

Prof. dr hab. inż. Alicja Boroń
Katedra Zoologii, Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
a-mail: alibo@uwm.edu.pl

**Ocena pracy doktorskiej Pana mgr Mikołaja Kaźmierczaka,
wykonanej w Zakładzie Biologii Ewolucyjnej i Ochrony Kręgowców na Wydziale Nauk
Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego**

Podstawą ubiegania się Pana mgr Mikołaja Kaźmierczaka w postępowaniu o nadanie stopnia doktora jest rozprawa doktorska pod tytułem: „**Eliminacja genomów w komórkach gametogenicznych u hybrydogenetycznych mieszańców żab wodnych (*Pelophylax esculentus* complex)**”, której promotorem jest Pani prof. dr hab. Maria Ogińska, a promotorem pomocniczym Pani dr Magdalena Chmielewska.

Praca dotyczy cytogenetycznego podłoża hybrydogenezy, interesującego sposobu rozrodu, w trakcie, którego ma miejsce proces eliminacji oraz replikacji genomu, a który wyewoluował niezależnie w kilku odległych grupach zwierząt bezkręgowych (owady) i kręgowych (ryby i płazy), i może zachodzić premejotycznie lub w trakcie mejozy. Obiektem badań ocenianej rozprawy są tworzące kompleks żab wodnych *Pelophylax esculentus*, żaba jeziorkowa *P. lessonae* (o genotypie LL), żaba śmieszka *P. ridibundus* (RR) i żaba wodna, będąca podniesionym do rangi gatunku płodnym mieszańcem wymienionych gatunków. W Polsce żaba wodna występuje najczęściej w formie diploidalnej ($2n=26$ chromosomów, genotyp RL) oraz rzadziej spotykanej formie triploidalnej ($3n=39$, genotypy RRL i RLL).

Klarownie napisany wstęp, w którym Doktorant wyjaśnia zjawisko hybrydogenezy w oparciu o przykłady spośród ryb i płazów, charakteryzując hybrydogenezę u *P. esculentus* jako procesy natury molekularnej i cytogenetycznej, prowadzące do głębokich przemian genomowych w komórkach linii płciowej samców i samic, wskazując na różnice w modelu hybrydogenezy mitotycznej u osobników diploidalnych i hybrydogenezy mejozytycznej u mieszańców triploidalnych, wprowadza nas w przedmiotowy problem badawczy. Z treści omawianego rozdziału dowiadujemy się także o stanie wiedzy o hybrydogenezie żab kompleksu *P. esculentus*; przebiegu procesów eliminacji i endoreplikacji genomu w kontekście procesu gametogenezy. Tematyka ocenianej rozprawy doktorskiej wpisuje się znakomicie w nurt światowych badań dotyczących wyjaśniania molekularnego mechanizmu procesów hybrydyzacji wśród kręgowców i związanych z nią skutecznych mechanizmów przekraczania postzygotycznych barier izolacji rozrodczej. Co istotne, badania, będące podstawą pracy zrealizowano w ramach grantu Opus NCN.

Odnosząc się do struktury, na pracę składają się typowe dla prac naukowych rozdziały i zawarta została na 162 stronach. Zaopatrzona jest w dobrze napisane streszczenie w j. polskim i angielskim. Uzyskane wyniki udokumentowano w 22 tabelach, z których sześć znajduje się w treści pracy, a pozostałe, większych rozmiarów za Bibliografią, na końcu pracy. Poza spisem tabel, znajdujący się na początku pracy (str. 4 – 7) wykaz zawiera 32, 22 i 4 odpowiednio, figury, ryciny i wykresy. Przyjęte zróżnicowanie form prezentowania graficznego niepotrzebnie utrudnia śledzenie treści, w tym wyników badań. Dla uproszczenia

