

dr hab. inż. Daniel Polasik, prof. ZUT
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Genetyki
Al. Piastów 45, 70-311 Szczecin

Szczecin, 08.09.2023r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Angeliki Mąsior w formie zbioru publikacji
zaprezentowanego pod tytułem:**

"Identyfikacja mieszańców lama x alpaka na podstawie analiz DNA"

Hodowla alpaka w Polsce jest stosunkowo młodą lecz dynamicznie rozwijającą się dziedziną zootechniki. Wełna otrzymywana z alpaka jest jednym z najbardziej cenionych włókien na świecie. Cechuje się niezwykłą miękkością, przy czym jest bardzo wytrzymała, ciepła i hipoalergiczna. Niestety hodowcy dopuszczają do krzyżowania alpaka z lamami w celu uzyskania większej ilości wełny, co wiąże się z pogorszeniem jej parametrów. O ile mieszańce z pierwszego pokolenia łatwo jest zidentyfikować na podstawie cech fenotypowych, o tyle w dalszych pokoleniach jest to utrudnione, a wręcz niemożliwe. Dlatego też należy poszukiwać alternatywnych metod, które pozwalają na szybką i precyzyjną identyfikację hybryd alpaka x lama.

Przedłożona praca doktorska Pani mgr inż. Angeliki Mąsior wpisuje się w nurt badań dotyczących ustalenia stopnia hybrydyzacji międzygatunkowej, a także określenia struktury genetycznej populacji alpaka utrzymywanych w Polsce z użyciem różnych typów markerów DNA.

Praca została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Zwierząt Instytutu Zootechniki, Państwowego Instytutu Badawczego, pod kierunkiem dr hab. inż. Katarzyny Piórkowskiej, prof. IZ i sfinansowana ze środków Instytutu.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w cyklu dwóch publikacji oryginalnych, a możliwość zastosowania wysokopręskustowej metody analizy DNA w celu ich kontynuacji w formie jednej publikacji przeglądowej:

- **Podbielska A.**, Piórkowska K., Szmatoła T. Microsatellite-based genetic structure and hybrid detection in alpacas bred in Poland. *Animals* 2021, 11, 2193;
- **Podbielska A.**, Piórkowska K. Examination of D-loop region and *DBY* gene as tools for identifying hybridisation in alpacas (*Vicugna pacos*) based on Polish populations. *Small Ruminant Research* 2022, 211, 106690;
- **Podbielska A.**, Piórkowska K. Genotyping-by-sequencing (GBS) as a tool for interspecies hybrid detection. *Annals of Animal Science* 2022, 22, 1185-1192.

Łączna wartość wymienionych prac wynosi 340 punktów MNiSW, a ich sumaryczny współczynnik Impact Factor - 7,7. Zbiór publikacji stanowi logiczną i spójną całość; we wszystkich doktorantka jest pierwszym autorem, co świadczy o jej przeważającej roli w ich powstaniu. Z załączonych do dysertacji oświadczeń wynika, że Pani mgr inż. Angelika Mąsior brała udział w opracowaniu koncepcji, pozyskaniu finansowania, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji otrzymanych wyników oraz napisaniu pierwotnych wersji manuskryptów.

Prezentacja publikacji naukowych stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora została poprzedzona streszczeniem zarówno w języku polskim jak i angielskim, wstępem, określeniem szczegółowych celów i zakresu badań, zwięzłym opisem każdej z wyżej wymienionych publikacji, podsumowaniem i wnioskami, wykazem literatury a także oświadczeniami współautorów publikacji.

Doktorantka w swej rozprawie przedstawiła 2 cele badawcze, a ich realizacja została podzielona na 4 oddzielne zagadnienia. Nadrzędnym celem badań była analiza zmienności genetycznej alpak utrzymywanych w kraju oraz ustalenie stopnia ich hybrydyzacji. W mojej opinii problem podjętych badań jest niezwykle aktualny oraz oryginalny, chociażby ze względu na bardzo zróżnicowane pochodzenie alpak w Polsce, które w dużej mierze pozostaje nieznanne. Badania tego typu nie były prowadzone w naszym kraju a ich wyniki oprócz aspektu poznawczego mogą mieć również aspekt praktyczny, szczególnie dla hodowców tego gatunku

Ze względu, że zaprezentowane przez doktorantkę publikacje zostały wcześniej dokładnie i rzeczowo ocenione przez odpowiednio dobranych recenzentów - specjalistów w dziedzinie prowadzonych badań, pozwolę sobie na bardzo krótką analizę każdej z nich z osobna wraz z komentarzem.

W publikacji zatytułowanej "*Microsatellite-based genetic structure and hybrid detection in alpacas bred in Poland*" doktorantka wykorzystała 17 markerów mikrosatelitarnych rekomendowanych przez ISAG (*International Society for Animal Genetics*) do określenia struktury genetycznej i zmienności populacji alpak utrzymywanych w Polsce. Do badań oprócz alpak użyto także prób uzyskanych od lam oraz hybryd alpaka x lama, ze względu wcześniej wspomniany proceder krzyżowania tych gatunków przez hodowców. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano dużą zmienność genetyczną populacji alpak w Polsce jak i przydatność użytych markerów do różnicowania obu gatunków i oceny stopnia ich domieszki. Oszacowano, że lamy czystorasowe stanowią 91,2% analizowanej próby, natomiast udział mieszańców wynosi 8,8%.

