

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Recenzent: dr hab. Andrzej Oleksa

Afiliacja: Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Wydział Nauk Biologicznych, Katedry Genetyki

Kandydat: mgr Robert Mroczek

Tytuł rozprawy: Różnorodność oraz funkcjonalna heterozygotyczność alleli genu komplementarnej determinacji płci pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) / Allelic Diversity and Functional Heterozygosity of the Honey Bee (*Apis mellifera*) Complementary Sex Determiner Gene

Promotor: dr hab. Małgorzata Cebart

Dyscyplina naukowa: Nauki biologiczne

1 Podstawa prawna recenzji

Niniejsza recenzja została sporządzona na wniosek Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk z dnia 16 grudnia 2025 r. Podstawę merytoryczną oceny stanowi **Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.)**, w szczególności **art. 187**, który definiuje wymagania stawiane rozprawie doktorskiej.

2 Wybór tematu i aktualność problematyki

2.1 Znaczenie tematu dla dziedziny naukowej

Badanie mechanizmów determinacji płci, szczególnie u haplodiploidalnych błonkoskrzydłych, ma istotne znaczenie dla pogłębiania wiedzy biologicznej na wielu poziomach organizacji.

Po pierwsze, dostarcza ono fundamentalnych informacji na temat sposobu, w jaki systemy genetyczne regulują przebieg rozwoju organizmu. Determinacja płci jest jednym z najbardziej czytelnych modeli ilustrujących, w jaki sposób określone sygnały genetyczne inicjują odmienne, lecz precyzyjnie zintegrowane ścieżki rozwoju organizmu. Badanie systemów takich jak komplementarna determinacja płci (*csd*) u *Apis mellifera* pokazuje, w jaki sposób alleliczny wariant w jednym locus uruchamia konserwowaną kaskadę regulacyjną obejmującą homologii genów *feminizer* oraz *doublesex*. Przyczynia się to do szerszego zrozumienia regulacji ekspresji genów, alternatywnego składania transkryptów oraz ewolucji szlaków rozwojowych.

Po drugie, mechanizmy te rzucają światło na podstawowe zasady biologii ewolucyjnej. Wielokrotne pojawienie się haplodiploidii oraz systemów typu *csd* w obrębie błonkoskrzydłych stanowi przykład konwergencji ewolucyjnej w odpowiedzi na zbliżone presje selekcyjne. Analizy różnorodności allelicznej, doboru równoważącego oraz obciążenia genetycznego w locus determinujących płeć dostarczają empirycznych modeli do badania mechanizmów utrzymywania polimorfizmu w długich



skalach ewolucyjnych. Systemy te są szczególnie użyteczne w analizie zależności między strukturą kojarzeń, poziomem inbrodu a żywotnością populacji.

Po trzecie, determinacja płci u organizmów haplodiploidalnych ma bezpośrednie implikacje dla genetyki populacyjnej, ochrony przyrody i ochrony zasobów genowych. Ponieważ homozygotyczność w locus *csd* może prowadzić do powstawania diploidalnych samców oraz obniżenia dostosowania, różnorodność genetyczna w tych regionach staje się kluczowym czynnikiem stabilności demograficznej. Łączy to mechanizmy molekularne z procesami zachodzącymi na poziomie populacji, w tym z ryzykiem wymierania, efektywną liczebnością populacji oraz potencjałem adaptacyjnym.

Wreszcie, zagadnienie to integruje genetykę molekularną, biologię rozwoju, teorię ewolucji oraz dyscypliny stosowane, takie jak pszczelarstwo i biologiczna kontrola organizmów szkodliwych. W obliczu nasilającego się spadku liczebności zapylaczy, zrozumienie genetycznej architektury procesów rozrodczych nabiera szczególnego znaczenia dla zarządzania populacjami dzikimi i użytkowymi.

Podsumowując, badania nad determinacją płci u błonkoskrzydłych pogłębiają wiedzę o regulacji rozwoju i procesach ewolucyjnych, a jednocześnie dostarczają podstaw dla praktycznych strategii ochrony różnorodności biologicznej oraz zrównoważonego gospodarowania zasobami.

