

**Ocena pracy doktorskiej p. mgr. Magdaleny Świsłockiej  
pt. „Struktura genetyczna populacji łośia (*Alces alces*) w dolinie Biebrzy”**

Jeśli zróżnicowanie między udomowionymi rasami i odmianami roślin i zwierząt przewyższa obserwowane w naturze, a powstało przez wybiórcze kojarzenia (selekcję) dokonywane przez hodowców, dlaczego podobny proces nie mógłby przebieg w naturze? Odkryty przez K. Darwina proces selekcji naturalnej zakładał istnienie dziedzicznej zmienności w populacjach leżącej u podłoża adaptacji, i dodalibyśmy dziś, potencjału ewolucyjnego. Jednak przez całe stulecie, jedynym argumentem za słusnością wniosku o genetycznym podglebiu, była możliwość zmiany dowolnych cech organizmów przez selekcję sztuczną. Długi spór o strukturę genetyczną populacji naturalnych, Muller *contra* Dobzhansky, czyli jednolitość *versus* różnorodność genowa rozwiązały nowe techniki badawcze: elektroforeza białek (allozymów, 1966) sekwencjonowanie DNA (1983), i dzisiejsze badania genomowe, wskazując, że normą biologiczną jest zmienność. Funkcjonalne (adaptacyjne) znaczenie wykrytej zmienności sekwencji DNA pozostało enigmatyczne, 'the jury is still out'. Muchy, we wspomnianym sporze odegrały bezprecedensową rolę, wartą wspomnienia z uwagi na sąsiedztwo Litwy, gdzie 'much dostatek' (Mickiewicz 1834). Jeśli muchy są organizmami modelowymi, czy w takim przypadku, łośiem (łośiami) w ogóle warto się zajmować?

„Niech z bólu ryczy ranny łoś...” jest raczej luźną parafrazą z Hamleta. Inni 'deer' tłumaczą jako jeleni (Barańczak) lub rogacz (Słomczyński). Konfuzja lingwistyczno-taksonomiczna, przywodzi na myśl pytanie naturalisty Gilberta White'a, 18. wiecznego anglikańskiego duchownego, który po zbadaniu padłej w niewoli samicy łośia, w liście do Thomasa Pennanta pyta: „whether you think still that the American moose and European elk are the same creature”. G. White, przewyciężając fetor padłej klempy dokonuje oględzin i pomiarów dziwnego stworzenia, zdaje raport adresatowi, wyznając iż „the putrefaction precluded all further curiosity”. Dowiadujemy się także, że właściciel miał nadzieję uzyskać potomstwo krzyżówki jelenia (red deer) i łośia (elk), w co White wątpił - „their inequality of height must have always been a bar to any commerce of the amorous kind”.

Doktorantka, wyposażona we współczesne teorie, techniki badawcze i narzędzia analityczne stawia zasadniczo to samo co White pytanie: czy łośie biebrzańskie są tymi samymi co gdzie indziej stworzeniami (ewoluononami)? Bada i analizuje strukturę genetyczną populacji łośia w dolinie Biebrzy na tle populacji sąsiednich.

Praca doktorska p. mgr Magdaleny Świsłockiej liczy 210 stron o układzie standardowym: Wstęp, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja zakończona Podsumowaniem, Literatura (345 pozycji), Tabele (30) i Ryciny (17). Pracę poprzedzają: Podziękowania, Uwagi wstępne, z których dowiadujemy się, że wybrane elementy pracy zostały wcześniej opublikowane w czterech pracach (nazwisko doktorantki występuje na pierwszym miejscu) oraz Streszczenie (2.5 strony).

Praca ma wyraźny, bardzo dobrze przemyślany układ. I tak, ponieważ obecny zasób zmienności kształtowały rozmaite procesy genetyczne i demograficzne (ewolucyjne), przebiegające w różnej skali czasowej, doktorantka przedstawia we wstępie historię zmian zasięgów gatunków wywołanych plejstocęńskimi oscylacjami klimatycznymi. Okresowe kurczenie się i rozszerzanie zasięgów zostawiło wyraźne ślady we wzorach zmienności, umożliwiając m.in. odtworzenie pochodzenia populacji Europy środkowej i północnej oraz dróg rekolonizacji z refugium glacialnych położonych bardziej na południu. Genetyczne skutki zmian zasięgów dobrze opisują rozmaite modele populacyjno genetyczne; izolacja



populacji w refugiach prowadzi do zróżnicowania pod wpływem dryfu i doboru, a ponowne zetknięcie się genetycznie odmiennych populacji tworzy wtórne strefy mieszańcowe, mogące ograniczać przepływ genów. Interesującym procesem jest także surfing genetyczny, może szybko zwiększyć częstość wariantów w procesie ekspansji przestrzennej.

