



INSTYTUT PARASITOLOGII im. Witolda Stefańskiego Polska Akademia Nauk

ul. Twarda 51/55  
00-818 WARSZAWA  
SKR. POCZ. 8  
tel. 620-62-26  
fax: 620 62 27  
email: iparpas@twarda.pan.pl

Prof. dr hab. Bożena Moskwa

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN

00-818 Warszawa

ul. Twarda 51/55

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**mgr Marleny Wojciechowskiej**

**„Analiza zmienności genetycznej żubra *Bison bonasus* na podstawie markerów SNP  
(Single Nucleotide Polymorphism)”**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska zaczyna się od słów „Żubr – król puszczy, największy ssak lądowy Europy, w swej historii, jak na króla przystało miewał burzliwe lata. Gatunek ten na początku XX wieku stanął na skraju zagłady.” Tak mogła by się zacząć niejedna baśń napisana przez Marię Konopnicką lub Hansa Christiana Andersena. Jednakże recenzowana rozprawa doktorska to nie baśń. To wyniki niezwykle skomplikowanych badań w których podjęto próbę znalezienia markerów genetycznych służących wykrywaniu (potwierdzeniu lub zaprzeczeniu) zmienności genetycznej. Jest to szczególnie ważne w przypadku żubrów *Bison bonasus*, których populacja wynosi aktualnie 7130 osobników. Należy jednak pamiętać że obecnie w obrębie gatunku wyróżnia się dwie linie genetyczne: nizinną, zwaną też białowieską (LB), która wywodzi się od 7 żubrów podgatunku nizinnego *Bison bonasus bonasus* oraz nizinno-kaukaską (białowiesko-kaukaską), oznaczaną symbolem LC, której początek dali przedstawiciele dwóch podgatunków, w tym ostatni przedstawiciel podgatunku kaukaskiego *B. b. caucasicus*. Niezwykle istotnym jest, że ta mała liczba założycieli ma ogromny wpływ na obserwowany wysoki poziom inbrodu oraz znaczną utratą zmienności genetycznej gatunku.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska obejmuje 75 stron i została podzielona na 11 głównych rozdziałów: wstęp; przegląd literatury; cele badań; materiał; metody; wyniki; dyskusja, podsumowanie i wnioski; spis tabel, wykresów i rycin; bibliografia i załączniki, które

choć przedstawione oddzielnie stanowią integralną część rozdziału „Wyniki”. Rozprawa doktorska zawiera również streszczenia: w języku polskim i angielskim, 7 Tabel, 14 Wykresów, 5 Rycin oraz 1 Załącznik stanowiący wykaz wszystkich prób badanych z wykorzystaniem mikromacierzy bydlęcych.

Rozdział zatytułowany „**Wstęp**” (str. 8) w sposób syntetyczny przedstawia znaczenie podjętego problemu badawczego.

Rozdział zatytułowany „**Przegląd literatury**” obejmuje czternaście stron (str. 9-22). W pierwszym podrozdziale zatytułowanym „Zubr” Doktorantka przedstawiła charakterystykę, historię i strukturę genetyczną gatunku. Kolejny podrozdział omawia „Badania genetyczne zębów” ze szczególnym uwzględnieniem tych które skupiały się przede wszystkim na

znalezieniu różnic między zębami. Były to badania polimorfizmu allozymów, genów głównego układu zgodności tkankowej MHC (np. genów DQB i DRB), genów: TSPY, SRY, ZFY czy fragmentu genu amelogeniny AMEL. Doktorantka omówiła również analizy tzw. markerów neutralnych, nie podlegających selekcji jak np. sekwencji mikrosatelitarnych oraz wykorzystywanie mikromacierzy do analizy markerów SNP. Ta ostatnia metoda wydaje się być niezwykle przydatna ponieważ umożliwia analizowanie setek tysięcy markerów jednocześnie. Wykorzystanie ww. metod zostało poparte danymi literaturowymi. Ostatni podrozdział w tej części rozprawy pt.: „Polimorfizm jednonukleotydowy – charakterystyka i wybrane metody analiz markerów SNP” przedstawia informacje o rodzajach mikromacierzy, które zostały stworzone z myślą o analizach genomu człowieka i zwierząt gospodarskich; a od niedawna ich potencjał jest również skutecznie wykorzystywany w badaniach populacji zwierząt dziko żyjących, a szczególnie tych spokrewnionych filogenetycznie. Omawia również zasady wykonywania badań na specjalnie wyznakowanej silikonowej płytce.