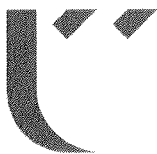
2.2 Oryginalność i nowatorstwo problemu badawczego

Podjęty problem, dotyczący różnorodności allelicznej oraz funkcjonalnej heterozygotyczności genu *csd* u *Apis mellifera*, można uznać za zarówno oryginalny, jak i zgodny z aktualnymi kierunkami badań w naukach biologicznych.

Po pierwsze, mimo że gen *csd* oraz jego rola w determinacji płci u pszczoły miodnej są znane od ponad dwóch dekad (Beye *et al.* 2003), kompleksowe analizy struktury allelicznej w różnych populacjach oraz ich konsekwencji funkcjonalnych pozostają ograniczone. Dotychczasowe badania koncentrowały się najczęściej na identyfikacji i katalogowaniu alleli bądź na szacowaniu ich częstości w wybranych populacjach, natomiast analizy integrujące poziom heterozygotyczności w tym locus z efektami fenotypowymi i demograficznymi — zwłaszcza w populacjach naturalnych lub dziczyńskich — są wciąż słabo rozwinięte.

Po drugie, zagadnienie to bezpośrednio wpisuje się we współczesne priorytety biologii ewolucyjnej i ekologii molekularnej, w których kluczowe znaczenie ma zrozumienie mechanizmów utrzymywania różnorodności genetycznej oraz kształtowania potencjału adaptacyjnego. Problem ten jest ściśle powiązany z badaniami nad wpływem struktury genetycznej na dynamikę populacji, działaniem doboru równoważącego oraz konsekwencjami inbrodu, które stanowią obecnie intensywnie rozwijane obszary badawcze.

Ponadto, w kontekście spadku liczebności zapylaczy oraz przekształceń siedlisk, badania nad genem *csd* mają również wymiar aplikacyjny. Przyczyniają się do optymalizacji strategii hodowlanych, doskonalenia zarządzania różnorodnością genetyczną oraz ograniczania ryzyka związanego z homozygotycznością w populacjach użytkowych i dzikich.



3 Struktura i poprawność formalna pracy

3.1 Układ rozdziałów, ich logiczne powiązanie oraz proporcje między częścią teoretyczną a badawczą

Struktura rozprawy jest zasadniczo spójna i zgodna ze standardami oczekiwanymi wobec pracy doktorskiej w naukach biologicznych. Całość została zorganizowana w sposób konwencjonalny i logicznie uporządkowany — od wprowadzenia teoretycznego, poprzez jasno zdefiniowane cele badawcze i ramy metodologiczne, aż po prezentację wyników, ich omówienie oraz wnioski. Taki układ sprzyja przejrzystości wyводу i umożliwia czytelnikowi systematyczne śledzenie rozwoju problemu badawczego.

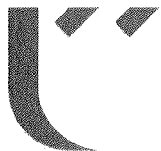
Rozdział wprowadzający został skonstruowany prawidłowo — prowadzi od ogólnych mechanizmów determinacji płci u organizmów haplodiploidalnych do szczegółowych aspektów molekularnych i funkcjonalnych genu *csd*. Przejście od zagadnień ewolucyjnych i populacyjnych do mechanizmów molekularnych oraz funkcjonalnej heterozygotyczności jest logiczne i dobrze powiązane z główną tematyką rozprawy. Wprowadzenie, obejmujące około 14–15 stron w pracy liczącej 96 stron, zachowuje właściwe proporcje i zapewnia odpowiednie osadzenie teoretyczne bez dominowania nad częścią empiryczną.

Wyodrębniony rozdział prezentujący cele badawcze jest metodologicznie uzasadniony i wzmacnia spójność koncepcyjną pracy. Jego umiejscowienie bezpośrednio po wprowadzeniu należy uznać za właściwe, pod warunkiem że sformułowane cele wynikają jednoznacznie z zidentyfikowanych luk poznawczych i znajdują konsekwentne odzwierciedlenie w strukturze rozdziału Wyniki.

