy i nie obniżają ogólnej, pozytywnej oceny merytorycznej opracowania.

Wniosek końcowy

Oceniając wysoko poziom naukowy, oryginalność i przydatność praktyczną uzyskanych wyników stwierdzam, że praca doktorska mgr Anny Mikszy-Cybulskiej pt. **Wykorzystanie mikromacierzy SNP do określania zróżnicowania genetycznego krajowej populacji owiec górskich**, spełnia wymogi określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, z 2003 r., poz. 595 z póź. zmianami) oraz w przepisach wprowadzającym ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z póź.zm.). Dlatego zgłaszam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Zootechniki PIB w Krakowie o przyjęcie pracy mgr Anny Mikszy-Cybulskiej bez zastrzeżeń i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Urszula Czarnik