**Cel badań** (str. 22) zawiera 2 wyraźnie sprecyzowane punkty: (●) poszukiwanie markerów SNP (Single Nucleotide Polymorphism) mogących posłużyć do identyfikacji osobniczej i rozróżnienia dwóch linii genetycznych zębów: nizinnej i nizinno-kaukaskiej oraz (●●) zweryfikowanie dokonanego wyboru markerów oraz analiza zmienności genetycznej gatunku. W mojej opinii drugi punkt został sformułowany niekonwencjonalnie, dlatego proszę o jego wyjaśnienie co Doktorantka rozumie pod pojęciem „zweryfikowanie”?

Rozdział zatytułowany „**Materiał**” obejmuje 2 strony pracy (str. 24-25) zawiera ogólną charakterystykę materiału badawczego i szczegółową charakterystykę prób wykorzystanych w

dwóch etapach wykonanych analiz. Materiał do badań stanowiły próby krwi obwodowej oraz tkanki miękkie pozyskane od żubrów z polskich i zagranicznych ośrodków hodowli, ale również od osobników ze stad wolnościowych. W Etapie I – Analiza z wykorzystaniem mikromacierzy SNP badano próby DNA pochodzące od 144 żubrów, a w Etapie II – Analiza z wykorzystaniem KASP badano próby od 300 osobników.

Rozdział 5 „Metody” (str. 23-36) został podzielony na trzy podrozdziały: „Przygotowanie materiału biologicznego do badań” ze szczególnym uwzględnieniem zasad pobrania i przechowywanie materiału biologicznego; „Procedury laboratoryjne” zawierający szczegółowe schematy I i II Etapu prowadzonych badań. Szczególną uwagę w omawianym rozdziale zwraca podrozdział „Odczyt, kontrola jakości i interpretacja wyników”, w kontekście obu Etapów badań. Zawiera on informacje nie tylko o konieczności utworzenia specjalistycznych plików wymaganych do interpretacji wyników, ale również opisy podejmowanych kolejnych kroków w celu przeprowadzenia prawidłowej analizy uzyskanych wyników. Po zaimportowaniu zaprojektowanych i utworzonych plików do programu tworzono klastry odpowiadające genotypom prób dla każdego markera SNP; dokonano filtrowania wyników na podstawie frekwencji; a w przypadku odchyień od wyznaczonych obszarów wykonywano powtórne klastrowanie. W końcowym etapie generowano szereg raportów: raport DNA, podsumowujący markery SNP, końcowy i raport błędów, które poddawano dalszej analizie. W II Etapie badań zwracano uwagę na intensywność świecenia ła fluorochromów, ponieważ miała ona znaczenie dla analizy uzyskanych wyników.

W podrozdziale 5.4 znajdujemy opis wykorzystanych metod statystycznych (str. 36). Do analizy statystycznej uzyskanych wyników zastosowano program GenAlEx 6.5 (Peakall i Smouse 2012) oraz STRUCTURE 2.3.4. Wykorzystanie tak rozbudowanych programów statystycznych umożliwiło przeprowadzenie wielowątkowej analizy wyników z uwzględnieniem wszystkich analizowanych zależności.

Na str. 24 (Materiał) czytamy „We wstępnym etapie badań (Wojciechowska i wsp. 2017) poddano analizie łącznie 144 próby DNA pochodzące od żubrów.”. Natomiast na str. 27 (Metody) znajdujemy informację „Do genotypowania 91 prób wykorzystano mikromacierze BovineSNP50 v2 BeadChip, natomiast przy użyciu BovineHD BeadChip (Illumina) przebadano 46 prób, uwzględniając 8 prób przeanalizowanych na obu platformach, w celu weryfikacji powtarzalności wyników’ co daje sumę 145 . Skąd ta drobna różnica?

W I Etapie badań analiza z wykorzystaniem mikromacierzy SNP „pozytywny efekt genotypowania uzyskano dla 129 osobników” ze 144 (str. 24). Co mogło być przyczyną takiego

wyniku? Podobną informację znajduję w przypadku II Etapu analiz z wykorzystaniem KASP (str. 25): „W przypadku 14 osobników nie udało się uzyskać satysfakcjonujących wyników i zostały one usunięte z dalszych analiz”. Jaka mogła być tego przyczyna?

Rozdział **Wyniki** zawarty na 16 stronach (str. 37-52) został skonstruowany zgodnie z celami naukowymi rozprawy. Jako pierwsze przedstawiono wyniki dotyczące wyboru markerów SNP dedykowanych dla badanego gatunku, a następnie wyniki które dotyczyły analizy zmienności genetycznej żubrów przeprowadzonej w dwóch etapach.