Analizując jednak logiczne powiązania między rozdziałami oraz proporcje między częścią teoretyczną a empiryczną, należy wskazać istotną słabość o charakterze strukturalnym. Chociaż praca formalnie rozdziela rozdziały Materiały i metody, Wyniki oraz Dyskusję, granice między tymi częściami nie są konsekwentnie utrzymane. Rozdział Wyniki miejscami zawiera objaśnienia metodologiczne, które powinny znaleźć się w części Materiały i metody. Szczegółowe opisy procedur analitycznych, uzasadnienia techniczne oraz schematyczne przedstawienia przebiegu analiz przerywają prezentację wyników empirycznych i osłabiają wewnętrzną spójność rozdziału.

Co istotniejsze, w części Wyniki pojawiają się rozbudowane fragmenty o charakterze interpretacyjnym oraz częste odwołania do literatury. O ile ograniczone osadzenie kontekstowe jest dopuszczalne, zasadnicze porównania z wcześniejszymi badaniami oraz szersza interpretacja teoretyczna powinny zostać przeniesione do rozdziału Dyskusja. Obecne nakładanie się treści prowadzi do częściowego powielania interpretacji oraz zmniejsza wyrazistość analityczną Dyskusji, która wydaje się relatywnie zwięzła m.in. dlatego, że elementy interpretacyjne zostały już wcześniej wprowadzone.

Wyraźniejsze rozdzielenie funkcji poszczególnych rozdziałów istotnie wzmocniłoby strukturę rozprawy. Część Wyniki powinna koncentrować się wyłącznie na prezentacji danych i obiektywnym opisie zaobserwowanych wzorców, natomiast wyjaśnienia metodologiczne należy ograniczyć do rozdziału Materiały i Metody. Całość interpretacji, synteza z dotychczasową literaturą oraz omówienie implikacji teoretycznych powinny zostać skonsolidowane w rozdziale Dyskusja.



Niezależnie od wskazanej kwestii, ogólne proporcje między częścią teoretyczną a empiryczną są właściwe. Część badawcza wyraźnie stanowi rdzeń rozprawy. Wzmocnienie rozdziału funkcjonalnego między poszczególnymi częściami dodatkowo poprawiłoby spójność logiczną, czytelność oraz zgodność z ugruntowanymi standardami redakcyjnymi obowiązującymi w naukach biologicznych.

3.2 Poprawność językowa i edytorska oraz rzetelność bibliograficzna

Rozprawa charakteryzuje się ogólnie wysokim poziomem językowym i edytorskim. Tekst został napisany formalnym językiem naukowym, z zachowaniem klarownej struktury zdań oraz właściwego stosowania terminologii specjalistycznej. Pojęcia i argumenty przedstawiono w sposób logiczny, a przejście od ogólnego tła teoretycznego do szczegółowych pytań badawczych jest spójne i konsekwentne.

Pod względem redakcyjnym formatowanie rozdziałów, podrozdziałów oraz numeracja są zasadniczo jednolite, co sprzyja czytelności pracy. Pewne drobne usprawnienia mogłyby zostać wprowadzone we Wprowadzeniu, gdzie niektóre tytuły podrozdziałów zawierają powtórzenia treściowe lub niejednorodną kapitalizację (np. „*Apis mellifera* sex determination molecular mechanism” można zastąpić formą „Molecular mechanism of sex determination in *Apis mellifera*”). Również niektóre podrozdziały metodologiczne mogłyby zostać w niewielkim stopniu skonsolidowane w celu ograniczenia nadmiernego rozdrobnienia struktury. Zauważono ponadto nieprawidłowość w spisie treści, gdzie rozdział 3.2.12 został umieszczony przed 3.2.13.

