Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Kloch
pt.: „Analiza sekwencji sprzężonych z chromosomem Y gatunku *Bison bonasus*", w związku z powierzeniem obowiązku recenzenta przez Radę Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Rozprawa doktorska mgr inż. Marty Kloch została przygotowana w Instytucie Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Wandy Olech oraz promotor pomocniczej dr inż. Zuzanny Nowak-Życzyńskiej, w formie monografii. Problematyka rozprawy doktorskiej jest mi bardzo dobrze znana, ponieważ od lat śledzę badania molekularne i cytogenetyczne zwierząt, w tym żubrów, które należą obecnie do gatunków bliskich zagrożenia wyginięciem. Szczególnie cenna jest działalność Pani Promotor w zakresie ochrony żubrów.

W związku z wystąpieniem wśród żubrów momentu zagrożenia wyginięciem i odtworzenia populacji poprzez krzyżowanie ocalałych osobników, doszło też do ograniczenia liczby wyjściowych chromosomów Y. Doktorantka podjęła się analizy sekwencji sprzężonych z chromosomem Y, co jest kontynuacją działalności Promotor prof. Wandy Olech w zakresie szeroko pojętej opieki nad żubrami.

Rozprawę rozpoczyna **Streszczenie** w języku polskim i angielskim wraz ze słowami kluczowymi oraz **Spis treści**, które Doktorantka zamieściła na łącznie 3 stronach.

Jednostronicowy **Wstęp** wprowadzający w przedstawione w rozprawie zagadnienia poprzedza **Przegląd literatury** obejmujący 33 strony. Ta część podzielona została na dwie główne części, poświęcone badaniom cytogenetycznym oraz wybranym do badań gatunkom zwierząt. Doktorantka wprowadza czytelnika w badania cytogenetyczne, począwszy od hodowli komórkowych poprzez analizy chromosomów z zastosowaniem klasycznych technik barwienia aż do metod cytogenetyki molekularnej. Następnie charakteryzuje wybrane do badań gatunki zwierząt obejmujące żubra *Bison bonasus*, bizona amerykańskiego *Bison bison* oraz bydło domowe *Bos taurus*. Przechodzi do charakterystyki rodziny *Bovidae* ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia chromosomu Y, którym zajmuje się w ramach rozprawy. W ostatniej części przedstawia dostępne badania cytogenetyczne wybranych gatunków *Bovidae*. W ocenie recenzenta wstęp został przygotowany poprawnie i zawiera niezbędne informacje związane z przygotowaniem do badań molekularnych. Problematyka określenia liczby chromosomów jest obecnie już historyczna, jednakże należy pamiętać, że określenie liczby chromosomów u człowieka okazało się trudne i przez wiele lat dyskutowano w przeszłości czy u człowieka występuje 46 czy 48 chromosomów. Jeszcze w latach 70.tych ta kwestia była szeroko

dyskutowana i pamiętam wizytę w Poznaniu prof. Torbjörna Casperssona z Instytutu Karolinska w Sztokholmie, poświęconą temu zagadnieniu.

**Cel pracy** przedstawiono w formie trzech zadań szczegółowych, obejmujących lokalizację wybranych genów sprzężonych z chromosomem Y u żubra, porównanie jego morfologii z bizonem i bydłem domowym oraz charakterystykę różnic w obrębie gatunku *Bison bonasus*. Założone cele uważam za ambitne i trudne do realizacji ze względu na konieczność przebadania dużej liczby osobników.

Rozdział **Materiał** obejmujący trzy strony przedstawia zestawienie osobników żubrów z polskich ośrodków hodowlanych i stad wolnościowych, od których pobrano krew. Spośród 124 próbek, 78 pochodziło od samców, głównie potomków Plebejera (rasa nizinna) oraz Kaukasusa (rasa nizinno-kaukaska). Doktorantka ponadto uzyskała dwie próbki krwi samców bizonów amerykańskich oraz 6 próbek krwi pobranych przedubojowo od buhajów bydła domowego.

**Metody** przedstawiono na 10 stronach. Doktorantka opisuje prowadzone hodowle komórkowe, przechodzi następnie do przygotowania preparatów mikroskopowych, barwień konwencjonalnych, poprzez barwienie różnicujące – prążki C aż do cytogenetyki molekularnej. W tej części przedstawia izolację DNA na potrzeby przygotowania sond molekularnych do reakcji FISH, reakcję PCR, przygotowanie sond molekularnych oraz reakcje FISH, PRINS, TSA-FISH aż do FISH z sondą malującą chromosomy bydła domowego. Ważną częścią tego rozdziału jest z pewnością metodyka analizy preparatów mikroskopowych, pomiarów chromosomu Y oraz analiza statystyczna.

Rozdział **Wyniki** Autorka przedstawiła na 32 stronach, obejmujących także liczne ryciny, tabele i wykresy. Doktorantka wyróżnia siedem głównych części odnosząc się do hodowli komórkowych oraz konwencjonalnych barwień. Opisuje następnie dane związane z zastosowaniem barwienia różnicującego opartego o prążki C. Przechodzi następnie do wyników z zastosowaniem FISH, PRINS, TSA-FISH i FISH z sondą malującą chromosomy płci bydła domowego. W ostatniej części przedstawia pomiary chromosomów.