należy przyjąć, że są to rysunki i nadać im jednolitą numerację. Wstęp pracy kończą założenia i hipotezy badawcze oraz cele pracy. Materiały i metody oraz najdłuższy w pracy rozdział, jakim są Wyniki, opisano odpowiednio, na 27 i 52 stronach. Nieoczekiwanie, ostatnim podrozdziałem Wyników są, cyt.: „Ogólne wnioski”, podczas gdy, właściwe Podsumowanie i wnioski stanowią odrębny rozdział po bardzo interesującej Dyskusji, zaprezentowanej na 15 stronach. Za podrozdziałem Podsumowanie i wnioski znajduje się Aneks (tabele), zawierający potrzebne i pomocne uzupełnienia dotyczące danych liczbowych, m.in. w odniesieniu do liczby analizowanych komórek metafazowych i interfazowych, ploidii tych komórek oraz liczby komórek w różnych fazach procesu hybrydogenezy, w podziale na stadiach rozwoju osobniczego badanych gatunków. Bibliografia zawiera 179 dobrze dobranych publikacji, zarówno tych wcześniejszych, jak i najnowszych dotyczących prezentowanego problemu badawczego. Z satysfakcją stwierdzam, że liczne cytowane w rozprawie publikacje, w tym m.in. sześć doniesień konferencyjnych z udziałem Doktoranta w charakterze pierwszego autora, to efekt interdyscyplinarnych wieloletnich badań nad procesami rozrodu żab zielonych prowadzonych w zespole Pani Profesor Marii Ogielskiej.

Wracając do wstępu ocenianej rozprawy doktorskiej, w dalszej jego części Doktorant opisał tradycyjne poglądy dotyczące przebiegu hybrydogenezy w kompleksie żab zielonych. Zgodnie z modelowym scenariuszem, tzw. hybrydogenezy mitotycznej u diploidalnych osobników żaby wodnej w gonocytach, w toku podziałów mitotycznych, dochodzi do całkowitej eliminacji genomu jednego gatunku rodzicielskiego, najczęściej jest *lessonae* (L), a następnie endoreplikacji genomu drugiego gatunku, czyli *ridibundus* (R); w efekcie do gamet zostaje przekazany klonalny genom R. Z kolei, mieszańców triploidalnych *P. esculentus* (RRL i RLL) występujących w populacjach mieszańcowych z osobnikami diploidalnymi (RL) dotyczy zmodyfikowany model, tzw. hybrydogenezy mejotycznej. Zakłada on eliminację genomu występującego w pojedynczej wersji, L u R'RL i R u RL'L. Pozostający genom z podwójną kopią nie wymaga dodatkowej duplikacji i pełni rolę rezerwuaru zmienności genetycznej (pomiędzy kopiami R'R lub L'L dochodzi do rekombinacji genetycznej).

W oparciu o dane własne zespołu badawczego, w którym Doktorant wykonał ocenianą pracę doktorską oraz dane literaturowe przyjęto, że przemiany genomowe, takie jak eliminacja i endoreplikacja zachodzą podczas okresu mitotycznego namnażania się gonocytów we wczesnej fazie rozwoju gonad, a nośnikami eliminowanych chromosomów są mikrojądra. W badaniach opisanych w ocenianej rozprawie doktorskiej testowano trzy, moim zdaniem dobrze dobrane hipotezy badawcze odnoszące się do składu genomowego komórek gonad żab zielonych kompleksu *P. esculentus*, cyt.: „1) pierwotne komórki płciowe (PGC) oraz gonocyty (G) w gonadach niezróżnicowanych mają taki sam skład genomowy, jak komórki somatyczne badanego osobnika (RL, RRL, RLL); 2) gonocyty z wczesnych stadiów gonad zróżnicowanych płciowo charakteryzują się zróżnicowaną kompozycją chromosomów R i L; 3) komórki macierzyste plemników (SSC) u osobników dojrzałych płciowo zawierają chromosomy tylko jednego gatunku rodzicielskiego (RR lub LL).”