W tekście występuje także niejednorodność zapisu dotycząca locus *csd*, które przedstawiane jest naprzemiennie wielkimi literami (CSD) i małymi literami (*csd*). W biologii molekularnej wielkość liter bywa stosowana do rozróżnienia nazw białek i genów, jednak konwencja ta nie została doprecyzowana w wykazie skrótów (s. 17), co może prowadzić do niejasności interpretacyjnych.

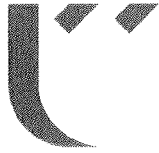
W zakresie rzetelności bibliograficznej cytowania odwołania wydają się poprawne i zgodne z wykazem literatury, przy czym nie pominięto żadnej istotnej pozycji dotyczącej genu *csd*. Formatowanie odwołań w dużej mierze odpowiada standardowym stylom cytowania stosowanym w naukach przyrodniczych, choć odnotowano sporadyczne, drobne odstępstwa dotyczące interpunkcji, kapitalizacji tytułów artykułów bądź kursywy w nazwach gatunkowych, takich jak *Apis mellifera*.

Podsumowując, poziom językowy i edytorski pracy należy ocenić wysoko, a opracowanie bibliografii jako rzetelne. Zalecane są jedynie niewielkie korekty mające na celu zwiększenie jednolitości i precyzji redakcyjnej.

4 Ocena merytoryczna i wkład w rozwój dyscypliny

4.1 Oryginalność rozwiązania problemu naukowego

Rozprawa wykazuje oryginalność w kilku wyraźnie identyfikowalnych aspektach, obejmujących rozwój metodologiczny, generowanie nowych danych empirycznych oraz ich integracyjną interpretację.



Co najważniejsze, w pracy zaproponowano autorskie podejście do genotypowania locus *csd*, w tym opracowanie i walidację metody opartej na terminalnym RFLP, dostosowanej do analizy zawartości zbiorniczka nasiennego matki pszczoły. Stanowi to istotne rozwinięcie metodologiczne, umożliwiające pośrednią ocenę różnorodności allelicznej przekazywanej wraz z nasieniem trutni i magazynowanej przez matki. Zastosowanie klasycznych technik biologii molekularnej w połączeniu z wysokoprzepustowymi platformami sekwencjonowania (Illumina oraz Oxford Nanopore) dodatkowo wzmacnia nowatorstwo podejścia analitycznego oraz umożliwia wzajemną weryfikację identyfikacji alleli.

Ponadto, rozprawa dostarcza nowych danych empirycznych dotyczących różnorodności allelicznej locus *csd* w lokalnych populacjach pszczoły miodnej, w tym identyfikacji dotychczas nieopisywanych wariantów sekwencyjnych u *Apis mellifera*. Wykrycie i charakterystyka tych wariantów poszerzają znany repertuar alleliczny tego locus oraz przyczyniają się do bardziej precyzyjnego rozpoznania jego struktury na poziomie populacyjnym. Uwzględnienie próbek nasienia trutni wprowadza dodatkowy, innowacyjny wymiar reprodukcyjny, dostarczając informacji o dynamice transmisji alleli, która rzadko bywa analizowana w sposób bezpośredni.

Praca rozwija koncepcję funkcjonalnej heterozygotyczności poprzez integrację zmienności sekwencyjnej z predykcjami strukturalnymi interakcji białkowych (m.in. modelowanie oparte na AlphaFold). Stanowi to oryginalną próbę wyjścia poza opisowe katalogowanie alleli w kierunku funkcjonalnej interpretacji wpływu określonych różnic aminokwasowych na wiązanie i aktywność białka CSD. Takie połączenie genetyki populacyjnej z bioinformatyką strukturalną należy uznać za istotny wkład koncepcyjny.

Wreszcie, rozprawa proponuje autorską ramę interpretacyjną łączącą różnorodność alleliczną, biologię reprodukcji oraz konsekwencje populacyjne komplementarnej determinacji płci. Powiązanie zmienności molekularnej z implikacjami demograficznymi i ewolucyjnymi nadaje pracy wielowymiarowy charakter, wykraczający poza tradycyjne analizy o charakterze deskryptywnym.

