



UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU

Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738-8383, -8414, -8416 • e-mail: biologia.dziekanat@uwb.edu.pl



Białystok, 2022-12-02

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kozyry-Zyskowskiej
w przewodzie prowadzonym przed Radą Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Wrocławskiego
Promotor: dr hab. Heliodor Wierzbicki, prof.UP
Promotor pomocniczy: dr Magdalena Moska

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kozyry-Zyskowskiej „Historyczno-geograficzne przyczyny zmienności genetycznej myszy polnej *Apodemus agrarius* (Pallas 1771)” została przygotowana w Katedrze Genetyki Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Tematem przeprowadzonych badań była ocena struktury genetycznej myszy polnej na podstawie DNA mitochondrialnego i mikrosatelitarnego przeprowadzona w całym zasięgu gatunku. Analiza ta pozwoliła następnie na ocenę historycznych i aktualnie działających czynników, które warunkują procesy specjacji w obrębie rodzaju *Apodemus*, rozmieszczenie linii filogenetycznych myszy polnej i lokalizację refugium glacialnych. Realizację celów pracy przeprowadzono przy pomocy jednej sekwencji mitochondrialnego DNA i 13 loci mikrosatelit jądrowych.

Podjęty temat badawczy jest bardzo ciekawy, a także imponujący ze względu na rozległość podjętych celów. Praca łączy tematykę z zakresu filogenezy, filogeografii i genetyki populacyjnej co sprawia, że jest wyjątkowo ciekawa do czytania jako całościowe i kompletne opracowanie historii i struktury genetycznej gatunku. Poziom komplikacji tak szeroko zakrojonej pracy jest również godny podkreślenia.

Część wynikową rozprawy poprzedza kompetentnie napisany wstęp literaturowy, w którym doktorantka przedstawiła stan wiedzy dotyczący rodzaju *Apodemus* i konkretnie gatunku *Apodemus agrarius*. Omówiła stanowisko systematyczne i dotychczas przeprowadzone badania genetyczne w zakresie



cytogenetyki, filogenezy i filogeografii. Należy podkreślić, że wstęp zawiera zasób informacji całkowicie wystarczający do dalszego śledzenia wyników pracy, ich interpretacji i wyciągania wniosków. Warto również zwrócić uwagę, że literatura wykorzystana w pracy, nie tylko do stworzenia wstępu ale też przedyskutowania własnych wyników, jest wyjątkowo rozległa. Doktorantka swobodnie posługuje się ogromną i bardzo nowoczesną wiedzą w nietrywialnych dziedzinach filogenetyki i genetyki populacji.

Lektura części metodycznej pracy pokazuje, że wykonano rzetelny zakres badań na podstawie dobrze opanowanych technik molekularnych. Lista opisanych technik, które były stosowane w tej pracy obejmuje izolację DNA z prób muzealnych i włosów, elektroforetyczną ocenę jego jakości, technikę PCR multiplex z analizą loci mikrosatelitarnych i sekwencjonowanie DNA. Nie mam wątpliwości, że doktorantka opanowała metodykę nowoczesnego laboratorium genetyki molekularnej. Należy również zwrócić uwagę, że analiza markerów molekularnych wymaga zapoznania się z wieloma metodami bioinformatycznymi, do przeprowadzenia których służą liczne programy komputerowe o różnym stopniu trudności w obsłudze. Tu doktorantka przedstawiła kompetentny i imponujący zakres nowoczesnych metod analizy zarówno loci mikrosatelitarnych jak i sekwencji mtDNA. Rozległość i biegłość w posługiwaniu się takim spectrum technik bioinformatycznych budzi pełne uznanie dla doktorantki.

Recenzent jednak z założenia powinien tropić niedociągnięcia, błędy etc. dlatego przedstawię tu problem genotypowania loci mikrosatelitarnych, który doktorantka właściwie pominęła w tekście. Mam nadzieję, że problemy genotypowania mikrosatelit zostały w rzeczywistości uwzględnione, a jedynie nie opisane w rozprawie. Odczytanie genotypów mikrosatelit, szczególnie z DNA zdegradowanego jakim jest DNA z prób muzealnych i nieinwazyjnych, nie jest łatwą sprawą. Z tego względu zaleca się trzykrotne genotypowanie zakodowanych prób, żeby nie sugerować się wcześniejszymi odczytami i dopiero po tym ustalanie ostatecznego genotypu osobnika. Po odczytaniu genotypów absolutnie konieczna jest analiza tak zwanych alleli zerowych (*null allele*). Allele zerowe pojawiają się w przypadku mutacji w miejscu wiązania primera. Jeśli mutacje są w miejscu wiązania obydwu primerów to produkt PCR może się wcale nie pojawiać i locus w części zasięgu geograficznego po prostu wypada z analizy. Gorzej gdy