Ważnym składnikiem różnorodności wewnątrzgatunkowej i wyznacznikiem potencjału ewolucyjnego, jak podkreśla doktorantka, są populacje reliktoowe. Cechuje je m.in. mała liczebność, zmienność i izolacja przestrzenna czy odrębność genetyczna. Choć są one szczególnie zagrożone, nieuchronność ich wyginięcia, jest wątpliwa; ochrona identyfikowanych populacji winna być priorytetowa.

Populacje odseparowane w dłuższej skali czasowej przekształcają się w tzw. ESU, jednostki ważne ewolucyjnie, posiadają zazwyczaj własne lokalne adaptacje, chronione ograniczonym przepływem genów wskutek izolacji. Są to także, z praktycznego punktu widzenia, tzw. MU, jednostki zarządzania, a cechuje je autonomia demograficzna. Zdaniem doktorantki, odkrycie złożonej struktury przestrzennej populacji naturalnych, czego konsekwencją jest stworzenie takich pojęć jak ESU czy MU, jest ogromnym osiągnięciem filogeografii; pojęcia te mają bezpośrednie przełożenie na działania Międzynarodowej Unii Ochrony Przyrody i Jej Zasobów, opracowanie tzw. Czerwonej Księgi gatunków, a także postulaty, ratyfikowanej przez Polskę, Konwencji Berneńskiej.

Omówienie rozmaitych klas markerów molekularnych i ich zastosowania w badaniach populacyjnych, przygotowuje tło i uzasadnienie przyszłych badań. Ponieważ rozmaite segmenty genomu dają odmienny wgląd w strukturę genetyczną, i podlegają innym procesom ewolucyjnym, w zależności od  $N_e$ , sposobu dziedziczenia, tempa mutacji, dryfu i doboru, najlepiej badać równocześnie rozmaite klasy markerów.

Dwudziestopięciostronicowy Wstęp kończy opis historii populacji łośia na świecie i w Polsce, oraz sformułowanie trzech celów pracy:

1. Określenie struktury genetycznej unikalnej (unikatowej) populacji biebrzańskiej za pomocą rozmaitych markerów molekularnych
2. Wyznaczenie czynników wpływających na obecne zróżnicowanie międzypopulacyjne w Polsce.
3. Określenie źródeł i kierunków powojennej ekspansji łośia w Polsce za pomocą różnych klas markerów i o różnym sposobie dziedziczenia.

W Materiałach i metodach (37 stron) przedstawia autorka najpierw obiekt badań: taksonomię gatunku *Alces*, z dwoma opisanymi gatunkami *A. alces* i *A. americana*, geograficznym zróżnicowaniem chromosomowym ( $2N=68$  lub  $70$ ), indelem segmentu CR w mtDNA, jak i rozmaite opinie badaczy nt. rzeczywistej liczby gatunków (1-3). Następnie opisuje biologię łośia, sezonowe i długodystansowe migracje osobników, oraz teren badań tj. obszar poboru prób, których położenie i wielkość dobrze reprezentują zasięg i lokalną liczebność łośi w kraju, (27 miejsc), dodatkowe dwie pochodzą z Litwy i Niemiec. Próby z optymalnego dla łośia środowiska dol. Biebrzy, zasiedlanej przez unikatową linię ewolucyjną stanowiły ok. 1/4 wszystkich prób. Łącznie, próby współczesne (odchody, tkanki lub pozostałości tkanek) oraz muzealne liczyły kilkaset sztuk.

Opis analiz genetycznych zawiera procedury izolacji DNA genomowego, dostosowane do rodzaju pobranego materiału. Nieinwazyjna metoda, izolacji DNA z odchodów łośi opisana jest odrębnie. Dodajmy, że od jakości uzyskanego DNA zależy sukces dalszych analiz.



Doktorantka zastosowała 3 kategorie markerów DNA: mtDNA, markery chromosomów płci (X, Y), oraz chromosomów autosomalnych (mikrosatelity, oraz *MHC II DRB*). Kolejno przedstawia je i charakteryzuje. W obrębie mtDNA amplifikowała metodą PCR fragment szybko ewoluujący segment CR, różnej długości, 607, 351, lub 237 bp, w zależności od jakości DNA, a dla reprezentatywnych haplotypów także *cyt b* 1140 bp.

