



Dr hab. inż. Artur Gurgul, Prof. URK
Ośrodek Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
ul. Rędzina 1C, 30-248 Kraków

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Karola Puchały
pt.: „*Kompleksowa analiza zmienności genetycznej polskiej populacji sokoła wędrownego (Falco peregrinus)*”

Ogólna charakterystyka pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr inż. Karola Puchały została wykonana w Katedrze Genetyki i Ochrony Zwierząt, Instytutu Nauk o Zwierzętach, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, pod opieką naukową Prof. dr hab. Wandy Olech-Piaseckiej. Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią dwie oryginalne prace naukowe, napisane w języku angielskim, obie opublikowane w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports, którego wskaźnik impact factor (wg. danych zamieszczonych w dysertacji, zgodnie z rokiem publikacji) wynosi 3,5, a punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa wynosi - 100 pkt.

Artykuły wchodzące w skład dysertacji:

1. **Puchała KO**, Nowak-Życzyńska Z, Sielicki S, Olech W. Assessment of the Genetic Potential of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Population Used in the Reintroduction Program in Poland. Genes (Basel). 2021 Apr 29;12(5):666. doi: 10.3390/genes12050666.
IF = 3,5, Punkty MEiN = 100
Udział Doktoranta: 81%
2. **Puchała KO**, Nowak-Życzyńska Z, Sielicki S, Olech W. Evaluation of the Impact of the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus peregrinus*) Reintroduction Process on Captive-Bred Population. Genes (Basel). 2022 Aug 20;13(8):1487. doi: 10.3390/genes13081487.
IF = 3,5, Punkty MEiN = 100
Udział Doktoranta: 81%

WPŁYNEŁO DNIA

2023 -12- 29

Instytut Nauk o Zwierzętach
Sekretariat

W/w prace powstały w ramach finansów pochodzących ze środków Programu Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020. Obie prace są współautorskie, z udziałem jedynie trzech współautorów, a Doktorant jest w nich pierwszym autorem. Swój udział w przygotowaniu obu publikacji Doktorant określił wysoko, na 81%, co zostało potwierdzone przez współautorów w załączonych oświadczeniach. Udział Doktoranta w badaniach obejmował między innymi: dobór metod analiz, wykonanie analiz biostatystycznych, przygotowanie manuskryptów oraz wizualizację danych. Z analizy deklaracji Autora oraz współautorów nie da się wywnioskować, kto był odpowiedzialny za część laboratoryjną badań i kto przeprowadził genotypowanie markerów mikrosatelitarnych, choć podejrzewam, że był to sam Doktorant. Prace stanowiące podstawę dysertacji zostały opatrzone opracowaniem w języku polskim, w którego skład wchodzi: formalne oświadczenia Promotora i Autora pracy, streszczenie (również w języku angielskim), wstęp, cel i zakres pracy, hipoteza badawcza, materiał i metody, syntetyczne odmówienie publikacji, wnioski, wykaz cytowanej literatury i oświadczenia współautorów. Opracowanie obejmuje także kopie opublikowanych prac naukowych.

Ocena opracowania w języku polskim

Opracowanie w języku polskim opisujące wyniki obu prac oryginalnych zostało opatrzone tytułem spinającym tematykę badawczą obu publikacji, tj.: „Kompleksowa analiza zmienności genetycznej polskiej populacji sokoła wędrownego (*Falco peregrinus*)”. Streszczenie pracy dobrze opisuje całość przeprowadzonych badań, jednak jest nieco zbyt ogólne i mogłoby zawierać nieco więcej szczegółów odnośnie uzyskanych wyników. Opracowanie liczy łącznie 36 stron, nie uwzględniając tekstów w języku angielskim oraz oświadczeń Współautorów. Spis literatury obejmuje 33 publikacje, z których większość została opublikowana przed rokiem 2010, a więc powinien zostać uzupełniony o nowsze pozycje piśmiennictwa. Opracowanie obejmuje także sześć tabel i osiem rycin.

We wstępnej części opracowania Autor charakteryzuje gatunek *Falco peregrinus* opisując zasięg jego występowania, budowę ciała oraz nieco szczegółowiej miejsce gniazdowania i mechanizm jego wyboru. W dalszej części, obszernie opisuje przyczynę redukcji światowej populacji sokoła wędrownego, która była związana z używaniem DDT i innych pestycydów w produkcji rolnej, powodujących osłabienie skorupy jaj oraz zatrucia młodych ptaków. Nagły spadek liczebności populacji sokoła z pewnością znacząco obniżył zmienność generyczną przetrwałej populacji, co uzasadnia potrzebę przeprowadzania opisywanych badań i konieczność oceny poziomu zmienności genetycznej dostępnej puli genowej. W kolejnych akapitach Autor opisuje prowadzone na świecie programy restytucji sokołów wędrownych, które odniosły sukces m. in. w Stanach Zjednoczonych Ameryki, Kandyzie czy Wielkiej Brytanii. Autor odnosi się także do programu reintrodukcji sokoła w

Polsce, prezentując liczby wprowadzonych do środowiska ptaków oraz charakterystykę obszarów, na których prowadzono reintrodukcję. Wprowadza także pojęcie ekotypu, rozróżniając ekotyp miejski i leśny, które będą przedmiotem analiz w dalszej części pracy.

