

Poznań, 8. czerwca 2019

Prof. dr hab. Tomasz Szwaczkowski
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Marleny Wojciechowskiej
pt. „Analiza zmienności genetycznej żubra *Bison bonasus* na podstawie markerów
SNP (Single Nucleotide Polymorphism)”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Olech-Piaseckiej (promotor)
i dr Zuzy Nowak-Życzyńskiej (promotor pomocniczy)
na Wydziale Nauk o Zwierzętach
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Podstawą wykonania recenzji jest pismo Dziekana Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW z dnia 8. maja 2019 roku – WNZ-47/2019.

Zmienność jest jednym z głównych atrybutów przyrody ożywionej, w tym świata zwierząt. W przypadku stad zwierząt gospodarskich jest podstawowym wskaźnikiem informującym o możliwościach prowadzenia efektywnej pracy hodowlanej. Przede wszystkim jednak obrazuje bogactwo zróżnicowania, co jest szczególnie istotne w unikalnych populacjach, objętych programami ochrony zasobów genetycznych.

Znane są trzy główne podejścia do oceny zmienności genetycznej zwierząt, na podstawie: rodowodów (a ściślej: udziału założycieli), zróżnicowania danej cechy osobników spokrewnionych (wówczas zwykle szacowane są poszczególne komponenty wariacji fenotypowej) oraz analizie polimorfizmu wybranych loci. Pierwsze dwie grupy metod bazują na rachunku prawdopodobieństwa i statystyce matematycznej, co z jednej strony tworzy poczucie biologicznych uproszczeń, a z drugiej prowadzić może do obciążenia oszacowań błędem (szczególnie w sytuacji niekompletnych bądź płytkich rodowodów zwierząt z małych populacji). Ocena zmienności na podstawie polimorfizmu loci markerowych dostarcza rzeczywistych informacji o zróżnicowaniu genetycznym osobników. Wymaga jednak zastosowania zaawansowanych technik molekularnych, co w przypadku zwierząt wolnożyjących (w przeciwieństwie do większości gatunków

zwierząt gospodarskich) stanowi poważne wyzwanie. W nurt tych poszukiwań dobrze wpisuje się recenzowana dysertacja doktorska.

1. Charakterystyka rozprawy

Oceniana praca ma typową strukturę rozprawy naukowej: streszczenia w językach polskim i angielskim (2 strony), spis treści (2), wstęp (1), przegląd literatury (14), cel badań (1), materiał (2), metody (11), wyniki (16), dyskusja (10), podsumowanie i wnioski (1), spis tabel, wykresów i rycin (2), bibliografia (6) oraz załącznik (4). Ponadto, dołączone są stosowne oświadczenia promotora oraz autora pracy. Materiał biologiczny pobrano zgodnie z obowiązującymi procedurami, z akceptacją Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Warszawie.

Generalnie, streszczenie zawiera najważniejsze tezy rozprawy. Natomiast wstęp jest, moim zdaniem, zbyt lakoniczny. Przegląd literatury można postrzegać jako dobre kompendium wiedzy z zakresu biologii żubra. Ponadto, ta część dysertacji zawiera przekonującą motywację celów badawczych. Autorka syntetycznie zaprezentowała informacje na temat struktury genetycznej populacji żubra odwołując się do realizowanych badań genetycznych z tego zakresu. Wpisuje się to w ciąg logicznych i konsekwentnych dociekań naukowych prowadzonych przez zespół Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt SGGW. Jak już wspomniałem, na tym tle zostały sformułowane cele badawcze ukierunkowane na identyfikację panelu sekwencji pojedynczych polimorficznych nukleotydów (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*), przede wszystkim do klasyfikacji przynależności żubrów do jednej z dwóch linii (nizinnej i nizinno-kaukaskiej). Doktorantka podjęła się też zadania wskazania markerów specyficznych, które umożliwiłyby identyfikację osobniczą. Kolejnym celem (choć niezbyt wyraziście wyeksponowanym) była weryfikacja przydatności dwóch podejść metodycznych do identyfikacji polimorfizmów pojedynczych sekwencji. Ponadto, dokonano analizy zmienności genetycznej obydwu populacji.

W rozdziale „Materiał” Autorka zaprezentowała liczebności zgenotypowanych osobników z poszczególnych grup, użyte w analizach w ramach pierwszego etapu badań (bazującego na mikromacierzach: *BovineSNP50 v2 BeadChip* oraz *BovineHD BeadChip*) i drugiego etapu (odwołującego się do techniki KASP). Zwierzęta pochodziły

z polskich i zagranicznych ośrodków hodowlanych oraz z tzw. stad wolnościowych. Analizą mikromacierzy objęto łącznie 129 osobników obu płci (z obydwu linii). Natomiast w drugim podejściu (allelospecyficznnej reakcji PCR, przy wykorzystaniu techniki KASP) wykorzystano informacje o genotypach 286 osobników. Tak kompleksowe podejście do doboru materiału badawczego stanowi dobrą podstawę do formułowania wiarygodnych wniosków.