Markery chromosomów płci, umożliwiające śledzenie udziału samców w populacjach, czy płciowo-zależnej dyspersji, obejmowały sekwencje YCATS (zlokalizowane w chromosomie Y). Z 8 wybranych segmentów, 6 dało produkty i czytelne sekwencje. Autorka przeprojektowała startery i przeprowadziła szczegółowe analizy dla polimorficznego *DBY14* (154 bp). Ponadto badała fragment genu *SRY* (472 bp), projektując nowe startery w oparciu o sekwencje z GenBanku. Dla chromosomu X wybrała segment *Zfx* (523 bp); opracowała także sposób uzyskania amplikonu tego fragmentu u samców.

Celem identyfikacji alleli wysoce polimorficznych mikrosatelitów, sprawdziła najpierw 38 par starterów. Tylko 11 loci dało czytelne i powtarzalne odczyty. Loci te amplifikowała w dwu multiplexach, w jeden wkomponowała odcinek genu *SRY*, co umożliwiło identyfikację płci w próbach biologicznych. Dla *MHC II DRB* badała polimorficzny segment 226 bp. Sposoby amplifikacji, oczyszczania amplikonów, reakcji sekwencjonowania, dokonywania odczytów opisane są w kolejnych akapitach.

Druga część Materiałów i metod zawiera przegląd analiz statystycznych stosowanych w pracy. Rozpatruje najpierw sposób pobierania prób mogący prowadzić do zaniżenia częstości heterozygot (tzw. efekt Wahlunda), po czym przedstawia sposoby uniknięcia błędów genotypowania czy sekwencjonowania. Fragment ten jest opisany bardzo dobrze. Dalej podaje miary zmienności wykorzystujące sekwencje nukleotydów dla oszacowania stopnia zróżnicowania wewnątrz i między populacyjnego, następnie odpowiednie statystyki dla loci mikrosatelitów, i programy wykorzystane do obliczeń. Statystyki *F* czy *R* mierzą m.in. zróżnicowanie i odstępstwa od kojarzeń losowych. Wykorzystała także macierze dystansów genetycznych, i fizycznych między populacjami do testowania prostego modelu izolacji przez odległość (IBD). W graficzne przedstawienie zróżnicowania między populacjami zaprzęła analizę składowych głównych, wariancji molekularnej (AMOVA) i program STRUCTURE. Pozwalają one na badanie wzorów geograficznych i ocenę składowych elementów wariancji genetycznej.

Kolejnym elementem analiz jest ocena pokrewieństwa genetycznego, współczynnika *r*, co umożliwiają programy Kinship, korzystające z wielogenowych genotypów. Stopień wymiany genów wraz z identyfikacją migrantów, tj., genotypów niepasujących do lokalnej struktury, genetycznej jest logicznym następstwem analiz. Część segmentów genomu może podlegać nie tyle zmianom losowym, wynikającym ze zmian demograficznych, *N<sub>e</sub>*, lecz podlegać selekcji. Poszukiwanie odstępców (outliers), loci, których zróżnicowanie przewyższa neutralne tło umożliwił autorce program LOSITAN; oczywistym kandydatem był locus *MHC II DRB*, tłem 11 loci mikrosatelitów.

Do analiz filogenetycznych sekwencji mtDNA i konstrukcji dendrogramów stosowała doktorantka 3 podstawowe metody NJ, ML, BI. Wykorzystują one albo dystanse genetyczne, albo modele ewolucji sekwencji. Metody wielokrotnego próbkowania pozwalają także na szacowanie poparcia dla określonych gałęzi, a bardziej zaawansowane algorytmy na datowanie dywergencji grup. (Niniejsza praca stosuje znacznie prostsze datowanie porównawcze). Alternatywną metodą ujmowania podobieństw są sieci haplotypów metodą MS minimalizującej liczbę różnic. Ograniczeniem metody MS jest rekombinacja, stąd



autorska sieci skonstruowała dla tylko dla segmentów mtDNA oraz *DBY14* (nierekombinujący segment Y).

Sekwencje nukleotydowych niosą także informacje historyczne o zmianach demograficznych populacji. Opisuje je kilka statystyk, a także rozkład liczby różnic nukleotydów między sekwencjami (mismatch distribution), która doktorantka wykorzystała do w pracy (programy Arlequin i DnaSP w wersji uwspółcześnionej).

Do projektowania starterów, czy w rozmaitych analizach, gdzie jest to wskazane, posiłkuje się autorka sekwencjami zdeponowanymi w GenBank-u, są to albo dodatkowe sekwencje łośi z innych regionów, albo homologi najbliższych krewniaków łośia (sarny, jeleni, bydła).