Spośród 124 wyjściowych hodowli komórkowych z krwi obwodowej żubrów, Doktorantka uzyskała według swojej oceny „zadowalające" wyniki dla wszystkich próbek pochodzących od samców (78 hodowli) oraz 25 na 46 próbek pochodzących od samic. Uprzejmie proszę o wyjaśnienie, co należy rozumieć pod pojęciem „zadowalające" wyniki hodowli. Ze względu na pobieranie materiału wyjściowego i konieczność transportu w różnych warunkach do laboratorium, uważam, że uzyskanie hodowli komórkowych stanowi bardzo trudne i wymagające doświadczenia i cierpliwości zadanie. Dla próbek bydła i bizonów nie było problemów z wyprowadzeniem hodowli. Wszystkie hodowle poddano barwieniu barwnikiem

Giemsy. Następnie Doktorantka wykorzystała barwienie różnicujące prążków C uwidaczniając bloki heterochromatyny konstytutywnej dla wszystkich chromosomów autosomalnych i chromosomów Y badanych gatunków. W przypadku chromosomu X nie zaobserwowano heterochromatyny konstytutywnej. Doktorantka zaobserwowała różną lokalizację prążków C u żubra i bizona, u których występują na końcu długiego ramienia chromosomu wobec położenia na ramieniu krótkim chromosomu u bydła. Ciekawe jest również wskazanie jaśniejszego wybarwienia chromosomu Y żubra i bizona wobec pozostałych chromosomów.

Metodą FISH z zastosowaniem sond znakowanych metodą pośrednią analizowała geny *TSPY*, *SRY*, *PRL* oraz łącznie geny *TSPY* i *USPY9*, Doktorantce nie udało się jednak uzyskać informacji o lokalizacji badanych genów. W przypadku sond znakowanych metodą bezpośrednią analizowano geny *SRY*, *PRL* oraz łącznie geny *TSPY* i *USPY9*, również nie uzyskując jednoznacznego sygnału hybrydyzacji. Doktorantka wskazywała na rozproszenie sygnału fluorescencyjnego sondy oraz nadmiar cytoplazmy. Metodą PRINS Doktorantka zaobserwowała sygnały hybrydyzacyjne dla genów *SRY* i *PRL* wyłącznie w jądrach interfazowych, a w przypadku reakcji TSA-FISH dla tych genów nie uzyskała wyraźnych sygnałów hybrydyzacyjnych, a ponadto w niektórych przypadkach sygnał był rozproszony. Z kolei FISH z sondą malującą chromosomy bydła domowego umożliwił otrzymanie wyraźnych sygnałów hybrydyzacyjnych dla chromosomów X i Y, zarówno dla chromosomów metafazowych jak i w jądrach interfazowych. Wyniki są bogato ilustrowane, jednak nie zamieszczono danych dla bizona amerykańskiego i bydła domowego, przy czym w szczególności bydło domowe mogłoby stanowić wewnętrzną pozytywną kontrolę prowadzonych badań cytogenetycznych.

Doktorantka przeprowadziła szczegółowe pomiary chromosomu Y wykazując, że chromosom Y żubra ma największą powierzchnią względną w porównaniu z bizonem i bydłem domowym. Zaobserwowała ponadto różnice pomiędzy linią nizinną a linią kaukaską w odniesieniu do powierzchni rzeczywistej i względnej.

Ze względu na konieczność wyprowadzenia hodowli komórkowych z pobranych próbek krwi i stosowanie różnych badań cytogenetycznych, rozdział ten należy ocenić wysoko. Rozdział pozostawia jednak pewien niedosyt związany z brakiem wyraźnych sygnałów hybrydyzacyjnych umożliwiających mapowanie badanych genów.

**Dyskusja** została przedstawiona na 10 stronach, a Doktorantka odnosi swoje wyniki do dostępnych danych, począwszy od wskazania problemów z prowadzeniem hodowli komórkowych po działaniu substancjami anestetycznymi, ale tylko w odniesieniu do samic, poprzez morfologiczne uzasadnienie przynależności systematycznej i nowe systematyki. Następnie szeroko dyskutuje problemy związane z lokalizacją metodami cytogenetycznymi

wybranych genów chromosomu Y oraz ocenę morfologiczną chromosomu Y. Ta część rozprawy jest w pełni satysfakcjonująca. W latach 90.tych Thomas Cremer opracował z użyciem sond malujących charakterystyczne terytoria zajmowane przez poszczególne chromosomy w stanach prawidłowych i patologicznych. Czy możliwe było wykonanie badań określających obszar zajmowany przez chromosom Y u żubra?

Doktorantka sformułowała 14 **wniosków** dotyczących lokalizacji wybranych genów na chromosomie Y, mapowania sondą malującą chromosom Y, długości i powierzchni względnej i rzeczywistej chromosomu Y, powierzchni prążka C oraz poziomu heterochromatyny konstytutywnej w chromosomach Y u żubrów i innych gatunków oraz pomiędzy liniami żubra. Wnioski można było przedstawić w sposób bardziej zwarty. W obecnej formie stanowią one streszczenie i podsumowanie poszczególnych etapów badań. Przedstawione wnioski uważam za wartościowe.

Doktorantka zamieściła w rozprawie **Spis tabel, wykresów i rycin**, **Bibliografię** obejmującą 262 artykuły i zestawienie **Źródeł internetowych**. Doktorantka kończy rozprawę trzema **Załącznikami** dotyczącymi przygotowania sond molekularnych, opisu przygotowania reakcji FISH oraz reakcji PRINS.

W swojej recenzji nie skupiłem się na drobnych niedociągnięciach, ponieważ wartości merytoryczne przewyższają niewielkie usterki.

**Wniosek końcowy**. Zwracam się do Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo mgr inż. Marcie Kloch. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Ze względu na szeroko zakrojone badania z zakresu cytogenetyki molekularnej oraz morfologii chromosomu Y żubra i opublikowanie części wyników, zgłaszam **wniosek o wyróżnienie rozprawy**. Wyróżnienie uzasadniam uzyskaniem bardzo wartościowych wyników.

Poznań, 23.05.2023 r.

Prof. dr hab. n. med. Ryszard Słomski