W drugim podrozdziale pracy Autor definiuje markery mikrosatelitarne oraz opisuje ich zastosowania u ptaków, głównie do rozróżniania gatunków i podgatunków oraz analizy struktury genetycznej. Wspomina także o istnieniu badań genetycznych prowadzonych u sokoła wędrownego oraz innych gatunków ptaków, jednak nie omawia ich wyników i nie wspomina o ich znaczeniu dla ochrony bioróżnorodności tych gatunków. Ta część pracy mogłaby być bardziej rozbudowana, szczególnie, że dyskusja w polskojęzycznym opracowaniu jest ograniczona do minimum i nie prezentuje w wystarczającym stopniu wyników badań własnych na tle dostępnych danych literaturowych.

Wstępną część dysertacji oceniam pozytywnie i uważam, że w sposób zadowalający, choć może niewyczerpujący, nakreśla problem badawczy, jego istotność oraz prezentuje dotychczasowe wyniki badań przerodzonych w tym zakresie. Brak dużej liczby dostępnych publikacji dotyczących genetyki populacyjnej sokoła wędrownego, dobrze świadczy o innowacyjności przeprowadzonych badań, pomimo wykorzystania relatywnie mało nowatorskiej metody analitycznej.

Po wstępnym rozdziale pracy Autor zamieścił opis celu prowadzonych badań. W mojej ocenie nakreślony cel, jakim jest określenie zmienności genetycznej polskiej populacji sokoła wędrownego, jest zbyt ogólny i nie odnosi się do poszczególnych analiz opisanych w dalszej części dysertacji. Cele szczegółowe pracy mogłyby natomiast stanowić przedstawione poniżej „etapy pracy”. Przytoczone w tym miejscu ponownie dane opublikowanych prac, różnią się wskaźnikiem impact factor z wcześniejszym wykazem, co wymaga wyjaśnienia.

Przedstawiona na kolejnej stronie hipoteza badawcza jest w mojej ocenie właściwa, jednak podobnie jak cele, nie obejmuje wszystkich aspektów przeprowadzonych badań. Nie jestem także przekonany, czy zaprezentowane wyniki są bezpośrednio ukierunkowane na to by ją udowodnić, gdyż wymagałoby to nieco innego układu analiz i szczegółowych porównań pomiędzy grupami badawczymi.

Materiał badawczy stanowiły próby krwi lub piór pobrane od 91 osobników dzikich oraz 374 osobników hodowlanych, uwolnionych do środowiska w ramach programu reintrodukcji. Ta wielkość próby jest wystarczająca do wiarygodnego określenia ich struktury genetycznej. Osobniki hodowlane pochodziły z 6 krajów i 47 różnych hodowli, natomiast dzikie należały do dwóch ekotypów: miejskiego i leśnego. Dane o ekotypach i hodowlach powinny znaleźć się w tabeli 2. Podobnie jak informacja o latach urodzeń ptaków hodowlanych. Wniosuję, że opisany materiał był podstawą badań zaprezentowanych w obu artykułach naukowych. Nie jest jednak dla mnie jasne, czy lata podane w

publikacji drugiej i tabeli 1, są datami urodzeń ptaków, czy datami pobrania materiału biologicznego? Wnioskuje, że ptaki określane jako dzikie, są potomkami ptaków hodowlanych uwodnionych w ramach wczesnego etapu programu reintrodukcji. Nie jest jednak jasne, z jakich krajów wygodzili się ich przodkowie i w jakich proporcjach tworzyli oni populację rodzicielską.

Dalej Autor prezentuje metodę genotypowania w oparciu o multiplex PCR i analizę fragmentów w sekwenatorze kapilarnym. Metodę analiz laboratoryjnych oceniam bardzo dobrze. W opisie tym nie podano jednak stężenia użytego DNA oraz nazwy producenta użytego mastermixu. W kolejnym podrozdziale pracy zamieszczono opis analiz biostatystycznych. Ich dobór do oceny struktury populacji oraz wybór oprogramowania uważam za właściwe. W opisie brakuje jednak cytacji prac odnoszących się do poszczególnych metod statystycznych oraz użytych programów obliczeniowych.