Prezentację Wyników otwiera perspektywa mtDNA, jego zmienność, dywergencja haplotypów i struktura. Dla współczesnych łośi uzyskała autorka 612 sekwencji CR i przylegającego tRNA uzyskała autorka dla 588 prób (osobników) z Polski, 15 z Litwy i 9 z Niemiec, (razem 612) znajdując 12 haplotypów; wśród nich najczęstszym był opisany przez nią haplotyp H1 'biebrzański'; wykryła także 4 haplotypy 'skandynawskie'. Najczęstszymi były H1 (0.36) oraz H2 ('fiński'). Korygując nadreprezentację populacji biebrzańskich, wybrała 433 osobników z 12 populacji; w nich dominował haplotyp H2 fiński, drugim był biebrzański H1; łącznie trzy haplotypy fińskie znaleziono u 50% osobników. Zaskakuje, że wywodzący się od najwyżej 3 introdukowanych z Białorusi kłemp haplotyp kampinoski odkryto aż u 20% łośi. W badanym segmencie 27 pozycji było polimorficznych, dając  $h=0.758$ ,  $\pi=1.3$ ; haplotypy różniły się średnio 7.3 tranzycjami. Szczegółowe analizy zmienności przeprowadziła doktorantka dla 13 populacji ze zwartego zasięgu łośia. Skład haplotypowy (od 2-6), ich częstość i odrębność wykazały spore zróżnicowanie, stąd jego miary,  $\Phi_{ST}$  i  $F_{ST}$ , dla ok. 50 % porównywanych par, były wysokie, sugerując ograniczenie przepływu genów w linii żeńskiej.

W próbach muzealnych pochodzących od 92 łośi, sekwencje 351 bp fragmentu doktorantka zidentyfikowała aż 10 haplotypów, z 22 miejscami polimorficznymi,  $h=0.702$ ,  $\pi=1.6$ , które różniły się średnio 5.7 tranzycjami. Jednego z haplotypów muzealnych H18, nie odszukano w populacji współczesnej, a 3 we współczesnych w próbach muzealnych. Jednak i w 5-cio krotnie mniejszej próbie zróżnicowanie jest wysokie.

Sekwencje *cytb* uzyskała autorka dla 20 łośi, po 1-3 dla zidentyfikowanych haplotypów CR, wykrywając 4 warianty, wszystkie 5 substytucji stanowiły tranzycje.

Po określeniu najlepszego modelu ewolucji dla CR, *cytb* oraz sekwencji połączonych, skonstruowała drzewa NJ, ML i BI. Drzewa dla CR jednoznacznie umieszczają 12 zidentyfikowanych haplotypów w obrębie haplogrupy europejskiej Hundertmarka et al. (2002). Haplotypy opisane w niniejszej pracy tworzą 2 gałęzie: nazwane Centralna Europa (CE) i Ural. Kład CE obejmuje 3 gałęzie: Biebrza, Polesie i Fennoscandia (tu przynależy kampinowski haplotyp H11). Topologię drzewa BI różni jedynie odmienny układ haplotypów kładu CE. Krótszy odcinek CR (351 bp), mimo znacznej utraty informacji, uzyskany dla okazów muzealnych dał taki sam obraz stosunków haplotypów w drzewach NJ i ML. Dychotomię haplogrupy europejskiej i trichotomię kładu CE, obejmującej gałęzie Biebrza, Polesie i Fennoscandia potwierdziły również drzewa NJ, ML i BI, skonstruowane dla *cytb*+CR (łącznie 1747 bp). Podobne rezultaty uzyskała doktorantka konstruując sieć haplotypów. Sieci te lepiej od ukorzenionych drzew obrazują stopień dywergencji haplotypów; np. biebrzański H1 różni 11 substytucji od najbliższego H11 z gałęzi Fennoscandia, a te od uralaskich oddziela 10 substytucji. Odrębność haplotypów grupy azjatyckiej od europejskiej uwypukla co najmniej 30 substytucji.



Datowanie czasu dywergencji kładów mtDNA oparła autorska na wartościach  $D_a$ , przyjmując literaturowe szacunki tempa ewolucji dla *CR* i *cytb* u Cervidae i była domowego. W takim ujęciu dywergencja kładów Centralna Europa i Ural nastąpiła przed ok. 138 000 laty, a zróżnicowanie trzech gałęzi CE nieco później, ok. 130 000 l.t. Tempo bydlęce daje odpowiednio 47 570 i 46 780 lat. Wszystkie wartości mają szerokie przedziały ufności.