Prawidłowy wybór markerów był niezwykle istotny. Był bowiem ściśle związany z ich późniejszym wykorzystaniem/zastosowaniem do rozróżniania linii genetycznych, identyfikacji osobniczej i kontroli pochodzenia. Wychodząc z pierwotnej liczby 54609 sond zawartych w mikromacierzy BovineSNP50 v2 BeadChip i 777962 sond zawartych w mikromacierzy BovineHD BeadChip wykonując kolejne analizy Doktorantka sukcesywnie zawężyła liczbę markerów mogących spełniać zakładane kryteria przydatności. W wyniku kolejnych analiz ze 1536 SNP wybrano 321 markerów, które mogły posłużyć do potwierdzania/wykluczenia przynależności żubrów do jednej z dwóch linii genetycznych. Wyniki analizy PCoA pozwoliły na zgrupowanie linii nizinnej w jeden zwarty klaster, wyraźnie oddalony od linii nizinno-kaukaskiej. W wyniku kolejnych analiz markerów SNP Doktorantka wykazała, że już kombinacja 5 markerów pozwala na znaczące wykluczenie możliwości wystąpienia identycznego genotypu, a 10 markerów jeszcze to prawdopodobieństwo zmniejsza. Natomiast do wykluczenia rodzicielstwa z prawdopodobieństwem 90% wystarczy kombinacja 7, z prawdopodobieństwem 99% 15 SNP.

Jak wynika z kilkakrotnych informacji zawartych w recenzowanej rozprawie doktorskiej wybór markerów stanowił badania wstępne do dalszych analiz. Choć wyniki te zostały opublikowane (Wojciechowska i wsp. 2017) to znaczna ich część znajduje swoje odzwierciedlenie w rozprawie. W mojej opinii nie byłoby uchybieniem dołączenie ww. publikacji jako integralnej części rozprawy.

W drugiej części rozdziału „Wyniki” Doktoranta prezentuje wyniki analiz zmienności genetycznej dwóch linii genetycznej żubrów. Analiza z wykorzystaniem mikromacierzy SNP wykazała między innymi że:

- Obserwowana heterozygotyczność dla wszystkich badanych zwierząt wynosiła 0,237. Wartość ta jest dużo niższa, niż  $H_o$  otrzymana na podstawie panelu markerów SNP wybranych w celu identyfikacji osobniczej. Co to oznacza?

- Analiza frekwencji alleli, wykazała, że obie linie różniły się istotnie dla 253 markerów, natomiast dla 215 markerów były to różnice wysoko istotne.
- Odnotowano allele unikatowe występujące tylko w jednej z badanych linii genetycznych: 51 SNP dla linii nizinno-kaukaskiej i jeden allel dla linii nizinnej.
- Wytypowane markery pozwoliły na zgrupowanie osobników z linii nizinnej w jeden zwarty klaster, co wskazuje na mały stopień zróżnicowania genetycznego w porównaniu z linią nizinno-kaukaską. Wyniki uzyskane dla osobników linii nizinno-kaukaskiej były bardziej rozproszone i wyraźnie oddzielone od linii nizinnej (Wykres 4).
- Wyniki klastrowania w korelacji z miejscem bytowania żubrów wskazały/potwierdziły pokrewieństwo genetyczne zwierząt w hodowlach.

Wyniki badań uzyskane na podstawie wytypowanych markerów SNP są perspektywiczne, a jak pisze Doktorantka (str. 49) „w przyszłości może to stanowić cenne narzędzie wspomagające obecne metody zarządzania gatunkiem, np. w wyborze osobników, które należy przewieźć do innych ośrodków w celu wzbogacenia genetycznego”.

Analizując wyniki uzyskane podczas analiz z wykorzystaniem KASP Doktorantka zwraca szczególną uwagę na trzy markery: KASP064, KASP502 i KASP759 charakteryzujące się znacząco różną heterozygotycznością ( $H_o$ ) w obu liniach genetycznych żubrów. Markery KASP064, KASP502 cechowała najwyższa wartość  $H_o$  w linii nizinnej, a marker KASP759 osiągnął najwyższą wartość  $H_o$  dla linii nizinno-kaukaskiej. Dla pozostałych markerów uzyskane wyniki były zgodne z uzyskanymi w Etapie I.

Dodatkowo wyniki uzyskane w Etapie II badań były zgodne z uzyskanymi w Etapie I w zakresie:

- malejącego prawdopodobieństwa wystąpienia identycznego genotypu wraz z zwiększającą się liczbą zastosowanych markerów,
- znacznego zróżnicowania genetycznego w obrębie linii nizinno-kaukaskiej.

