



prof. dr hab. Małgorzata Jankun-Woźnicka, prof. zw.  
Katedra Ichtiologii  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
ul. M. Oczapowskiego 5, 10-975 Olsztyn  
e-mail: [mjpw@uwm.edu.pl](mailto:mjpw@uwm.edu.pl)

---

Olsztyn, 20 czerwca 2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anety Spóz  
pt. „**Cytogenetyka wybranych poliploidalnych taksonów ryb karpiokształtnych  
Cypriniformes**”, wykonanej pod kierunkiem  
prof. dr hab. Alicji Boroń, prof. zw.  
oraz promotora pomocniczego dr Doroty Juchno  
w Katedrze Zoologii na Wydziale Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Ryby z rzędu karpiokształtnych stanowią bardzo interesujący obiekt badań z zakresu genetyki ewolucyjnej. W Katedrze Zoologii pod kierunkiem Pani Profesor Alicji Boroń bardzo prężnie prowadzone są badania dotyczące biologii ryb z rzędu karpiokształtnych, a szczególnie rodziny kozowatych i rodziny karpiowatych. Pani mgr Aneta Spóz doskonale wpisuje się w ten nurt badawczy, pracując nad zastosowaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej w cytogenetyce ryb. Rozprawa przedstawia częściową mapę cytogenetyczną genomu dwóch gatunków ryb karpiokształtnych o poliploidalnym genomie, występujących w Polsce. Uważam, że podjęcie opisanych w rozprawie badań było w pełni uzasadnione i wskazane, a rozpatrywany problem jest godny pracy doktorskiej.

#### Ocena rozprawy doktorskiej.

Rozprawę doktorską mgr Anety Spóz pod tytułem: „Cytogenetyka wybranych poliploidalnych taksonów ryb karpiokształtnych Cypriniformes” stanowią dwie prace naukowe oraz liczące 26 stron wprowadzenie wraz z opisem wykonanych przez doktorantkę analiz cytogenetycznych stanowiących podstawę wyżej wspomnianych publikacji.

Obydwa artykuły, będące podstawą rozprawy doktorskiej, są pracami wieloautorskimi, w których mgr Aneta Spóz jest pierwszym autorem. Wiodący wkład doktorantki w powstanie obu publikacji polegał na opracowaniu koncepcji prac, wykonaniu większości analiz cytogenetycznych, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów.

Łączny współczynnik wpływu (*impact factor*) publikacji składających się na rozprawę doktorską, liczony według roku opublikowania wynosi 1,772, a suma punktów MNiSW przynależnych tym publikacjom – 30 (według odpowiednich komunikatów MNiSW).

Pierwsza publikacja naukowa wchodząca w skład ocenianej rozprawy doktorskiej to:

**Aneta Spóz**, Alicja Boroń, Katarzyna Porycka, Monika Karolewska, Daisuke Ito, Syuiti Abe, Lech Kirtiklis, Dorota Juchno. 2014. Molecular cytogenetic analysis of the crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae) using chromosome staining and fluorescence *in situ* hybridisation with rDNA probes. *Comparative Cytogenetics*, 8 (3), 233-248.