Rozkłady liczby różnic (MD) dla różnych grup haplotypów (Polska, kład CE, gałęzi Fennoscandia oraz Biebrza) są wielo-, dwu- lub jednomodalne. L-kształtny rozkład gałęzi Biebrza wskazuje na ekspansję demograficzną i przestrzenną, co potwierdzają odpowiednie parametry Tau, Theta0 i Theta1 oraz testy. Dwa tempa substytucji 4 lub 8 %/1 mln lat datują biebrzański wzrost demograficzny na 8 826 lub 4 413 l.t., a ekspansję przestrzenną na 320 lub 160 l.t. Analizy krótszego odcinka CR mtDNA, 351 bp, przesuwają daty dwu zjawisk bardziej wstecz na 15 262 lub 7 631 l.t. oraz 463 lub 232 l.t.

11 loci mikrosatelitów dało niską frekwencję alleli zerowych, stąd dalsze analizy oparła doktorantka na tej grupie loci. Niekompletne dane dla locus obejmowały maksymalnie 16.8% wszystkich osobników tj. 386 reprezentujących 14 populacji. Zmienność mikrosatelitów okazała się względnie wysoka, od 7-15 alleli na locus, łącznie 119, połowa z nich miała niskie częstości. Wartości  $H_o$  i  $H_e$  były wysokie i zbliżone, choć w 10 populacjach istotnie różne. Zróżnicowanie międzypopulacyjne było małe  $F_{ST}=0.03$ , lecz istotnie różne od zera, wskazując na nieznaczne ograniczenie przepływu genów. Na tle porównań między parami populacyjnymi wyróżnia się populacja PKN. Zróżnicowania międzypopulacyjnego nie wyjaśnia izolacja przez dystans.

Analizy pokrewieństw wykazała niskie współczynniki  $r$ , tj. niespokrewnienie osobników w populacjach, wewnątrzpopulacyjne porównania w parach ujawniły niski udział krewnych (5-22%), układy rodzic – potomek są rzadkie (zaledwie 0.23% par), najczęściej krewni to kuzyni (4.95 % par).

Analiza składowych głównych zastosowana do zróżnicowania  $\Phi_{ST}$  mikrosatelitów i CR, pokazała 4 grupy populacji: 1. związana jest z biebrzańskim haplotypem H1, 2. łączy populacje wzdłuż wschodniej granicy kraju i z Litwy, 3. łączy 4 inne populacje, 4. KPN pochodząca z introdukowanych łosi białoruskich. Podobne analizy przeprowadzono dla  $F_{ST}$  CR, oraz  $R_{ST}$  mikrosatelitów, który ukazały zasadniczo zbieżne grupy populacji, podkreślając odrębność niektórych

ANOVA zmienności sekwencji CR zakładająca 1 populację największe źródło zmienności przypisuje zmienności wewnątrzpopulacyjnej, potem międzypopulacyjnej, a w przypadku mikrosatelitów prawie cała zmienność koncentruje się wewnątrz populacji.

SAMOVA dla sekwencji CR i mikrosatelitów wskazała na 7 grup, maksymalizując zróżnicowanie międzypopulacyjne i minimalizując wewnątrzpopulacyjne.

Z kolei program Structure wskazał na dwie genetycznie odmienne grupy, pierwsza ma rodowód wschodni, druga biebrzański.

W wybranych 11 parach sąsiednich populacji dla CR średnia  $Nm=1.83$  odpowiada 3-4 migrantom na generację; dla mikrosatelitów  $Nm=8.1$ , wartość wskazująca na swobodny przepływ genów. Jednak porównania dwu klas markerów, dla 4 par populacji sugerują większą efektywną dyspersję samców.

GenClass2 sklasyfikował 16 łosi jako prawdopodobnych migrantów, dominującą tendencją jest dyspersja ze wschodu na zachód.



Z 7. genów zlokalizowanych w chromosomie Y, tylko jeden *DBY14* był polimorficzny, z 4. haplotypami wykrytymi dla 231 samców z Polski i 13 spoza niej, w tym z Syberii. Wariant H1 był najczęstszy, niestety populacje nie wykazały zróżnicowania międzypopulacyjnego. Doktorantka skonstruowała sieć filogenetyczną dla *DBY14*, wykorzystując własne sekwencje homologu sarny europejskiej i syberyjskiej, oraz 4 gatunków Bovidae. Jak można było oczekiwać z taksonomii, łosie grupują się z sarnami, bowidy są oddzielone.

Sekwencja intronu *Zfx* specyficzna dla chromosomu X, nie dała polimorfizmów ani u 11 samic ani 13 samców z różnych populacji, stąd nie prowadzono dalszych badań.