Doktorant sformułował aż siedem głównych, moim zdaniem ambitnych celów pracy, które zrealizował. Trudność wykonania zaplanowanych badań polegała, m.in. na tym, że podstawą badań określonych w głównych celach pracy były uzyskane wcześniej przez Doktoranta wyniki badań zawarte w rozdziale „Wzory hybrydyzacji u gatunków rodzicielskich *P. ridibundus*, *P. lessonae* oraz mieszańca *P. esculentus*”. Preludium do właściwych badań były testowe hybrydyzacje *in situ* na preparatach chromosomowych kijanek i dorosłych samców gatunków rodzicielskich oraz mieszańców z zastosowaniem wybranych kombinacji sond

genomowych RR, LL, sondy DNA zawierającej centromerową sekwencję powtarzalną RrS1 oraz DNA blokującego. Wyniki tych badań przeprowadzonych wg. pięciu różnych procedur (protokołów) umożliwiły, cyt.: "Wybór protokołu do analizy wyników" (str. 52). Proporcje sondy RR i centromerowej sekwencji repetytywnej RrS1 (1:1) i blokującego DNA w proporcji do ich mieszaniny LL 1:25 i sperma łośosia 1:40 skutkowało silnym i równomiernym związaniem sondy RR i wyraźnym znakowaniem regionów okołocentromerowych 10 dużych i dwóch małych chromosomów metafazowych oraz jąder interfazowych i wyraźnych w nich sygnałów RrS1 identyfikujących materiał genetyczny *P. ridibundus*.

Pan mgr Mikołaj Kaźmierczak wykonał ogromną pracę; opierając się na przyjętej procedurze (protokół nr 2) poddał analizie cytogenetycznej 1020 komórek metafazowych i interfazowych 41 osobników diploidalnych RL, 679 komórek 17 osobników triploidalnych RLL i 393 komórki 12 osobników triploidalnych RRL. Co więcej, badania przeprowadzono na komórkach linii płciowej kijanek od wczesnych stadiów rozwoju osobniczego - premetamorfozy, poprzez prometamorfozę, aż do stadium różnicowania się gonad i ich rozwoju obejmujących intensywne podziały mitotyczne gonocytów, głębokie, strukturalne przemiany genomowe, oraz także na osobnikach postmetamorficznych (juwenilnych samicach) i dorosłych (samcach), których komórki macierzyste miały zawierać zakładany, ujednolicony skład genomowy (RR lub LL). Ponadto, Doktorant wykazał się doskonałą umiejętnością posługiwania się metodami cytogenetyki, w tym metodami cytogenetyki molekularnej, takimi jak: genomowa hybrydyzacja in situ (GISH) i genomowa hybrydyzacja porównawcza (CGH). Gratuluję! pięknych płytek metafazowych i wyraźnych miejsc hybrydyzacji sond w komórkach interfazowych. Tutaj, muszę niestety wspomnieć, że z powodu 'minimalizacji' dokumentacji zdjęciowej wyników pracy ich analiza wymagała zabiegów powiększania, co nie w każdym przypadku było skuteczne.

Za cenne, uważam permanentne wykorzystanie pozyskanych materiałów, o czym Autor napisał (str. 107), cyt.: „Chociaż w niniejszej pracy skoncentrowano się głównie na spermatogenezie, jednak-by nie marnotrawić cennego materiału badawczego-kijanki, które podczas preparacji okazywały się samicami, również wykorzystano do analiz.” Jakkolwiek, wykonywanie badań 'przy okazji' kłóci się z zasadami metodologii, to trudno im nie przyklasnąć.

W mojej opinii, zaprezentowane w pracy dokonania naukowe Pana mgr Mikołaja Kaźmierczaka są nowatorskie i merytorycznie ważne. Posługując się metodami biologii i cytogenetyki wyjaśnił molekularne i co szczególnie cenne, także cytogenetyczne podłoże przebiegu podczas hybrydyzacji procesów przemian genomowych – eliminacji i endoreplikacji zachodzących w komórkach linii płciowej samic i samców, diploidalnych i triploidalnych osobników w kompleksie żaby wodnej *P. esculentus*. Udowodnił, m.in., że eliminacja i endoreplikacja są dwoma niezależnymi od siebie procesami oraz eliminacja poprzedza endoreplikację, ale to endoreplikacja wydaje się fazą obligatoryjną by w procesie hybrydogenezy doprowadzić do powstania żywotnych gamet, a także wykazał nieprecyzyjność procesu eliminacji i endoreplikacji.