Praca przedstawia kariotyp karasia pospolitego *Carassius carassius* (L). Gatunek ten posiada 100 chromosomów w komórkach somatycznych, liczba ramion chromosomowych wynosi 156. Autorzy podkreślają tetraploidalne pochodzenie karasia pospolitego. Jest to jedyny rodzimy gatunek ryb z rodzaju *Carassius* na terenie Polski. Liczebność populacji karasia pospolitego w Europie spada. Wymienione fakty skłoniły autorów do podjęcia badań cytogenetycznych tego gatunku. Analizy chromosomów dokonano na reprezentatywnej próbie ryb obu płci, oceniając co najmniej po 20 komórek w stadium metafazy dla każdego osobnika. Jest to powszechny standard, przyjęty w tego typu badaniach. Szczegółowej analizie poddano obszary chromosomów zawierające geny rybosomowego DNA oraz sekwencje im towarzyszące, a także obecność produktów ich ekspresji (metoda barwienia azotanem srebra zwana Ag-NOR). Wyniki analiz chromosomowych zostały doskonale zilustrowane na fotografiach wykonanych pod mikroskopem fluorescencyjnym. Na przykład na Rysunku I pokazano występowanie czterech pozytywnych sygnałów dla fluorochromu chromomycyny A<sub>3</sub>, który specyficznie reaguje z sekwencjami DNA bogatymi w pary nukleotydów GC. Pokrywały się one z czterema pozytywnymi sygnałami Ag-NOR, które wskazywały aktywne w ostatniej interfazie regiony organizacji jąderka. Sekwencje te w kariotypach ryb i płazów są oflankowane heterochromatyną bogatą w pary nukleotydów GC. Rysunek I przedstawia ponadto osiem mniejszych CMA<sub>3</sub> pozytywnych sygnałów, nie związanych z obecnością Ag-NOR.

Autorka opanowała niezwykle precyzyjne metody badawcze z zakresu cytogenetyki klasycznej i molekularnej, a szczególnie fluorescencyjną hybrydyzację *in situ*. Umożliwiło to fizyczne wskazanie, w których miejscach chromosomów znajdują się sekwencje 28SrDNA oraz 5SrDNA. Właściwe dobranie substancji do znakowania sond molekularnych oraz znaczników fluorescencyjnych umożliwiło jednoznaczne wykazanie, że sekwencje 28SrDNA

i 5SrDNA znajdują się na różnych chromosomach. W kariotypie karasia pospolitego występują dwie pary chromosomów zawierające sekwencje 28SrDNA. Są to chromosomy jąderkotwórcze (barwiące się azotanem srebra i chromomycyną A<sub>3</sub>). Natomiast sekwencje 5SrDNA, które występowały w kariotypie karasia pospolitego na pięciu parach chromosomów, nie były związane z obszarami jąderkotwórczymi.

Autorzy korzystali z 52 pozycji literatury anglojęzycznej. Czasopismo Comparative Cytogenetics jest umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 1,210, punktacja MNiSW: 15.

Druga publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej to:

**Aneta Spóz**, Alicja Boroń, Konrad Ocalewicz, Lech Kirtiklis, 2017. Polymorphism of the rDNA chromosomal regions in the weatherfish *Misgurnus fossilis* (Teleostei: Cobitidae). Folia Biologica (Kraków), 65 (1): 63-70.

Praca przedstawia problem zmienności regionów rybosomalnego DNA w kariotypie piskorza *Misgurnus fossilis* (L.). U wszystkich badanych osobników (5 samców i 7 samic) stwierdzono występowanie 100 chromosomów i liczbę ramion chromosomowych równą 136. Wynik ten potwierdza tetraploidalne pochodzenie piskorza. Udowodniono występowanie dwóch par chromosomów jąderkotwórczych, Ag-NOR i CMA<sub>3</sub>-pozytywnych. Jedna samica posiadała tylko dwa chromosomy jąderkotwórcze. Wykonane mapowanie sekwencji 28SrDNA potwierdziło te wyniki. Reakcja hybrydyzacji *in situ* z sekwencjami 5SrDNA wykazała, że wszystkie badane piskorze posiadały te sekwencje na maksymalnie czterech parach chromosomów. W pracy po raz pierwszy wykorzystano bardzo informatywną cechę jaką jest dystrybucja w chromosomach genów rybosomowych 18S, 5,8S i 28S rRNA oraz 5S rRNA, którą uzyskano przy zastosowaniu techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z sondami 28S rDNA i 5S rDNA. Dwie badane rodziny genów rDNA (5S i 28S) były zlokalizowane na różnych chromosomach. Stwierdzone różnice międzyosobnicze w liczbie i wielkości obszarów 5SrDNA u badanych piskorzy wskazują na różną liczbę kopii, tych ważnych w produkcji białek komórkowych, genów.