Segment *MHC II DRB* dał 9 alleli dla 196 łosi z Polski i 16 z Litwy. Dwa allele *DRB1\*11* i *DRB1\*1* są nowe dla łosia. W populacjach występuje od 5-8 alleli, trzy najczęstsze warianty są najczęstsze i spotkane we wszystkich populacjach, heterozygoty dominują, stąd wysoka wartość  $h=0.7-0.8$ , znaczna  $\pi=1.4-1.6\%$ . Różnic międzypopulacyjnych nie można wytłumaczyć doбором pozytywnym (program LOSITAN), jednak locus ten może podlegać doborowi równoważącemu, faworyzującemu heterozygoty. Populacja biebrzańska (BIE) odbiega od pozostałych, na co wskazuje wartość  $F_{ST}$  w porównaniach par populacji, czy skrajna pozycja BIE względem osi głównych.

Końcowe dwa podrozdziały Wyników zawierają: zestawienie charakterystyki reliktywnej populacji łosi w dol. Biebrzy oraz opis subpopulacji w trzech jej basenach, górnym, środkowym i dolnym. Próba biebrzańska ( $N=155$ ), z 4 haplotypami CR (lokalnym H1 i 3 fińskimi H2, H3, H4) jest mało zmienna ( $h=0.33$ ,  $\pi=0.564\%$ ), dominuje haplotyp H1 (0.81), odmienny (9-13 różnic) od bliższych sobie fińskich (4-6 różnic); muzealne próby sprzed 12 lat nie zawierają H3 i H4, sugerujące ich niedawne przywędrowanie w czasie *memorandum* ochronnego. Biebrzański haplotyp jawie się jako wyjątkowy odszczepieniec w centralnej Europie, śladem reliktywnych autochtonów i długotrwałej ich izolacji. Taką interpretację popierają: wariant H2-*DBY14*, nie występujący poza Biebrzą i KPN, ani Polską, dwa lokalne warianty *MHC II DRB*, mikrosatelity o największej średniej liczbie alleli, oraz wysokie miary  $\Phi_{ST}$  i  $F_{ST}$  dla CR w stosunku do najbliższych, jak i dalszych populacji. Ograniczenia przepływu linii matriarchalnej nie wykazują markery biparentalne. W basenach biebrzańskich, częstość haplotypu H1 rośnie z N na S, spada więc różnorodność  $h$  i  $\pi$  dla CR. Mikrosatelity dają obraz odwrotny; w basenie górnym zidentyfikowała doktorantka najwyższy odsetek krewnych. Wyraźne zróżnicowanie  $\Phi_{ST}$  między basenami dla CR wskazuje ograniczony przepływ haplotypów mtDNA.

Dyskusję rozpoczyna przywołanie zasady zgodności genealogicznej i jej czterech aspektów przemawiających za istnieniem głębokiej, nie płytkiej, struktury filogeograficznej populacji. Analiza dywergencji mtDNA wysuwa się na pierwszy plan, ponieważ nie podlega on rekombinacji i szybko gromadzi mutacje. Wszystkie wykryte warianty 601 bp CR mtDNA (12) lokują się w grupie Europejskiej Hundertmarka et al (2002), odmiennej od Azjatyckiej, co wskazuje na ich niezależną historię ewolucyjną, a w jej obrębie dwa klady, z domniemanymi refugiami LGM w Europie i wschodniej części zasięgu. Można je uznać za odrębne ESU. Kolejno omawia autorka czasowy aspekt dywergencji na tle zmian klimatycznych, oraz porównań z innymi gatunkami (pokrewna sarna), poszukując zgodności filogeograficznej (aspekt III wymienionej zasady). Klad CE z trzema gałęziami cechuje duża różnorodność, zachowana zapewne w odrębnych refugiach, na co wskazuje bimodalny rozkład różnic (niedopasowań) nukleotydowych, i dane paleontologiczne z klasycznych refugiów. Z bałkańskich i karpaccich ostoi zapewne pochodzą łosie Europy centralnej i północnej, te z ostoi apenińskiej wyginęły. Polskę zasiedliły także łosie szeroko



rozprzestrzenionego kładu Ural (z refugium na południu od Uralu), który jak i inne gatunki ssaków wykazał gwałtowną postglacjalną ekspansję demograficzną i przestrzenną linii maczynych. Wkład karpackich ostoi w kształtowanie składy jest zdaniem autorki niedoceniany; w ostoi tej niewątpliwie przetrwały liczne populacje/gatunki o własnych adaptacjach. Szczątki kopalne z Karpat i Bałkanów dobitnie świadczą o przesunięciach zasięgu w następstwie zmian środowiskowych, przekształceń krajobrazu i roślinności w obniżeniach terenów powstających dolinach rzecznych. Czas ekspansji demograficznej przypadał na okres borealny holocenu, której ślady w grupie Biebrza pokazują parametr Tau i ujemna wartość testu D Tajimy. Ekspansja przestrzenna tej grupy jest jednak bardzo świeżej, najwyżej kilkusetletniej, proveniencji.