Uzyskane wyniki wskazały na przyjęcie weryfikowanych hipotez badawczych, zgodnie z którymi eliminacja i endoreplikacja zachodzą podczas mitotycznego namnażania się gonocytów (pre-spermatogoniów i oogoniów pierwotnych) we wczesnej fazie; nośnikami eliminowanych chromosomów są mikrojądra; pierwotne komórki płciowe (PGC) oraz gonocyty (G) w gonadach niezróżnicowanych charakteryzują się takim samym składem genomowym jak komórki somatyczne danego osobnika (RL, RRL lub RLL); gonocyty z wczesnych stadiów gonad zróżnicowanych płciowo charakteryzują się zróżnicowaną

kompozycją chromosomów R i L; komórki macierzyste plemników (SSC) u osobników dojrzałych płciowo zawierają chromosomy tylko jednego gatunku rodzicielskiego (RR lub LL).

Pan mgr Mikołaj Kaźmierczak, m.in. wykazał, że pregametogeneza i gametogeneza aktywna u samców to dwie oddzielone w czasie fazy, podczas gdy u samic nie są czasowo oddzielone. Udowodnił, że procesy eliminacji i endoreplikacji chromosomów rodzicielskich przebiegają wyłącznie w gonocytach podczas pregametogenezy i nie występują już w komórkach gametogenezy aktywnej (macierzystych SCs i potomnych: gametogoniach wtórnych, mejocytach oraz gametach) u dorosłych osobników. Udokumentował, że gonocyty w gonadzie lanego osobnika nie przechodzą hybrydogenezy w sposób zsynchronizowany i mogą znajdować się na odmiennym etapie rearanżacji chromosomowych, a nawet realizować odmienne scenariusze hybrydogenezy. Wykazał, że hybrydogenetyczna spermatogeneza jest procesem niedoskonałym, generującym, m.in. stosunkowo dużo aneuploidalnych komórek macierzystych plemników, które nie przekształcają się w funkcjonalne gamety (degenerują), co sprawia, że odsetek zapłodnionych jaj w przypadku hybrydogenetycznych samców *P. esculentus* jest wyraźnie niższy w porównaniu do gatunków rodzicielskich.

Za cenne uważam także, obiektywne przedyskutowanie przez Doktoranta uzyskanych wyników, wskazanie ograniczeń zastosowanych metod i/lub konieczność zastosowania innych, w dalszych badaniach. Mikrojądra wykazujące silne sygnały sondy RrS1 uznano za transportujące chromosomy *ridibundus* (R), ale jeśli nie było takich sygnałów to mogły to być zarówno chromosomy L, jak i małe chromosomy R, nie wykazujące sygnału RrS1. Co interesujące, tylko nieliczne mikrojądra miały maksymalnie dwa sygnały fluorescencji sondy RrS1, które wykazano u juwenilnej samicy i samca kijanki o genotypie RLL. Co więcej, zwykle mikrojądro zawiera jeden eliminowany chromosom i aby odrzucić wszystkie 13 należałoby oczekiwać tylu mikrojader, co nie było obserwowane. Jest zatem, możliwe, że eliminacja odbywa się podczas kilku cykli komórkowych, albo kilka chromosomów jest eliminowanych jednocześnie - w sąsiedztwie pojedynczego jądra komórki obserwowano do pięciu mikrojader, jednak ulegały one szybkiej degradacji (nukleofagia). Doktorant zaproponował, że aby wyjaśnić ten etap procesu hybrydogenezy należałoby zastosować przyżyciowe obrazowanie podziałów gonocytów w czasie rzeczywistym.