W kolejnym rozdziale, Doktorantka szczegółowo omówiła zastosowane procedury molekularne, co z pewnością pozwoli na użycie tej metodyki potencjalnym użytkownikom. Podkreślenia wymaga skrupulatność w weryfikacji danych i uzyskiwanych wyników. Grupę „kontrolną” stanowiły próby pochodzące od bydła. Zastosowano standardowe kryteria filtrowania wyników genotypowania, poszerzając je (ze względu na specyfikę populacji) o poprawność identyfikacji rodzic-potomek oraz rodzic-rodzic-potomek). Natomiast zbyt lakonicznie zaprezentowano analizę statystyczną (patrz: uwagi i komentarze).

Rozdział „Wyniki” składa się z dobrze wyodrębnionych części, przyjaznych czytelnikowi w lekturze tekstu. Najpierw szczegółowo i kompetentnie omówiono kwestie związane z wyborem markerów SNP w kontekście rozróżnienia obydwu linii genetycznych. Bardzo przydatna okazała się wizualizacja wyników analizy składowych głównych (szczególnie na wykresie 1), która wskazuje jednoznacznie na większą konsolidację genetyczną linii nizinnej. W następnej części dysertacji, Doktorantka skomentowała markery SNP do identyfikacji osobniczej i kontroli pochodzenia. Spośród 15062 markerów SNP, na podstawie kontroli ich jakości, wybrała 763. Ważnym wynikiem jest wskazanie liczby SNPów potrzebnych do wykluczenia rodzicielstwa. Wykazano, że do wykluczenia hipotetycznej pary rodziców z prawdopodobieństwem 0.9 wystarczy tylko 7 markerów, a dla prawdopodobieństwa 0.99 należy użyć 15 SNPów. Natomiast gdy nieznany jest genotyp drugiego z rodziców do osiągnięcia wyżej wymienionych progów prawdopodobieństwa potrzeba odpowiednio: 18% i 23%. Są to ważne wnioski nie tylko z poznawczego, lecz także z aplikacyjnego punktu widzenia. W następnej części tego rozdziału dokonano analizy zmienności genetycznej obydwu linii żubrów, bazując na 499 polimorficznych sekwencjach nukleotydów zarówno o zróżnicowanej liczebności (od 2 do 41) jak i rozmieszczeniu (średni dystans wynosił od 1288 do 8231 kbp) na poszczególnych chromosomach. Dodatkowo, sześć markerów

miało nieznaną lokalizację. Wartościowym wynikiem jest identyfikacja unikatowych alleli dla obydwu linii (niestety, w linii nizinnej był tylko jeden taki allel w porównaniu z 51 dla drugiej linii). Dokonano też analizy struktury genetycznej w obrębie linii nizinno-kaukaskiej z uwzględnieniem miejsca pochodzenia, wykazując duże zróżnicowanie między poszczególnymi lokalizacjami, przy jednoczesnym mniejszym zróżnicowaniu wewnątrz nich.

W drugiej części rozdziału „Wyniki”, przeprowadzono wnioskowanie na podstawie tzw. markerów KASP. Zważywszy na fakt, że jest to podejście nie tylko tańsze, lecz również szybsze, jego zastosowanie wydaje się bardzo uzasadnione w tego typu badaniach. W przypadku obydwu metod otrzymano zbliżony poziom heterozygotyczności obserwowanej i heterozygotyczności oczekiwanej. W zasadzie zbliżone konkluzje nasuwają się też po analizie głównych składowych, potwierdzających większą konsolidację genetyczną linii nizinnej. Nietrudno nie dostrzec jednak, że wyniki te nie są już tak jednoznaczne jak w przypadku pierwszej metody. Takie porównanie (przydatności dwóch typów markerów) mogłoby być bardziej wnikliwie, gdyby była podana informacja o powiązaniach między grupami osobników użytych do obydwu typów analiz.

Generalnie dyskusję wyników oceniam jako wartościową, świadczącą o dobrym poruszaniu się przez Doktorantkę po omawianych zagadnieniach. Umiejętnie konfrontowane są wyniki badań własnych z danymi literaturowymi, ukierunkowane na ich szerszą interpretację i poszukiwanie trafnych analogii, a nie sprowadzone do kontynuacji przeglądu literatury. Dyskusja zawiera też wątki medyczne.

Pracę kończy sześć wniosków zarówno o charakterze poznawczym jak i utylitarnym, korespondujących z uzyskanymi wynikami, a także krótkie syntetyczne podsumowanie. Nie dostrzegam natomiast celowości umieszczenia ostatniego zdania, które nie jest wnioskiem, lecz informacją o prowadzonych badaniach.