Łącznie oryginalność rozprawy nie wynika z pojedynczego, izolowanego elementu innowacyjnego, lecz z konsekwentnej integracji nowych rozwiązań metodologicznych, oryginalnych danych empirycznych oraz autorskiej interpretacji łączącej mechanizmy molekularne z procesami ewolucyjnymi i populacyjnymi.

4.2 Samodzielność kandydata

Rozprawa jednoznacznie potwierdza zdolność kandydata do prowadzenia samodzielnych badań naukowych. Praca odzwierciedla wysoki stopień autonomii zarówno w zakresie projektowania eksperymentów, jak i ich realizacji.

Kandydat opracował i zoptymalizował złożony protokół genotypowania locus *csd*, obejmujący analizę terminalnego RFLP, klonowanie, sekwencjonowanie metodą Sangera oraz procedury wysokoprzepustowego sekwencjonowania (Illumina i Oxford Nanopore). Integracja wielu podejść molekularnych, w połączeniu z bioinformatyczną analizą różnorodności allelicznej i funkcjonalnej heterozygotyczności, wskazuje na wszechstronne kompetencje techniczne oraz inicjatywę metodologiczną.



Ponadto kandydat zaplanował i przeprowadził szeroko zakrojone próbkowanie terenowe, obejmujące pozyskiwanie nasienia trutni oraz próbek tkankowych z lokalnych populacji *Apis mellifera*. Opracowanie schematu doboru prób, wybór celów analitycznych oraz interpretacja uzyskanych danych zostały zrealizowane w sposób samodzielny, co świadczy o niezależności decyzyjnej. Oryginalność analityczna przejawia się również w integracji modelowania strukturalnego (predykcje AlphaFold) z danymi genetycznymi na poziomie populacyjnym, co wymagało syntezy podejść interdyscyplinarnych łączących biologię molekularną, genomikę oraz teorię ewolucji. Wreszcie, zdolność do krytycznej oceny wyników, formułowania wniosków oraz osadzania uzyskanych rezultatów w szerszym kontekście naukowym świadczy o dojrzałości badawczej. Łącznie przedstawione elementy potwierdzają wysoki stopień samodzielności naukowej oraz zdolność kandydata do planowania, realizacji i interpretacji badań w sposób autonomiczny.

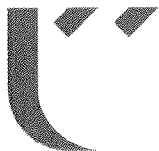
5 Uwagi krytyczne i dyskusyjne

Pomimo ogólnie wysokiego poziomu rozprawy, kilka kwestii wymaga uwagi:

- 1) **Przejrzystość i konsolidacja części teoretycznej.** Niektóre podrozdziały Wprowadzenia (np. 1.5 „Structure of *Apis mellifera* complementary sex determiners, gene and protein” oraz 1.6 „Molecular mechanism of sex determination”) wykazują częściową redundancję treści i mogłyby zostać scalone. Uporządkowanie oraz skrócenie tych fragmentów poprawiłoby płynność narracji oraz wzmocniło powiązanie między tem teoretycznym a celami badawczymi.
- 2) **Pogłębienie rozdziału Dyskusja.** Dyskusja (s. 78–85) jest relatywnie zwięzła w porównaniu z rozdziałem Wyniki. Choć zawiera interpretację uzyskanych danych empirycznych, bardziej pogłębiona analiza implikacji ewolucyjnych i populacyjnych funkcjonalnej heterozygotyczności oraz nowo zidentyfikowanych wariantów *csd*, osadzona szerzej w kontekście literaturowym, wzmocniłaby krytyczny wymiar opracowania.
- 3) **Strategia doboru prób.** Opis schematu próbkowania rodzin pszczołich nie jest w pełni jednoznaczny w zakresie liczby larw robotnic przypadających na rodzinę. Przybliżone średnie, oszacowane na podstawie całkowitej liczebności próby, wynoszą:
 - Pasieka 1: ~187 robotnic na rodzinę (2061/11)
 - Pasieka 2: ~85 robotnic na rodzinę (256/3)
 - Pasieka 3: ~70 robotnic na rodzinę (351/5)

