

Gdańsk, 17 lutego 2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Burdy pt.  
Uwarunkowania obciążenia genetycznego w dzikich populacjach gupików  
*Poecilia reticulata***

**Formalna charakterystyka rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Burdy została przygotowana w Pracowni Biologii Ewolucyjnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem profesora Jacka Radwana oraz dr hab. Mateusza Konczala, który pełnił rolę promotora pomocniczego. Rozprawa składa się z dwóch rozdziałów, z których pierwszy został opublikowany w czasopiśmie *Molecular Ecology Resources*, a drugi jest maszynopisem w formie artykułu naukowego. Oba rozdziały są napisane w języku angielskim, a ich tematyka jest zgodna z tytułem pracy. Rozdziały poprzedzone są streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz krótkim wstępem, zawierającym zwięzłe wprowadzenie do tematyki badań oraz opis celów pracy. Pierwszy rozdział porównuje dwie metody szacowania tempa mutacji i wykorzystuje je do oszacowania tempa mutacji u gupików. Drugi rozdział analizuje obciążenie genetyczne w dzikich populacjach gupika z Trynidadu i Tobago w celu przetestowania hipotezy dotyczącej związku obciążenia genetycznego z inwazyjnością populacji po sztucznej translokacji. Rozprawa jest zakończona zwięzłym opisem najważniejszych wniosków.

Pierwszy rozdział ma dwóch autorów: Doktorantkę oraz jej promotora pomocniczego, dr hab. Mateusza Konczala, natomiast drugi rozdział, oprócz Doktorantki, ma sześciu współautorów. Doktorantka deklaruje, że jej rola w powstaniu pierwszego rozdziału polegała na zaprojektowaniu badań (wraz z dr hab. Konczalem), izolacji DNA, wykonaniu większości analiz bioinformatycznych oraz przygotowaniu maszynopisu i jego rewizji (przy udziale dr hab. Konczala). Rola Doktorantki w powstaniu drugiego rozdziału polegała na zaprojektowaniu badań (wraz z prof. Radwanem i dr hab. Konczalem), udziale w zebraniu prób, izolacji DNA, wykonaniu większości analiz bioinformatycznych, wykonaniu analiz statystycznych (wraz z prof. Radwanem), oraz przygotowaniu maszynopisu i jego rewizji (przy udziale dr hab. Konczala i prof. Radwana). Deklaracje pozostałych czterech współautorów drugiego rozdziału wskazują, że ich udział w powstaniu tej pracy miał charakter pomocniczy. Zatem mgr Burda pełniła wiodącą rolę w powstaniu obu prac.

**Struktura rozprawy**

Rozdziały rozprawy zostały zaprezentowane w logicznej kolejności: rozdział opracowujący nową metodykę szacowania tempa mutacji poprzedza rozdział, który wykorzystuje oszacowane tempo mutacji u gupików do badania czynników wpływających na stopień obciążenia genetycznego w dzikich populacjach tego gatunku. Rozdziały te są poprzedzone streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wstępem, stanowiącym zwięzłe wprowadzenie do tematyki rozprawy. Wstęp jest niewiele dłuższy od streszczenia, które ma nieco ponad dwie strony (w języku polskim). Streszczenie dobrze podsumowuje zawartość pracy, jednak miejscami zawiera zbyt wiele szczegółów, np. w opisie metodyki drugiego rozdziału. Wstęp zawiera wszystkie oczekiwane elementy i w jasny sposób przedstawia zagadnienia badane w obu rozdziałach, można go było jednak rozbudować, dodając

podsumowanie wyników najważniejszych dotychczasowych prac dotyczących wpływu czynników demograficznych na obciążenie genetyczne. Wstęp zawiera imponującą liczbę cytowanych artykułów w stosunku do swojej długości.

W ostatniej części wstępu zostały przedstawione zadania badawcze, które są właściwie sformułowane i dobrze odzwierciedlają wykonane prace. Zadania te (*objectives*) zostały przedstawione jako cele pracy (*aims*). Ma to sens w przypadku pierwszego rozdziału, skupiającego się na opracowaniu nowej metodyki badawczej, natomiast celem drugiego rozdziału było przetestowanie konkretnych hipotez, co zostało prawidłowo przedstawione we wstępie to tego rozdziału.

Dwa główne rozdziały rozprawy mają prawidłową strukturę i zawierają wszystkie oczekiwane elementy. Pierwszy z nich jest opublikowanym artykułem, zaś drugi maszynopisem artykułu w postaci gotowej do wysłania do recenzji w czasopiśmie naukowym. Ostatnia część rozprawy zawiera podsumowanie wniosków z tych dwóch prac.