Piskorz jest w Polsce gatunkiem chronionym. Doktorantka, podejmując się analizy cytogenetycznej postawiła sobie za cel ogólną charakterystykę cytogenetyczną tego gatunku oraz dokładną analizę dwóch rodzajów genów kodujących rybosomowe RNA, które jest głównym składnikiem rybosomów.

Czasopismo *Folia Biologica* (Kraków) jest umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor ISI: 0,562, punktacja MNiSW: 15.

Przygotowane przez Doktorantkę opracowanie w języku polskim składa się z sześciu rozdziałów: *Wprowadzenie w problem badawczy*, *Cel badań*, *Materiały i metody*, *Wyniki*, *Podsumowanie i wnioski* oraz *Bibliografia*. W rozdziale *Wprowadzenie w problem badawczy*, Autorka w sposób właściwy i przystępny wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące realizowanej pracy. Omawia zjawisko poliploidalności oraz stan wiedzy na temat badanych gatunków. W rozdziale *Cel badań* jasno formułuje zadania badawcze i cele badań. Kluczowe znaczenie dla omawianej rozprawy ma cel pracy numer 2. Dotyczy on opracowania zestawu markerów cytogenetycznych przydatnych w badaniach ewolucyjnych analizowanych gatunków ryb. Takie dane mogą być wykorzystywane w badaniach zagrożonych populacji tych ryb występujących w naturze. W rozdziale *Materiał i Metody* Autorka w sposób właściwy i precyzyjny opisuje warunki, w jakich przeprowadzono doświadczenia oraz omawia procedury wykorzystywanych metod badawczych. Najobszerniejszą część opisu w języku polskim stanowi rozdział *Wyniki*, w którym Autorka dokładnie opisuje uzyskane wyniki badań. Pragnę zaznaczyć, że uzyskano wiele wartościowych danych na temat charakterystyki chromosomów badanych gatunków ryb. Niestety w części pisanej w języku polskim brakuje elementów dyskusji, które podkreśliłyby wartość uzyskanych danych cytogenetycznych na tle dotychczasowej wiedzy na ten temat, mimo że Autorka bardzo sprawnie porusza się zarówno w tematyce cytogenetycznej jak i ewolucyjnej, co doskonale widać w ocenianych artykułach naukowych.

Podsumowując całość rozprawy doktorskiej stwierdzam, że wyniki badań przedstawione w obu publikacjach wnoszą nowe, cenne informacje o organizacji genomu na poziomie chromosomów dwóch rodzimych gatunków ryb z rzędu karpiokształtnych. Uzyskane dane dostarczają nowych informacji z zakresu cytotaksonomii i funkcjonalnych cech struktury chromosomów oraz zostały przedyskutowane w kontekście procesów tetraploidyzacji i re-diploidyzacji w genomach tych poliploidalnych gatunków.

#### Wniosek końcowy

Recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, została dobrze zaplanowana i wykonana, a uzyskane na podstawie reprezentatywnego materiału wyniki wzbogacają wiedzę na temat różnorodności cytogenetycznej rodzimych gatunków ryb

poliploidalnych, jakimi są karaś pospolity *Carassius carassius* i piskorz *Misgurnus fossilis*. Rozprawa wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie biologia, a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i bardzo dobre przygotowanie metodyczne.

Stwierdzam, że wszechstronna analiza rozprawy oraz indywidualnego wkładu Kandydatki w przygotowanie publikacji naukowych a także przedstawione w recenzji argumenty, upoważniają do oświadczenia, że praca pt. „Cytogenetyka wybranych poliploidalnych taksonów ryb karpiokształtnych Cypriniformes” odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku „O stopniach i tytule naukowym” ((Dz.U.2003 roku Nr 65, póź.595; z 2005 roku Nr 164 póź. 1365; z 2010 roku Nr 96, póź. 620, Nr 182, póź. 1228, z 2011 roku Nr 84, póź. 455) oraz rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2016 poz. 1586). Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Anety Spóz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Małgorzata Jankun-Woźnicka