Łosie polskie wywodzą się z kilku linii, przybyłych z odmiennych kierunków, co przyczyniło się do ich zwiększonej różnorodności w strefie wtórnego kontaktu w SN Polsce. Podobny wzrost zmienności na tym regionie obszarze cechuje inne gatunki ssaków. Łosie tworzą dwa genetycznie odmiennie klastery populacji, północny (dominują H1 i H2) oraz południowo-centralny (dominują H3 i kampinowski H11).

Kolejny podrozdział omawia reliktowy charakter biebrzańskich populacji, podkreślając odrębność i niewielką zmienność, na gwałtownej redukcji liczebności łośi do kilkunastu osobników w rezerwacie Czerwone Bagno. Haplotypy rzadkie stanowią zagadkę, być może pochodzą od osobników które przetrwały dewastujący efekt II wojny w małych lokalnych populacjach (np. Polesie), lub też przywędrowały albo pochodzą z introdukcji. Zgodny obraz dają także sekwencje genów jądrowych, a utrzymywanie się polimorfizmów *MHCII DRB* o znanej funkcji może mieć związek z dobozem równoważącym czy wzrostem zagęszczenia łośi na terenach chronionych. Mikrosatelity pokazują rozmaite struktury genetyczne populacji lokalnych panmiktyczne z jednej, zimbredowane z drugiej, w których rzeczywiście zidentyfikowano osobniki spokrewnione ze sobą, najczęściej kuzynów, rzadko rodzica i potomka.

Populację biebrzańską przekonuje autorka rozprawy należy uznać za relikw biogeograficzny (Lomolio et al. 2006), zw. reliktem właściwym, a w komplementarnym ujęciu (Zimmermann et al. 2010) za relikw genetyczny, plejstocenijską populację reliktową skraja zasięgu. Powinna zyskać status specjalnej jednostki zarządzania (MU), gdyż jest odrębność genetyczna nie ulega wątpliwości i jest niezależna demograficznie od innych populacji. Stanowi ważny składnik zmienności wewnątrzgatunkowej i potencjału ewolucyjnego, zatem w myśl Konwencji Genewskiej winna podlegać ochronie. Dyskusję zamyka podrozdział rekonstruujący powojenną historię łośi w Polsce i opis wysokiego genetycznego zróżnicowania międzypopulacyjnego między nimi. Doktorantka przedstawia kilka tłumaczeń. Populacje przeszły przez wąskie gardło w czasach historycznych; dryf wzmocnił zróżnicowanie. Telemetria wskazuje na filopatrię obu płci, jednak w niniejszej pracy markery dowodzą ograniczonej dyspersji kłemp w większości badanych populacji. Dwukierunkowa ekspansja może również prowadzić do wzrostu zróżnicowania; sugerując złożone pochodzenie populacji, na których autochtonicznej strukturze genetycznej napływ łośi z Prus Wschodnich i Polesia, wycisnąć mógł wyraźne piętno. Podsumowanie kończy pracę.

Pracę p. mgr. Magdaleny Świsłockiej czytałem kilkakrotnie, zawsze z wielkim zainteresowaniem i podziwem dla kilku aspektów: tematyki, tła teoretycznego, różnorodności technik laboratoryjnych eksplorujących zmienność rozmaitych segmentów genomów w świetle oczekiwań, ogromu włożonej pracy, zapewne frustrującej nieskutecznością usiłowań czy brakiem interpretowalnej zmienności. Praca, dotycząca ważnego zagadnienia, o konsekwencjach praktycznych dla ochrony łośi, napisana jest bardzo dobrze, zrozumiałym



językiem. Dwie części pracy zostały już opublikowane, trzecia zostanie zapewne szybko przygotowana do druku.