Kolejny rozdział dysertacji obejmuje syntetyczne odwołanie publikacji, które w zasadzie stanowi połączone wyniki i dyskusję. W opisie publikacji pierwszej, po przypomnieniu charakterystyki materiału badawczego, Autor przechodzi do prezentacji podstawowych statystyk analizowanych markerów w badanej populacji, skupiając się przede wszystkim na liczbie zaobserwowanych alleli. Nie omawia natomiast średnich wartości miar heterozygotyczności i wsobności, które są lepszymi wskaźnikami prawidłowości struktury genetycznej populacji. Omawiane wyniki zaprezentowane są w tabeli, która nie uwzględnia podziału na grupy badawcze, tj. ptaków dzikich oraz hodowlanych, ekotypów, a także na poszczególnych krajów, z których wywodzą się ptaki hodowlane. Nie pozwala to na kompleksowe porównanie struktury genetycznej poszczególnych subpopulacji zwierząt, szczególnie, że wyniki są zaprezentowane dla każdego markera z osobna, utrudniając jednoznaczne wnioski. Analizy te są nieco bardziej szczegółowo opisane w opublikowanym tekście, niestety Autor nie przeniósł wszystkich opisanych tam wyników do opracowania polskojęzycznego. Moją uwagę zwróciły także duże odchylenia w heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej, świadczące o zaburzeniu równowagi Hardy'ego - Weinberga w analizowanej populacji. Odpowiedź na pytanie, czy odchylenia te wynikają z problemów z genotypowaniem poszczególnych markerów, czy z realnego zaburzenia struktury genetycznej badanych parków, wymaga dyskusji.

Dalszy opis odnosi się do wyników analizy PCoA. Autor opisuje tu wzajemne podobieństwa pomiędzy badanymi ptakami oraz podejmuje próbę ich wyjaśnienia na gruncie znajomości historii populacji i lokalizacji geograficznej hodowli macierzystych. Do tej części analiz nie mam zastrzeżeń. Dalej Autor wizualizuje podobieństwo pomiędzy subpopulacjami za pomocą drzewa filogenetycznego, uzyskując zbliżone wyniki. Wydaje się, że drzewo nie podlegało iteracjom i nie prezentuje tzw. poparc statystycznych (*ang. Bootstrap values*) poszczególnych gałęzi, uniemożliwiając tym samym ocenę jego wiarygodności.

Dalsze analizy dotyczą podziału badanych osobników na grupy genetyczne z wykorzystaniem oprogramowania STRUCTURE. Analiza ta przydzieliła osobniki wewnątrz populacji hodowlanej, jak i dzikiej, do dwóch klastrów genotypowych. O ile w stosunku do populacji hodowlanej Autor nie prezentuje wiarygodnej przyczyny takiego stanu rzeczy, o tyle w populacji dzikiej, wskazuję jako przyczynę występowanie dwóch ekotypów ptaków i ich geograficzną separację. Wyniki te są poparte prezentacją drzewa filogenetycznego dla ptaków dzikich, uwzględniającego podział na siedliska.

Opis wyników drugiej publikacji ma zbliżoną konstrukcję. W pierwszym akapicie Autor charakteryzuje badaną populację oraz jej podział na grupy badawcze. Podobnie jak wcześniej, w tabeli przedstawia podstawowe parametry analizowanych markerów, jednak również bez podziału na grupy badawcze oraz przystępnego podsumowania. Ponieważ badana populacja w dużym stopniu pokrywa się z populacją opisaną w pracy pierwszej (a analizowane markery mikrosatelitarne są takie same) zastanawiam mnie różnice w wynikach, szczególnie tych dotyczących statystyki F. W publikacji pierwszej, wartości indeksu nie przekraczały 16%, podczas gdy w drugiej sięgają 78%. Tak wysoki współczynnik wsobności jest alarmujący i rzadko obserwowany nawet w odtwarzanych populacjach zachowawczych, przy czym zastrzegam, że moje obserwacje bazują na badaniach prowadzonych u ssaków. Podobnie jak w przypadku pierwszej publikacji, można tutaj zauważyć duże rozbieżności w heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej. Chętnie zapoznałbym się z wynikami analizy równowagi Hardy'ego-Weinberga, by ocenić statystyczną istotność tych różnic.

Analiza z wykorzystaniem programu STRUCTURE ponownie przydzieliła badane osobniki do dwóch subpopulacji. Subpopulacje te odpowiadają ptakom urodzonym przed i po roku 2013. Autor upatruje przyczyn takiego stanu rzeczy w imporcie dużej liczby ptaków do Polski w tym czasie, związanym z rosnącym zapotrzebowaniem i introdukcją ptaków z innych niż dotychczas krajów. Dalej Autor analizuje współczynnik wsobności i upatruje przyczyn jego systematycznego wzrostu w strukturze i sposobie hodowli oraz ostrej sztucznej selekcji.