Nierównomierne próbkowanie oraz nieproporcjonalna reprezentacja pasiek mogą prowadzić do obciążenia estymacji różnorodności allelicznej. Ponadto wielokrotne próbkowanie w kolejnych latach oraz potencjalna wymiana matek nie zostały jednoznacznie omówione, co rodzi wątpliwości dotyczące możliwej pseudoreplikacji czasowej. Bardziej precyzyjne uzasadnienie intensywności próbkowania oraz omówienie jego ograniczeń zwiększyłoby wiarygodność analityczną pracy.

W celu poprawy estymacji częstości alleli *csd* na poziomie populacyjnym można rozważyć modyfikację strategii próbkowania polegającą na objęciu analizą większej liczby rodzin zamiast



intensywnego próbkowania mniejszej ich liczby. Ze względu na wysoką polimorficzność locus *csd* oraz fakt, że każda rodzina reprezentuje jedynie część puli allelicznej populacji, zwiększenie liczby badanych rodzin pozwoliłoby uchwycić większy zakres zmienności genetycznej. Praktyczne podejście mogłoby obejmować analizę umiarkowanej liczby robotnic na rodzinę (np. 20–30 osobników), co zwykle wystarcza do rekonstrukcji większości linii ojcowskich. Przykładowo, jeśli rzadki allel *csd* występuje z częstością około 5% w populacji, pobranie 25 robotnic z rodziny daje prawdopodobieństwo przekraczające 0,999 jego wykrycia na poziomie rodziny, natomiast uwzględnienie 30–50 rodzin zapewnia solidne pokrycie zmienności populacyjnej. Strategia ta pozwala zachować równowagę między rozdzielczością wewnątrzrodzinną a reprezentatywnością populacyjną, ogranicza wpływ nierównych liczebności rodzin oraz umożliwia bardziej precyzyjne oszacowanie efektywnej liczby alleli *csd* (k_e).

- 4) **Doprecyzowanie sposobu liczenia kopii alleli w obliczeniach prawdopodobieństwa.** Wyrażenie $(1-p)^n$ jest poprawne, jeżeli n oznacza liczbę niezależnie próbkowanych kopii genu (s. 47). W przypadku próbkowania N diploidalnych osobników (robotnic) analizie podlega $2N$ kopii genu. Wzór pozostaje zatem prawidłowy, jednak wyłącznie wówczas, gdy n odnosi się do liczby kopii alleli, a nie do liczby osobników.

Podsumowując, wskazane kwestie nie podważają wartości naukowej rozprawy, lecz wskazują obszary, w których można zwiększyć przejrzystość wyводу, integrację treści oraz głębokość analizy.

6 Pytania do Doktoranta:

1. W jaki sposób uzyskane wyniki mogą zostać przełożone na praktyczne rekomendacje dla pszczelarzy lub programów ochrony populacji pszczoł miodnych?
2. Gdyby dysponował Pan nieograniczonymi zasobami, w jaki sposób przeprojektowałby Pan strategię próbkowania, aby zwiększyć skuteczność wykrywania rzadkich alleli *csd* u *Apis mellifera*?
3. Czy opracowane podejście metodologiczne mogłoby zostać zaadaptowane do analizy innych silnie polimorficznych loci lub zastosowane u innych owadów społecznych o zbliżonym systemie kojarzeń?



7 Konkluzja i wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę przedstawioną analizę, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Roberta Mrocza pt. „Różnorodność oraz funkcjonalna heterozygotyczność alleli genu komplementarnej determinacji płci pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) / Allelic Diversity and Functional Heterozygosity of the Honey Bee (*Apis mellifera*) Complementary Sex Determiner Gene” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauk biologicznych, a także jego umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Przedłożona rozprawa spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie mgr Roberta Mrocza do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, w tym do publicznej obrony rozprawy.

Bydgoszcz, 18.02.2026

dr hab. Andrzej Oleksa