Rozprawa nie zawiera generalnej dyskusji podsumowującej wyniki uzyskane w przedstawionych rozdziałach. Nie jest to wymagany element rozprawy, jednak umożliwiłby on pokazanie, w jaki sposób dwa rozdziały rozprawy komponują się w całość. Oba rozdziały łączy ogólny temat badań (mutacje) oraz ten sam gatunek modelowy; dodatkowo, drugi rozdział wykorzystuje tempo mutacji oszacowane w pierwszym. Mimo to, spójność tematyczna tych rozdziałów nie jest oczywista, dlatego synteza wyników byłaby przydatna. Rozprawa zawiera jednak wszystkie niezbędne elementy i jej struktura jest prawidłowa.

## **Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej**

### *Znaczenie podjętej tematyki badań*

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Burdy dotyczy (1) metodyki szacowania tempa mutacji w oparciu o sekwencje całych genomów oraz (2) czynników demograficznych wpływających na gromadzenie się szkodliwych wariantów genetycznych w pulach genowych populacji. Oba zagadnienia mają ważne znaczenie w biologii ewolucyjnej. Znajomość tempa mutacji jest niezbędna dla prawidłowego odtworzenia historii demograficznej gatunków w oparciu o dane genetyczne oraz do oceny efektywności doboru naturalnego. Tempo mutacji oszacowane dla gupika w pierwszym rozdziale rozprawy okazało się być jednym z najniższych wśród kręgowców. Przyczyny zróżnicowania tempa mutacji między taksonami nie są dobrze poznane, więc dostarczanie nowych danych jest ważnym wkładem w rozwój wiedzy na ten temat. Z tej samej przyczyny doskonalenie metodyki szacowania tempa mutacji jest bardzo ważne dla sprawnego i poprawnego generowania tych danych dla kolejnych gatunków.

Poznanie czynników wpływających na stopień obciążenia genetycznego populacji (czyli nagromadzenia szkodliwych wariantów, które może mieć negatywny wpływ na dostosowanie obecnego pokolenia i/lub przyszłych pokoleń) jest ważne zarówno dla lepszego zrozumienia procesów ewolucyjnych w populacjach, jak też w praktyce ochrony gatunkowej. Procesy demograficzne, takie jak gwałtowny spadek liczebności populacji, ekspansja geograficzna, czy przepływ genów między odrębnymi liniami ewolucyjnymi mogą w znaczącym stopniu wpłynąć na stopień obciążenia genetycznego. Wiedza na ten temat jest jednak ograniczona, między innymi dlatego, że dotychczasowe badania obciążenia genetycznego dotyczyły głównie gatunków zagrożonych wyginięciem, charakteryzujących się niską liczebnością populacji. Z tego względu wpływ czynników demograficznych na obciążenie genetyczne nie mógł być w pełni zbadany. Praca przedstawiona w drugim rozdziale umożliwiła wypełnienie luki w wiedzy na ten temat.

Podsumowując, rozprawa w znacznym stopniu przyczyniła się do rozwoju wiedzy na temat tempa mutacji u kręgowców i czynników wpływających na tempo gromadzenia się szkodliwych mutacji w pulach genowych.

### *Cele badawcze rozprawy*

Omawiana rozprawa doktorska miała dwa główne cele (1) porównanie skuteczności dwóch metod bezpośredniego szacowania tempa mutacji w oparciu o sekwencje genomów rodziców i dzieci, oraz wykorzystanie tych metod do oszacowania tempa mutacji u gupika; (2) przetestowanie hipotez dotyczących wpływu czynników demograficznych na stopień obciążenia genetycznego, przy użyciu gupika jako organizmu modelowego. Oba cele zostały w pełni osiągnięte poprzez realizację starannie zaplanowanych badań.

### *Metodyka badań*

Metodyka badań w tej rozprawie doktorskiej miała cztery główne komponenty: (1) resekwencjonowanie genomów, (2) analizy bioinformatyczne, (3) zastosowanie algorytmów uczenia maszynowego oraz (4) analizy danych w oparciu o teorię genetyki populacji.

Próbki analizowane w pierwszej pracy pochodziły z laboratoryjnej hodowli gupików wywodzącej się od dziko-żyjącej populacji z Trynidadu. Z kolei w drugiej pracy analizowane były próbki z dziko-żyjących populacji z Trynidadu i Tobago. Resekwencjonowanie genomów badanych osobników zostało wykonane przy użyciu Illumina NovaSeq6000, co jest częstym wyborem ze względu na dobrą jakość uzyskanych danych. W tym kontekście jest niejasne, dlaczego sekwencje genomów uzyskane dla różnych osobników w drugim rozdziale rozprawy różnią się między sobą wielokrotnie średnią głębokością sekwencjonowania genomu (między 9x a 36x). Według opisu metodyki świeżo pobrane próbki zostały umieszczone w etanolu, więc nie ma powodu, aby znacznie różniły się one jakością, a stężenie DNA prawdopodobnie została wyrównane dla wszystkich próbek przed przygotowaniem bibliotek. Tak duże różnice są zatem zaskakujące i nie zostały wyjaśnione w rozprawie. Jest to o tyle ważne, że głębokość sekwencjonowania może mieć wpływ na liczbę wariantów genetycznych wykrytych w poszczególnych próbkach, a zatem również na oszacowanie obciążenia genetycznego poszczególnych populacji.