Natomiast wyniki uzyskane w II Etapie (PCoA) nie pozwalają na jednoznaczne przypisanie osobników do konkretnej linii genetycznej, co wydaje się być dość znaczną niedogodnością metody. Czy zatem KASP jest metodą przydatną skoro nie można jednoznacznie przypisać osobników do jednej z dwóch linii genetycznych? Czy brak takiej możliwości nie jest znaczącą a wręcz wykluczającą wadą metody?

Oprócz wyników podrozdział ten zawiera również informacje dotyczące samej metody, jej zalet i stosowanej aparatury (str. 49). Moim zdaniem dane to powinny się znaleźć w Metodach lub Dyskusji.

Rozdział **Dyskusja** został zawarty na 10 stronach (str. 53-62) i podzielony na dwie części: „Wybór markerów” oraz „Analiza zmienności genetycznej żubrów dwóch linii genetycznych”. W pierwszej części Doktorantka analizuje aspekty kontroli jakości genotypowania; kontroli czystości gatunkowej, bądź linii genetycznej; identyfikację osobniczą i kontrolę rodzicielską oraz „Przeniesienie” wybranych markerów SNP na inną metodę np. RFLP, KASP 59 w odniesieniu do innym badań naukowych. Doktorantka zwraca uwagę na fakt, że zaadaptowanie znanej metody na nowy gatunek jest bardziej efektywne i mniej kosztochłonne, niż szukanie nowych markerów, czy opracowywanie metod *de novo*; jednakże wymaga skomplikowanych procedur optymalizacji. Podkreśla również, że nie wszystkie, a jedynie część markerów SNP z zastosowanych mikromacierzy bydlęcych przeszła pozytywną kontrolę jakości i mogła być zastosowana w badaniach genetycznych żubrów. Analizuje znaczenie markerów SNP i możliwości ich wykorzystania w badaniach genetycznych w kontekście przynależności do linii genetycznej, czystości gatunkowej, kontroli pochodzenia, krzyżowania z innymi gatunkami, wykluczenia lub potwierdzenia rodzicielstwa. Doktorantka przedstawia również zalety i wady wykorzystywania markerów SNP w innych niż mikromacierze metodach badawczych.

W drugiej części dyskusji „Analiza zmienności genetycznej żubrów dwóch linii genetycznych” Doktorantka dyskutuje wyniki własne z wynikami innych badań prowadzonych na żubrach, a także z wynikami badań prowadzonych na bydle azjatyckim i europejskim, kilku gatunkach jeleni i dwóch gatunkach dzikich owiec. Podkreśla znaczącą rolę nielicznych grup założycielskich na aktualne zróżnicowanie genetyczne obu linii żubrów.

Rozdział „**Podsumowanie i wnioski**” (str.63) zawiera 5 dobrze sformułowanych wniosków. Natomiast wniosek 4 „Linia nizinna charakteryzuje się niższą zmiennością genetyczną względem linii nizinno-kaukaskiej” można uznać za wniosek ale i wynik jednocześnie. We wniosku 3 słowo „uzyskać” sugeruję zamienić na „wytypować” co sprawi że wniosek będzie bardziej „stanowczy”. Proponuję również zastąpić słowo „Sprawdzono” (5 rząd od dołu) na słowo „Potwierdzono”. Ponieważ w rozdziale najpierw przedstawione są wnioski a potem podsumowanie tytuł rozdziału powinien brzmieć „Wnioski i podsumowanie”, a nie odwrotnie.

**Bibliografia** na którą powołuje się Doktorantka w rozprawie stanowi 66 pozycji. Najstarsza z nich pochodzi z 1991 r. i jest to publikacja metodyczna. Najnowsza cytowana praca została opublikowana w 2019 r. i dotyczy markerów genetycznego różnicowania u bydła.

Może wydawać się ze 66 pozycji literaturowych nie jest liczbą imponującą, jednak ze względu na specyfikę badań, podobna tematyka nie jest często podejmowana. Należałoby jednak zmienić nagłówek tego rozdziału na „Bibliografia”, a nie „Spis tabel, wykresów i rycin”.

Wskazane przeze mnie wcześniej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią Jej oryginalne osiągnięcie i w tym zakresie poszerzają wiedzę w zakresie wielopłaszczyznowych badań nad zmiennością genetyczną żubra. W mojej opinii uzyskane wyniki uzyskają akceptację szerszego grona recenzentów i szybko zostaną opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych

**Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Marleny Wojciechowskiej pt.: „Analiza zmienności genetycznej żubra *Bison bonasus* na podstawie markerów SNP (Single Nucleotide Polymorphism)” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.Ustaw nr 65, poz 595 z późn. zm).**

**Mając powyższe na uwadze przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Marleny Wojciechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Warszawa, 12 czerwiec 2019 r.



Prof. dr hab. Bożena Moskwa