Ta część pracy jest opisana nieco skrótowo i nie prezentuje wszystkich analiz znajdujących się w publikacjach wyjściowych. Niemniej jednak, daje obraz całości analiz zamieszczonych w publikacjach i jest wystarczający do ich zgrubnej oceny. Generalnie opisy są przygotowane z dbałością o szczegóły, estetykę oraz poprawność języka naukowego. Nie znalazłem także w całości opracowania znaczącej liczby błędów edytorskich i technicznych, co świadczy o solidnym podejściu Autora do przygotowania rozprawy.

Cześć merytoryczna pracy kończy się czterema podsumowaniami i wnioskami. Wniosek pierwszy odnosi się do poziomu heterozygotyczności badanych ptaków, która jest określana, jako niska. W pracy nie było jednak bezpośredniego odniesienia do tego parametru oraz jego oceny na tle innych populacji sokoła. Bezwzględne wartości heterozygotyczności poszczególnych markerów bardzo

się od siebie różniły i kształtowały się w zakresie do 0 do 0.6. W tym wniosku znajduje się także odniesienie do odchyłeń w heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej, która miała głównie charakter niedoboru heterozygot. Świadczyć ona może o raczej o odchyleniach od stanu równowagi genetycznej w wyniku nadmiernej wsobności lub problemach z genotypowaniem markerów, niż o niskich wartościach heterozygotyczności w ogóle.

Wniosek drugi także wymaga dopracowania. Autor pisze o tym, że różnice pomiędzy ekotypami mogą być „wzmocnione lub zatarte” w efekcie prowadzonej reintrodukcji. Stwierdzenie to nie wynika z treści zaprezentowanych badań i powinno zostać usunięte. Autor odnosi się także do braku alleli prywatnych u poszczególnych ekotypów, wnioskując z tego, że ekotypy nie różnią się genetycznie od siebie. Zdanie to nie jest do końca prawdziwe, gdyż autor badał tylko kilka markerów w całym genomie. Co więcej, wydaje się nie doceniać znaczenia różnic w częstości alleli, jako źródła zmienności genetycznej w obrębie gatunku.

Wniosek trzeci również wymaga korekty. Istnieją populacje, które mają wysoki poziom zmienności genetycznej, a są rozpoznawane jako jedna populacja. Uzyskany wynik sugeruje raczej brak homogenności genetycznej i istnienie ukrytej substruktury populacji. Piąty wniosek nie wynika z opisanych badań i powinien zostać usunięty.

Ocena opracowań anglojęzycznych

W odniesieniu do anglojęzycznych opracowań w formie publikacji, stwierdzam, że zawierają one opisy tożsame z ocenianą dysertacją polskojęzyczną, a w wielu miejscach nawet bardziej szczegółowe. Dotyczy to przede wszystkim dyskusji, która jest bardziej rozbudowana i rekompensuje braki opracowania polskojęzycznego. Obie prace oceniam pod względem merytorycznym oraz pod względem oryginalności i zasadności podjętych badań wysoko, a sam sposób opisu i konstrukcje prac oceniam bardzo dobrze. Obie prace stanowią ważny wkład do dorobku dyscypliny. Jakość przeprowadzonych analiz i ich opis z pewnością świadczą o dobrym przygotowaniu Doktoranta do dalszej pracy naukowej.

Podsumowanie

Pomimo szeregu uwag krytycznych, które z przyzwyczajenia recenzenta zawarłem w powyższej ocenie polskojęzycznego opisu badań, przedstawione opracowanie uważam za poprawne a zawarte w nim wiadomości za wystarczające. Opis jest czytelny, przejrzysty, jasny dla czytelnika, a język opracowania jest poprawny i wystarczająco ścisły. Wartość merytoryczną opisanych badań oceniam wysoko i są one w mojej ocenie przeprowadzone prawidłowo, z widoczną znajomością tematu. Na

uwagę zasługuje duży wkład indywidualny Doktoranta, określony na 81%, co świadczy o jego dużej samodzielności, znajomości metod statycznych i zdolności wykorzystania zaawansowanych programów obliczeniowych.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny praca pt.: „Kompleksowa analiza zmienności genetycznej polskiej populacji sokoła wędrownego (*Falco peregrinus*)”, spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023, poz. 742) oraz §9. Regulaminu przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wprowadzonego Uchwałą Nr 89 – 2022/2023 Senatu SGGW z dnia 26 czerwca 2023 roku, i niniejszym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo SGGW w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr inż. Karola Puchały do dalszych etapów procedury ubiegania się o stopień naukowy doktora.



Signed by /
Podpisano przez:

Artur Gurgul

Date / Data:
2023-12-18
13:12