Uzyskane sekwencje zostały poddane analizom odpowiednim dla tematyki każdego z rozdziałów. Metody analityczne zostały właściwie dobrane do celów pracy, a uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane w obu rozdziałach. Mam tylko jedną uwagę odnośnie metody szacowania efektywnej wielkości populacji stosowanej w rozdziale 2. Nie obliczane jest na podstawie wzoru:  $N_e = \pi/4\mu$ . Ponieważ wartość  $\mu$  jest taka sama dla wszystkich badanych populacji, w praktyce praca ta ocenia zależność obciążenia genetycznego od neutralnej zmienności genetycznej tych populacji.

Oba rozdziały rozprawy zawierają obszerny materiał, a wykonanie opisywanych analiz wymagało dobrej znajomości metod bioinformatycznych oraz – w rozdziale drugim – dobrej znajomości teoretycznych podstaw genetyki populacji.

### *Wnioski z przeprowadzonych badań*

Pierwszy rozdział rozprawy zaprezentował porównanie dwóch metod bezpośredniego szacowania tempa mutacji. Metoda oparta na uczeniu maszynowym umożliwiła wykrycie większej liczby mutacji, jednak okazała się bardziej pracochłonna. Według informacji zawartej w abstrakcie rozdziału, metoda oparta na uczeniu maszynowym miała większą proporcję zarówno fałszywie pozytywnych, jak i fałszywie negatywnych wyników. Natomiast we wnioskach przedstawionych na końcu rozprawy zawarta jest informacja, że tylko standardowa metoda filtrowania generuje fałszywie negatywne

wyniki, jest to zatem pewna nieścisłość. Metoda wspierana uczeniem maszynowym odnalazła więcej prawdziwych mutacji *de novo*, zatem powinna być preferowana w przypadkach, gdy ważne jest bardzo precyzyjne oszacowanie tempa mutacji.

Analizy przeprowadzone w drugim rozdziale pozwoliły na stwierdzenie, że ekspansja przesiedlonej populacji nie była związana z jej zwiększonym obciążeniem genetycznym, być może ze względu na mieszanie się z lokalnymi populacjami. Nie znaleziono również dowodów na oczyszczanie puli genowej tej populacji z silnie szkodliwych wariantów, co zaprzeczyło hipotezie, że ten proces jest odpowiedzialny za sukces inwazyjnych populacji. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy efektywną wielkością populacji a obciążeniem genetycznym, co pokazuje, że neutralna zmienność genetyczna nie jest dobrym wskaźnikiem obciążenia genetycznego. Ten ostatni wniosek ma ważne znaczenie praktyczne, ponieważ często zakłada się, że neutralna zmienność genetyczna populacji stanowi dobry wskaźnik jej żywotności (*viability*).

Należy podkreślić, że wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań mają znaczenie wykraczające poza charakterystykę parametrów genetycznych dla badanego gatunku i jego populacji, takich jak tempo mutacji, efektywna wielkość populacji i stopień obciążenia genetycznego.

#### *Możliwości dalszych badań w oparciu o uzyskane wyniki*

Rozprawa nie przedstawia możliwości dalszych badań, natomiast w naturalny sposób wynika z niej kilka dalszych zagadnień, np. przyczyny wyjątkowo niskiego tempa mutacji u ryb kostnoszkieletowych, zależność między tempem mutacji a stopniem obciążenia genetycznego gatunków, skuteczne metody redukcji obciążenia genetycznego u gatunków zagrożonych wyginięciem. Mimo że ten element rozprawy nie jest wymagany, umożliwiłby on pokazanie, że Doktorantka rozumie implikacje swoich badań dla dziedziny, którą się zajmuje.

#### **Podsumowanie**

Wyniki badań opisane w przedstawionej rozprawie doktorskiej stanowią istotny wkład w wiedzę na temat czynników demograficznych kształtujących stopień obciążenia genetycznego w naturalnych populacjach oraz w metodykę bezpośredniego szacowania tempa mutacji. Badania opisane w dwóch rozdziałach rozprawy zostały dobrze zaplanowane i poprawnie przeprowadzone. Oba rozdziały zostały starannie przygotowane, a jeden z nich został opublikowany w czasopiśmie naukowym o bardzo dobrej reputacji. Oba rozdziały mają bardzo wysoką wartość naukową, natomiast słabszym elementem rozprawy są jej pozostałe elementy, takie jak ogólny wstęp, opis celów pracy i ogólne wnioski.

#### **Wniosek końcowy**

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Katarzyny Burdy spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Wnioskuje do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Katarzyny Burdy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

dr hab. Małgorzata Pilot