mutacja występuje w miejscu wiązania jednego primera i w efekcie osobniki heterozygotyczne mogą być fałszywie odczytywane jako homozygoty. Nie odczytujemy więc prawidłowo wszystkich alleli i genotypów, trudno więc wnioskować o strukturze populacji. Ocena obecności alleli zerowych powinna być traktowana jako wyjściowa w analizie mikrosatelit i loci z wysoką frekwencją nulli powinny zostać odrzucone z dalszych analiz. Można też wykorzystywać programy bioinformatyczne, jak na przykład Cervus, do przeliczania frekwencji alleli z uwzględnieniem obecności alleli zerowych, jednak w mojej ocenie nie jest to do końca właściwe. Generalnie polecam wykorzystanie programu MicroChecker, który w algorytmie działania rozróżnia allele zerowe i inne przyczyny braku równowagi genetycznej, a dodatkowo pozwala na ocenę precyzji czytania alleli dzięki analizie tak zwanych pików powtórzonych (*stutter peaks*) i gubienia dużych alleli (*large allele drop out*). Jeśli ten program wskaże loci z wysoką frekwencją alleli zerowych, to należy je bezwzględnie odrzucić przed analizą struktury populacji. Jeszcze jedna uwaga metodyczna dotyczy analizy nierównowagi gametycznej czy inaczej sprzężeń. Większość programów bioinformatycznych do analizy struktury genetycznej populacji zakłada analizę loci niesprzężonych. W przypadku analizy kilkunastu loci mikrosatelitarnych zawsze więc należy sprawdzić czy nasze loci spełniają ten warunek, i znowu w przypadku sprzężenia, jedno locus należy odrzucić z analizy. Warto więc zwrócić uwagę, że prawidłowo wykonany wstęp do analizy mikrosatelit może zmniejszyć liczbę loci możliwych do wykorzystania, ale też zapewni, że nie będziemy opisywać rzeczywistości wirtualnej.

Niezależnie od metodycznych niedociągnięć opis wyników analizy mikrosatelit i sekwencji został przedstawiony rzeczowo i kompetentnie. Materiał ilustracyjny i tabele właściwie podpierają warstwę słowną. Doktorantka uzyskała istotne wyniki, które odpowiadają postawionym celom. Po pierwsze przy pomocy analizy *cytb* mtDNA ustaliła obecność kilku linii filogenetycznych w obrębie gatunku myszy polnej. Doktorantka nie pozostała na tej stosunkowo prostej analizie, jak niestety często się dzieje w dużej części prac filogeograficznych, ale przy użyciu rozległych technik bioinformatycznych przeprowadziła rekonstrukcję plejstocenijskiej ekspansji myszy polnej i jej bliźniaczego gatunku myszy chińskiej, a także analizę przyczyn dywergencji linii filogenetycznych w obrębie gatunku. W analizie zostały wzięte pod uwagę różnorodne czynniki



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738-8383, -8414, -8416 • e-mail: biologia.dziekanat@uwb.edu.pl



geograficzne, klimatyczne i wydarzenia ewolucyjne z historii gatunku. Ponadto zróżnicowanie linii filogenetycznych zostało odniesione do tradycyjnej systematyki czyli obecności podgatunków. Generalnie tę część pracy czytałam z ogromnym zainteresowaniem, gdyż nieczęsto się zdarza tak całościowe i kompletne opracowanie historii gatunku i zróżnicowania wewnątrzgatunkowego przedstawionego wraz z możliwymi scenariuszami dywergencji. Mam nadzieję, że doktorantka pozostanie w pracy naukowej i w dalszej swojej działalności będzie mogła uzupełnić te analizy także o sekwencje jądrowe. Przy całej wygodzie pracy z sekwencjami mitochondrialnego DNA, zawsze jednak należy pamiętać, że opisują one historię samic, ponadto pojedyncza sekwencja może też opisywać swoją historię a nie historię gatunku. Uwagi te nie umniejszają znaczenia pracy i wniosków w niej wyciągniętych. Wymogi pracy naukowej sprawiają, że musimy zatrzymywać się na jakimś etapie badań żeby opisać fragment rzeczywistości, a zawsze też pamiętamy, że możemy dalej rozwijać swoje badania. Kolejnym istotnym wynikiem uzyskanym przez doktorantkę jest ocena struktury genetycznej populacji myszy polnej w jej euroazjatyckim zasięgu wraz z opracowaniem historii demograficznej populacji. Doktorantka wskazała obecność klastrow genetycznych i przedstawiła ich relację do linii filogenetycznych. Ustaliła wyraźne rozdzielenie populacji europejskiej i azjatyckiej i bardziej subtelną strukturę w obrębie populacji europejskiej. Rekonstrukcja postglacjalnej demografii gatunku pozwoliła wykryć znaczący *bottleneck* po ustąpieniu ostatniego zlodowacenia i odbudowę gatunku, która trwa do dziś.

Generalnie cała rozprawa napisana jest bardzo jasno i klarownie. Ryciny i podpisy są tak sporządzone, że ich interpretacja jest łatwa i w pełni jednoznaczna. Uważam że cała rozprawa jest bardzo elegancko skomponowana i czytałam ją z wyraźną przyjemnością. Kilka zarzutów, które postawiłam rozprawie nie jest w stanie zmienić obrazu całości, którym jest dojrzała i wartościowa analiza interesującego problemu badawczego.



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738-8383, -8414, -8416 • e-mail: biologia.dziekanat@uwb.edu.pl



Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa to praca świadcząca o nabyciu przez doktorantkę przygotowania warsztatowego w trudnej dziedzinie, której się poświęciła, spełniająca ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym **stawiam wniosek, do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Kozyry-Zyskowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Dr hab. Agata Banaszek