Wyniki badań zrealizowanych przez Doktoranta uwiarygodniły, że procesy eliminacji i w konsekwencji endoreplikacji zachodzące w trakcie hybrydogenezy żab zielonych są nieprecyzyjne, towarzyszą im liczne degeneracje komórek linii płciowej, obserwowane zwłaszcza w komórkach macierzystych SSC u samców, od 4% u mieszańców RRL, 19% u RLL do 24% u mieszańców RL. Nasuwa się pytanie, czy genom *ridibundus* (R), najczęściej przekazywany przez plemniki diploidalnego mieszańca RL, wykazuje rodzaj potencjału do samo-utrwalenia i przetrwania? Czy uzyskane wyniki wskazują taksony o większym wpływie na przyszłe losy badanego kompleksu żab?

Zagadnieniem, które jest moim zdaniem bardziej dyskusyjne niż je przedstawiono w pracy są możliwe przyczyny obecności licznych, np. niemal 28% aneuploidalnych SSC u dorosłych samców. Pomimo, że jak napisał Doktorant w rozdziale Dyskusja obecność, w tym także porównywalny udział takich komórek był wskazywany przez innych autorów to mogą być one także generowane w trakcie wykonywania preparatów chromosomowych, niezależnie od przyjętych metod. „Uciekające” oraz zbyt słabo rozproszone chromosomy są widoczne, m.in. na Fig. 8/str. 46. O wspomnianej przyczynie może świadczyć duży zakres zidentyfikowanych komórek o innej liczbie chromosomów, w grupie hypo- i hiperploidalnych. W badaniach cytogenetycznych, zazwyczaj podawany jest udział płytek metafazowych o innej

niż oczekiwana liczbie chromosomów. Proszę o wyjaśnienia w tej kwestii. Jestem pewna, że podczas prezentacji pracy w trakcie jej obrony Doktorant zaprezentuje tylko te płytki metafazowe (wycięte z tła) oraz interfazy, które dokumentują kluczowe wyniki.

Doktorant wykazał, że chromatyna gatunków rodzicielskich w gonocytach interfazowych *P. esculentus*, przed rozpoczęciem etapu odrzucania DNA, nie ulega segregacji przestrzennej. W Dyskusji pracy (str. 114) znalazłam, że na przykładzie roślin, można było oczekiwać gromadzenia się chromatyny eliminowanego genomu w peryferyjnych regionach jądra komórkowego w komórkach interfazowych. W rozdziale Materiały i Metody wydaje się nie być informacji o tym, w jaki sposób oceniano przestrzenną organizację genomów gatunków rodzicielskich w gonocytach interfazowych. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego oczekiwano, że chromatyna gatunków rodzicielskich w gonocytach interfazowych *P. esculentus*, przed eliminacją DNA miałyby być oddzielona przestrzennie. Czy ten, jakże bardzo interesujący i obiecujący zarazem aspekt pracy łączy się z zagadnieniem terytoriów chromosomowych; rozmieszczenia konkretnych chromosomów, zależnego od aktywności transkrypcyjnej zawartych w nich genów, ale także od stanu fizjologicznego, stanu zdrowia, wieku osobnika i z reguły zmieniają się także w trakcie ontogenezy?

Bardzo interesującymi znajduję rozważania Doktoranta dotyczące wzajemnych zależności i mechanizmów zachodzenia eliminacji DNA i endoreplikacji jako procesu, odpowiednio poprzedzającego, nieobligatoryjnego i obligatoryjnego. Zdaniem Doktoranta, może mieć to związek z wcześniejszym filogenetycznie(?) pojawieniem się procesu endoreplikacji u kręgowców; podobny proces zachodzi m.in. u niektórych mieszańców ryb rozmnażających się drogą gynogenezy, proszę o komentarz. Pozostałe, powyższe uwagi z mojej strony należy traktować jako głos w dyskusji.

W obliczu wielowątkowych badań i analiz, które z powodzeniem wykonał Pan mgr Mikołaj Kaźmierski nie mógł ustrzec się pewnych nieścisłości czy niedogodności w odbiorze treści pracy, które poniżej wskazuję.