Autorzy podali w publikacji koszt zakupu alpaki (1400-1800€) jak i cenę wełny alpaki (35-50€/kg). Sądzę, że korzystnie byłoby podać także ile wełny można uzyskać z jednej strzyży, jak często się je wykonuje i jak długo użytkuje się zwierzęta, aby mieć przybliżony obraz opłacalności utrzymania tych zwierząt.

Uważam, że Rycina 2. mogłaby zawierać dodatkowe dane, a mianowicie wskazanie kontrolnej hybrydy alpaka x lama, hybryd domniemanych i linię/punkt odcięcia pomiędzy lamami uznanymi za czystorasowe i wykazującymi domieszkę lamy, gdyż ciężko to ocenić na podstawie intensywności czarnej barwy.

Publikacja pt "*Examination of D-loop region and DBY gene as tools for identifying hybridisation in alpacas (Vicugna pacos) based on Polish populations*" stanowi kontynuację wcześniej podjętych badań. Część eksperymentalna obejmowała sekwencjonowanie genu *DBY* (*DEAD-Box Helicase 3 Y-Linked*), zlokalizowanego na chromosomie Y oraz niekodującego fragmentu genomu mitochondrialnego, cechującego się dużą zmiennością, a mianowicie pętli D (*D-loop*). Sekwencjonowanie wykonane metodą Sangera pozwoliło na wykrycie 4 wariantów genu *DBY*, które posłużyły do wygenerowania 2 haplotypów oraz aż 446 miejsc segregacji w genie *D-loop*, pozwalających na określenie 34 haplotypów. Analiza pętli D wykazała duży stopień introgresji mtDNA pomiędzy alpakami i lamami, co potwierdziło hybrydyzację pomiędzy tymi gatunkami w linii żeńskiej. W przypadku genu *DBY* nie wykazano hybrydyzacji w linii męskiej, natomiast wykryte warianty były gatunkowo-specyficzne, dzięki czemu mogą w przyszłości zostać wykorzystane jako markery do identyfikacji alpak i lam.

Pod numerami akcesyjnymi sekwencji (OL456726 - OL456762) zdeponowanych przez doktorantkę widnieje informacja, że analizowany fragment obejmował również fragment genu kodujący tRNA dla proliny. Uważam, że ta informacja powinna się znaleźć w publikacji, wraz ze wzmianką czy miejsca segregujące zostały zidentyfikowane tylko we fragmencie pętli D czy również w genie *tRNA-Pro*.

Chciałbym także, aby doktorantka wyjaśniła dlaczego używała różnych zestawów do oczyszczania amplikonów *DBY* i *D-loop* przed sekwencjonowaniem.

Ostatnia publikacja zatytułowana "*Genotyping-by-sequencing (GBS) as a tool for interspecies hybrid detection*" przedstawia możliwość zastosowania jednej z metod sekwencjonowania następnej generacji (NGS) do wykrywania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs) na szeroką skalę genomową. Autorzy szczegółowo opisali zasadę działania metody GBS z uwzględnieniem jej zalet jak i ograniczeń, a następnie wskazali możliwość jej praktycznego zastosowania do wykrywania hybryd międzygatunkowych, do wytworzenia których mogło dojść nawet kilka pokoleń wcześniej. W publikacji przytoczone zostały liczne przykłady aplikacji metody GBS u ptaków, gadów, ryb i owadów oraz wskazano perspektywy jej użycia w przyszłości.

Czując mały niedosyt, prosiłbym aby doktorantka wskazała czy metoda GBS była także używana do analizy tożsamości gatunkowej ssaków, być może uwzględniających zwierzęta gospodarskie.

W odniesieniu do dysertacji mam tylko jedną drobną uwagę. Na stronie 9. rozprawy doktorantka opisała markery STR, jak i SNP, a zaraz po tym na stronie 10. napisała, że

"Innym markerem wykorzystywanym do oceny stopnia hybrydyzacji w linii matczynej jest mitochondrialne DNA - mtDNA". Uważam, że jest to skrót myślowy, gdyż w pętli D mtDNA można wykryć zarówno markery typu SNP, STR (np. powtórzenie $(CA)_n$ zidentyfikowane u ludzi) jak i INDELe. Trzeba to wyraźnie rozgraniczyć gdyż STRy, SNPy, INDELe to typy markerów, natomiast *D-loop* i *DBY* wskazują pozycję, gdzie te markery mogą zostać zidentyfikowane.

Należy podkreślić, że zarówno w dysertacji jak i w poszczególnych publikacjach doktorantka wykorzystwała bardzo bogatą bibliografię, obejmującą głównie pozycje anglojęzyczne, w dużej mierze aktualne, które doskonale obrazują i potwierdzają tematykę podjętych badań oraz możliwość ich kontynuacji.