Doktorantka musiała opanować rozmaite techniki analizy genomu, izolację DNA ze zróżnicowanego materiału, amplifikację wybranych fragmentów, sekwencjonowanie czy genotypowanie mikrosatelitów. Ponadto uzyskała biegłość w różnych sposobach analizy zmienności i struktury populacji. Były to m.in. konstrukcje dendrogramów, sieci haplotypów, analizy zróżnicowania wewnątrz i międzygatunkowego, oparte o modele genetyki populacyjnej i analizy wariacji genetycznej, wreszcie datowanie dywergencji i wnioskowanie o przemianach demograficznych w długiej czy krótkiej skali czasowej. Pokonała liczne przeszkody, ominęła rafy i mielizny, przedstawiając pracę świadczącą również o opanowaniu przez Nią teorii kilku odrębnych dziedzin, na których zasadza się filogeografia i biologia konserwatorska. Cytuje ogromną liczbę prac źródłowych (345). Jej praca pod mało oryginalnym tytułem, odkrywa nie tylko złożoność i zawilgości struktury genetycznej krajowych łośi, lecz także poszukuje jej źródeł eksplorując i testując alternatywne hipotezy. Dobrze poznana i udokumentowana struktura genetyczna łośi domaga się, moim zdaniem, podejścia genomowego, do którego kierowana przez Jej promotora grupa ma predyspozycje.

Uwagi krytyczne są nieliczne. Brakuje mi mapy zasięgów łośi na świecie, czy przynajmniej zachodniego krańca zasięgu, które by krajowe zróżnicowanie i opisywane drogi kolonizacji przedstawiały w szerszej skali przestrzennej. Kluczowe ryc. 1 i 2 są mylące, niekonsekwentnie oznaczone. Różnica między kolorem fioletowym a niebieskim jest zbyt subtelną dla nosiciela jednego iksa (opsyny SW są kodowane w chromosomie X). Skala zagęszczenia łośi nawiązująca do widma, nagle przeskakuje na jego drugi kraniec (czerwony). Oznaczenie populacji jest niekonsekwentne; ryc. 1 są tylko numery, na ryc. 2 brak oznaczeń, w tekście trzyliterowe skróty. Czytelnik sam musi dokonać korekt. Skośna perspektywa placków i ortogonalna kraju kłóć się z moim odczuciem perspektyw. Tabele: Nie potrafię biegle czytać kolumn tekstu scentrowanego w środku, a tym bardziej porównywać liczb tak zapisanych. Maniera centrystyczna niestety się szerzy również w poważnych czasopiśmie. Inne uwagi są językowe, dotyczą słów czy nomenklatury, głównie polskich odpowiedników słów i terminów angielskich (patrz dołączona lista). Proszę o wyjaśnienie jak uniknięto pobierania prób od tych samych osobników, skoro zbierano tylko odchody.

Uwagi powyższe i zamieszczone na końcu, są mało istotne dla wysokiej oceny pracy. Mogą łatwo być uwzględnione w przygotowywanej pracy, a językowe dwuznaczności znikną w wersji angielskiej.

Reasumując, praca p. mgr Magdaleny Świsłockiej spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o jej przyjęcie i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu.

Równocześnie, zważywszy wyjątkowe walory naukowe pracy, wnoszę o jej wyróżnienie.

*Jacek M. Szymura*

prof. dr hab. Jacek M. Szymura  
członek PAU  
Zakład Anatomii Porównawczej UJ

Kraków, 29 września 2014 r.



Uwagi:

str. 36 rząd Artiodactyla – dziś Cetartiodactyla

str. 37 – unikalna linia ewolucyjna – unikatowa

str. 40 – pobieranie prób każdej zimy – jak uniknięto pobierania prób od tych samych osobników? Jeśli badano mikrosatelity, czy znaleziono takie same profile?

str.44 – linia 11 – niejasne – jeśli doktorantka amplifikowała np. odcinek mtDNA długości 607 bp, wiarygodna sekwencja nukleotydów musi być skrócona o długość starterów, gdyż te mogą się łączyć z nieco różnymi sekwencjami.

na chromosomie Y – geny znajdują się w chromosomie

str. 49 - brak szczegółów amplifikowania mikrosatelitów (Tabela 3 i 5)

w drugim akapicie, niekonsekwentny opis schematu amplifikacji.

85 – 1.10/11 – 34 miejscami polimorficznymi – 34 substytucjami

90 – 1.20 matryca wartości – macierz wartości (ang. matrix = macierz, matryca po angielsku to template

107 – 1. 4 – unikalna historia – unikatowa historia

118- 1. 6-3 od dołu – zdanie niejasne, nie wiadomo o jakie wąskie gardło chodzi. Zapis (Brincken 1826) sugeruje jakoby on dokumentował spadek liczebności. Rok 1826 nic nie mówi o końcu wieku XIX, raczej pierwszej jego połowie.