Treść podrozdziału „Zwierzęta” w Materiałach i metodach utrudnia zrozumienie, które zwierzęta w jakim celu były w badaniach wykorzystywane. Rozumiem, że w ramach pracy doktorskiej Autor wykonywał preparaty chromosomowe z tkanek kijanek i dorosłych samców żaby śmieszki i żaby jeziorowej, celem analizy wzorów hybrydyzacji w zależności od sond i blokującego DNA, które uzyskano w procesie izolacji z mięśni szkieletowych samców obu gatunków. Ten etap pracy nie znalazł się w celach badań(?). Stosowny podrozdział w rozdziale Materiały i metody mógłby brzmieć, np. „Zwierzęta wykorzystane do przygotowania sond i blokującego DNA”, następnie „Zwierzęta wykorzystane do wykonania preparatów chromosomowych i kontrolnych reakcji GISH”, itd. Dobrym i klarownym rozwiązaniem byłoby także zorganizowanie tych danych w tabeli zatytułowanej: „Zwierzęta (płeć, genotypy, stadia Gosnera) wykorzystane w poszczególnych etapach badań”, a etapy odnoszące się do wykorzystania zwierząt to: izolacja DNA i przygotowanie sond i blokującego DNA; wykonanie preparatów chromosomowych do testowych i kontrolnych reakcji GISH; krzyżowania *in vitro* i wykonanie preparatów chromosomowych do GISH; kijanki uzyskane w krzyżowaniach *in vitro*; wypręparowywanie jednej gonady i przygotowanie preparatów chromosomowych. Proponowanym sposobem, można byłoby uniknąć, m.in. braku kolejności przywoływania, np. najpierw tabeli nr. 13 i 14, a potem tabeli 1 (str. 26).

Analizowanie zawartości tabel znajdujących się na końcu pracy, zwłaszcza tabeli 7., 8., 13., uważam za utrudnione z powodu ich rozległości i drobnej czcionki. Jednak, pracę doktorską w postaci monografii traktuję jako źródło zebranych w jednym miejscu wszystkich danych

i uważam, że może zawierać wszystkie wyniki dotyczące badanego problemu, dlatego wskazuję, ale nie narzekam. Prezentacja uzyskanych tylko danych, bez pustych kolumn lub ich prezentacja w postaci, np. wykresów kołowych dałaby możliwość pełniejszego prześledzenia uzyskanych wyników.

Moim zdaniem, celowe byłoby wydzielenie w rozdziale Materiały i metody, w zakresie zastosowanych metod podrozdziału: Analiza/ocena ploidii zwierząt, która była wykonywana, co najmniej trzema metodami: wielkość oocytów, wielkość erytrocytów, mikrosatelity, i została podana w sposób rozproszony w tej części pracy. Brak wyjaśnienia w omawianym rozdziale (str. 31) w jaki sposób określano przynależność gatunkową dorosłych żab i kijanek na podstawie polimorfizmu intronu-1 albuminy surowicy.

Z uwagi, m.in. na wspomnianą już wcześniej złożoność i wieloaspektowość wykonanych w ramach ocenianej pracy doktorskiej badań, pożądanym byłoby, aby zaplanowane główne cele pracy zostały przez Doktoranta odniesione do konkretnych przyjętych metod badawczych i jednocześnie przyjętych sposobów ewaluacji uzyskanych wyników. W mojej opinii, wyniki uzyskane wyłącznie w przypadku pojedynczych komórek nie powinny być brane do analiz. Jakkolwiek, rozumiem, że zawarte w pracy szczegółowe dane warto zachować, na potrzeby dalszych badań.