Materiał badawczy użyty do przeprowadzonych analiz uważam za wystarczający i reprezentatywny. Bardzo dobrym rozwiązaniem było wykorzystanie oprócz prób uzyskanych od alpaka także hybryd alpaka x lama. Doktorantka w sposób prawidłowy dobrała metody badawcze, motywując potrzebę użycia każdej z nich. Zastosowane techniki analizy markerów genetycznych, a mianowicie elektroforeza kapilarna DNA mikrosatelitarnego oraz sekwencjonowanie metodą Sanger'a są dość powszechnie stosowane i pozwalają na uzyskanie powtarzalnych i wiarygodnych wyników. Zostały one opisane bardzo szczegółowo i przejrzysto, spełniając wymagania stawiane opracowaniom naukowym. Wybór typów markerów DNA oraz ich lokalizację uważam za trafne i należyście uzasadnione. Markery mikrosatelitarne cechuje wysoki poziom polimorfizmu, dzięki czemu są bardzo informatywne i powszechnie stosowane w analizach populacyjnych. Wykorzystanie w badaniach genu *DBY* zlokalizowanego na chromosomie Y oraz pętli D mieszczącej się w genomie mitochondrialnym jest niezwykle istotne ze względu na monitorowanie linii hybrydyzacji, zwłaszcza w aspekcie praktycznym o którym doktorantka wspomniała w publikacji. Dotyczy on krzyżowania osobników męskich alpaka z samicami lam w celu zwiększenia populacji produkującej droższe włókna oraz osobników żeńskich alpaka z samcami lam w celu uzyskania wełny o większej wadze.

Na szczególną uwagę zasługuje analiza bioinformatyczna uzyskanych wyników badań. Klastrowanie bayesowskie wykorzystane do oceny stopnia hybrydyzacji, analiza struktury i zmienności populacji, wygenerowanie haplotypów, wykresu analizy głównych współrzędnych i dendrogramów metodami UPGMA i NJ wymagało użycia licznych narzędzi bioinformatycznych, które w mojej opinii zostały prawidłowo dobrane i odpowiednio zastosowane.

Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w postaci licznych wykresów, tabel i rycin, które są czytelne i umożliwiają ich poprawną interpretację, a także lepsze zrozumienie przez ich czytelnika.

Wykorzystanie przez doktoranta aktualnych technik z zakresu analizy DNA oraz skomplikowanych metod bioinformatycznych budzi podziw i uznanie oraz świadczy o jego dużej wiedzy i zaangażowaniu w realizację podjętych zadań badawczych. Ponadto wybór i

szczegółowa charakterystyka metody GBS świadczy o tym, że Pani mgr inż. Angelika Mąsior chce się dalej rozwijać, poznawać i wdrażać nowe technologie oraz dociekać rozwiązań podjętego problemu badawczego. W mojej opinii jest to jedna z najważniejszych cech, która powinna cechować dobrego naukowca.

Na podstawie przeprowadzonych analiz doktorantka sformułowała 10 wniosków, w których udowodniła słuszność wyboru typów i lokalizacji markerów DNA, dużą różnorodność genetyczną alpak w polskich hodowlach, stopień hybrydyzacji i jej linię oraz możliwość aplikacji wariantów genu *DBY* w identyfikacji gatunkowej. Równocześnie wspomniano o pewnych ograniczeniach zastosowanych markerów jak i o fakcie braku całkowitego rozdzielnia genetycznego lam od alpak. Pani mgr inż. Angelika Mąsior wskazała potrzebę kontynuacji badań na większej ilości zwierząt z włączeniem wysokoprzepustowej metody analizy DNA.

Reasumując, wyniki uzyskane w zakresie przedstawionego cyklu publikacji stanowią logiczne, zharmonizowane, a także kompleksowe rozwiązanie.

Wymienione przez mnie uwagi i zapytania w żaden sposób nie umniejszają wartości zaprezentowanego cyklu publikacji. Wynikają głównie z mojej ciekawości i chęci doprecyzowania szczegółów. Przedstawioną dysertację oceniam bardzo wysoko zarówno pod względem merytorycznym jak i jej formy.

Niniejszym zaświadczam również, że przedłożona praca doktorska wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny naukowej, w której Pani mgr inż. Angelika Mąsior wszczęła przewód doktorski, a mianowicie "Zootechnika i rybactwo". Uzyskane wyniki mają zarówno aspekt poznawczy jak i aplikacyjny, gdyż po raz pierwszy opisują strukturę genetyczną populacji alpak w Polsce, wskazują stopień i linię hybrydyzacji z lamami, jak również dostarczają narzędzi do identyfikacji gatunkowej, co może zostać wykorzystane w programach hodowlanych alpak. Ponadto wskazują perspektywę kontynuacji badań z użyciem jednej z metod z zakresu genomiki, która w odniesieniu do innych technik cechuje się niższymi kosztami analizy oraz mniejszym nakładem pracy.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedłożona praca doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku: o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 2 oraz ust. 3 pkt 2b Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. - Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1669 z późn. zm.) i przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o przyjęcie rozprawy oraz dopuszczenie Pani mgr inż. Angeliki Mąsior do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Daniel Polasik, prof. ZUT