Bibliografia obejmuje 66 pozycji, w tym 40 opublikowanych w ostatniej dekadzie. Ostatnią częścią pracy jest załącznik obejmujący charakterystykę zgenotypowanych osobników poddanych analizie bazującej na mikromacierzach. Jest to z pewnością wartościowy materiał źródłowy.

2. Uwagi i komentarze

- Niedosyt pozostawia opis zastosowanych metod statystycznych, w przeciwieństwie do momentami nadmiernie szczegółowej (np. kolejne etapy rutynowej analizy z wykorzystaniem mikromacierzy) prezentacji metod molekularnych. O ile ta część jest doskonałym przewodnikiem po metodach, tak rozdział 5.4. (Metody statystyczne) może być postrzegany jako zbiór słów kluczowych. Jak rozumieć zwrot – „porównanie genotypów badanych osobników”? Zbyt ogólnikowe jest wyjaśnienie parametru PI. Podobną narrację Autorka zastosowała w opisie oceny struktury populacji, odwołując się do pakietu komputerowego STRUCTURE. Program komputerowy nie jest metodą! Nie kwestionuję poprawności zastosowanych metod, zwracam jednak uwagę na ich zbyt skrótowy opis.
- W tekście nie znalazłem informacji dotyczącej lat, z których pochodzą genotypowane osobniki.
- W tabeli 1 brakuje odwołania do literatury.
- W tabeli 4 potrzebne byłoby również odwołanie do literatury, szczególnie w kontekście informacji o powiązaniach z genami (niebędących wynikiem badań).
- Zwroty „przepływ genów” czy „zestaw genów” są skrótami myślowymi.
- Brakuje informacji, czy materiał badawczy użyty w pierwszym i drugim etapie badań jest rozłączny (str. 25-26). Niektóre informacje podane w tabelach są mało przyjazne dla czytelnika. Przykładowo, w tabelach 2-3 ta sama kolejność wymieniania krajów ułatwiałaby lekturę tekstu. Przy okazji, jak traktowane były informacje o pojedynczych osobnikach z niektórych krajów?
- Przy omawianiu wyników struktury genetycznej linii nizinno-kaukaskiej z uwzględnieniem miejsca pochodzenia próby (str. 47-49) brakuje powiązania z liczebnością poszczególnych grup, co nie jest z pewnością bez wpływu na formułowane wnioski.
- Występują uchybienia redakcyjne (np. zamiast Tokarska wraz zespołem (2009) powinno być Tokarska i in. (lub „i wsp.”). Zdarzają się lapsusy językowe, (np. str. 16) zamiast „badania Kamińskiego” powinno być „badania prowadzone przez Kamińskiego”.

- W bibliografii brakuje odwołania do użytych pakietów komputerowych, np. R. Korekty wymagają też nazwy niektórych czasopism.
- Nie ma konieczności wielokrotnego objaśniania anglojęzycznego znaczenia terminów/skrótów (np. PCoA) w tekście, natomiast taka potrzeba zachodzi zawsze w przypadku tabel i wykresów.
- Nie sposób nie dostrzec jednak staranności graficznego i redakcyjnego przygotowania dysertacji.

3. Najważniejsze wyniki

Przeprowadzone badania dostarczyły wielu wartościowych wyników tak o charakterze poznawczym jak i aplikacyjnym. Do najważniejszych wyników uzyskanych przez mgr Marlenę Wojciechowską zaliczam oszacowanie parametrów zmienności (na poziomie molekularnym) w obydwu liniach genetycznych żubrów. Parametry te zostały zweryfikowane dwoma metodami. Generalnie, świadczą one o efektywnie prowadzonej pracy hodowlanej w badanych populacjach na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci. Wynikiem o wydźwięku aplikacyjnym jest pomyślnie użycie mikromacierzy zaprojektowanej dla bydła do identyfikacji markerów w populacji żubra. Wartościowym rezultatem jest wyznaczenie panelu markerów SNP do identyfikacji linii genetycznych, a także kontroli pochodzenia osobników. Doktorantka wskazała metodę KASP jako alternatywę do bardziej kosztochłonnych i czasochłonnych procedur opartych o komercyjne mikromacierze.

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595, ze zmianami Dz. U. z 2005 roku nr 164, poz. 1385 oraz Dz.U. z 2011 roku nr 84, poz. 455, Dz. U. z 2014 roku poz., 1852, z 2015 roku poz. 249, 1767). Mając powyższe na uwadze, z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marleny Wojciechowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Recenzowana rozprawa doktorska ma cenne walory poznawcze i użyteczne. Autorka podjęła się ambitnych zadań, z których znakomicie wywiązała się. Opanowała warsztat badawczy zarówno z zakresu technik molekularnych jak i metod statystycznych. Nade wszystko jednak przeprowadzone badania dobrze wpisują się aktualne trendy w nauce światowej z zakresu genomiki. Przedkładam więc wniosek o wyróżnienie tej dysertacji doktorskiej.

Tomasz Lisowski