Rozdział Wyniki, moim zdaniem wymagałby przebudowań, tak aby nie zawierał treści odnoszących się, zarówno do materiałów, jak i metod (m.in. str. 54-55; 86 i dalsze). Z drugiej strony, podanie liczby osobników oraz metafaz i interfaz w odniesieniu do materiałów, które posłużyły do analizy badanych procesów ułatwia rozeznanie się w tej części pracy doktorskiej. Szkoda, że Doktorant nie pokusił się o to, aby informacje te w sposób bardziej sumaryczny i przejrzysty niż w rozległych tabelach znajdujących się na końcu pracy, pokazać w rozdziale o materiałach i metodach, nawet w postaci tabel. Ponadto, w omawianym rozdziale znajduje się wiele informacji, wynikających z uzyskanych wyników wraz z próbą ich interpretacji, które powinny znaleźć się w rozdziale Dyskusja. Autor pracy, nie zastosował się także do przyjętej w pracach naukowych reguły, aby rysunki i tabele były czytelne bez konieczności sięgania do treści pracy, np. Tab. 2/str. 49; Wykres 2./str. 60, i inne. Za myłące uważam także podpisy rysunków, m.in. Fig. 1-10, np. Fig. 8., cyt.: „Kijanka *P. lessonae*...”, podczas gdy uwidoczniono płytki metafazowe i jądra komórek w trakcie interfazy w gonadach kijanki....

Z obowiązku recenzenta, poniżej podaję kilka uwag bardziej szczegółowych: 1/ Można się tylko dornyślać znaczenia pojęć: „dużych jaj” i „typowej wielkości jaj” (str. 30); nie znalazłam wyjaśnień w treści pracy; 2/ Nie znalazłam w treści pracy wyjaśnienia do czego, w kontekście celów pracy posłużyła ocena wieku osobników juvenilnych i dorosłych; 3/ W rozdziale Materiały i Metody nie wyjaśniono także dlaczego i kiedy stosowano blokowanie DNA z wykorzystaniem spermy łososia; 4/ Nieodpowiednie podpisy, cyt.: „Osobnik ukazujący złożoność hybrydogenezy.” - w podpisie Fig. 24 oraz „Osobnik ten podążał zgodnie z modelowym scenariuszem hybrydogenezy” - Fig. 26; 5/ Myłąca wydaje się informacja podana na str. 93, cyt.: „Poniżej (Fig. 21-31) przedstawiona została seria zdjęć dokumentujących różne scenariusze eliminacji i endoreplikacji chromosomów w komórkach linii płciowej diploidalnych i triploidalnych mieszańców obu płci.” ponieważ wskazane rysunki dotyczą tylko samiec.

Przytoczone niedociągnięcia, dotyczące przede wszystkim struktury ocenianej rozprawy doktorskiej nie umniejszają osiągnięć naukowych Pana mgr Mikołaja Kaźmierczaka, który podjął się trudnych badań i osiągnął sukces naukowy wyjaśniając, co dzieje się na podłożu cytycznym i molekularnym w trakcie procesów eliminacji i endoreduplikacji zachodzących podczas hybrydogenezy w komórkach gonad żab wodnych z kompleksu

P. esculentus complex. Z satysfakcją stwierdzam, że bardzo dobrze oceniana przez mnie rozprawa doktorska jest kolejną, powstałą w zespole i pod kierunkiem Pani Profesor Marii Ogielskiej, wpisującą się w dokonania naukowe zapoczątkowane przez Profesora, Leszka Bergera, odkrywcy mieszańcowego pochodzenia żaby wodnej.

Podsumowanie

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Mikołaja Kaźmierczaka bez wątpienia stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim jest wyjaśnienie cytogenetycznego podłoża procesu hybrydogenezy, w aspekcie eliminacji genomów w komórkach gametogenicznych u hybrydogenetycznych mieszańców żab wodnych z kompleksu *Pelophylax esculentus*. Zawarte w pracy doktorskiej wyniki, będące efektem starannie zaplanowanych badań z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii i cytogenetyki molekularnej wskazują, że Pan mgr Mikołaj Kaźmierczak posiada ogromną wiedzę teoretyczną w zakresie dyscypliny nauki biologiczne a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669 ze zm.), wnioskuję zatem o jej dopuszczenie do dalszego procedowania.

Z uwagi na merytoryczną wartość naukową wyników zawartych w ocenianej pracy doktorskiej oraz ogromny wkład pracy Pana mgr Mikołaja Kaźmierczaka w ich uzyskanie wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Alg. Rone'