

AUTOREFERAT

Dr Aleksandra Biedrzycka

Instytut Ochrony Przyrody Polskiej Akademii Nauk
al. Mickiewicza 33, 31-120 Kraków

Kraków, 12.10.2017

Spis treści:

1. Informacje o wykształceniu i przebiegu zatrudnienia
2. Dorobek naukowy
 - a) Dorobek naukowy zdobyty przed uzyskaniem doktoratu
 - b) Dorobek naukowy zdobyty po uzyskaniu doktoratu
 - Dorobek wchodzący w skład osiągnięcia naukowego pt.: ***„Wpływ interakcji pasożyt-gospodarz na kształtowanie się zmienności głównego kompleksu zgodności tkankowej w populacjach naturalnych oraz narzędzia umożliwiające ich badanie”***
 - Pozostałe publikacje, nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Imię i nazwisko:

Aleksandra Biedrzycka (z domu Gondek)

1. Informacje o wykształceniu i przebiegu zatrudnienia

Wykształcenie

10.2002 - 03.2007 Studium Doktoranckie Instytutu Botaniki i Instytutu Ochrony Przyrody PAN.

Tytuł pracy doktorskiej: „Wpływ zaniku i fragmentacji siedliska na różnorodność genetyczną susła perłkowanego *Spermophilus suslicus*”, „Genetic variability and the effect of habitat fragmentation in spotted suslik *Spermophilus suslicus* populations”. Rozprawa obroniona 15.03.2007

Promotor: prof. dr hab. Zbigniew Głowaciński

Miejsce wykonania pracy: Instytut Ochrony Przyrody PAN

10.1998 - 06.2002 Dwustopniowe studia magisterskie na kierunku Ochrona Środowiska, specjalność biologia środowiskowa, Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Tytuł pracy magisterskiej: “Wpływ zarażenia pasożytami z grupy *Haemosporidia* na wybór siedliska i sukces reprodukcyjny rokitniczki *Acrocephalus schoenobaenus*”, “Habitat choice and breeding success in sedge warbler *Acrocephalus schoenobaenus* affected by *Haemosporidia* parasites” . Praca obroniona 11.06.2002

Promotor: Dr hab. Tadeusz Zając

Miejsce wykonania pracy: Instytut Ochrony Przyrody PAN

Tytuł pracy licencjackiej: "Demograficzne konsekwencje dynamiki populacji sikory bogatki *Parus major* w Puszczy Niepołomickiej", Praca obroniona 23.06.2000

Promotor: prof. dr hab Mariusz Cichoń.

Miejsce wykonania pracy: Instytut Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego

Zatrudnienie

07.2007 adiunkt w Zakładzie Ochrony Fauny Instytutu Ochrony Przyrody PAN

12.2008 – 11.2009 oraz 04.2015 – 03.2016 urlop macierzyński i rodzicielski

09.2002 - 07.2007 asystent w Zakładzie Ochrony Fauny Instytutu Ochrony Przyrody PAN

Bezpłatny urlop naukowy w okresie 10.2004 – 04.2005 oraz 01.2006 – 06.2006

10.2004 - 04.2005 Marie Curie Fellowship, Newcastle University, School of Biology, dr Kirsten Wolff group, Newcastle upon Tyne, GB; Developing specific microsatellite primers for spotted suslik *Spermophilus suslicus*

01-06.2003 Marie Curie Fellowship, Barcelona University, Evolutionary Genetics Department, prof. Montserrat Aguade group, "Detecting the effects of hitchhiking and positive selection in *Drosophila melanogaster* from SNP's data in noncoding regions."

2. Dorobek naukowy

a) Dorobek naukowy zdobyty przed uzyskaniem doktoratu

Swoje pierwsze badania naukowe przeprowadziłam w ramach pracy licencjackiej będącej zakończeniem studiów pierwszego stopnia na Wydziale Chemii UJ, na kierunku Ochrona Środowiska, specjalność biologia środowiska. Pracę wykonałam w Instytucie Nauk o Środowisku, w ówczesnym Zakładzie Ekologii Populacyjnej pod kierunkiem prof. dr hab. Mariusza Cichonia. Badania dotyczyły demografii populacji sikory bogatki w Puszczy Niepołomickiej.

W czasie studiów magisterskich miałam możliwość wyjazdu na stypendium Sokrates/Erasmus, w ramach którego odbyłam czteromiesięczny staż na Uniwersytecie w Barcelonie, w Zakładzie Genetyki Ewolucyjnej pod opieką prof. Montserrat Aguade. Wykonałam tam projekt pt.: "Analysis of sequence variation in *Or 7a* region in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*" w ramach którego badałam wpływ doboru naturalnego na polimorfizm sekwencji genu *Or7a*, należącego do rodziny genów kodujących receptory węchowe u muszki owocowej. Projekt ten pozwolił mi na zdobycie doświadczenia w zastosowaniu technik molekularnych, takich jak izolacja DNA, namnażanie go metodą PCR i projektowanie specyficznych starterów reakcji PCR oraz sekwencjonowanie DNA.

W czasie stażu na Uniwersytecie w Barcelonie zdobyłam umiejętność posługiwania się testami statystycznymi i programami komputerowymi służącymi do oceny polimorfizmu DNA pod kątem działania selekcji naturalnej i czynników demograficznych. Wyniki projektu zaprezentowałam w formie plakatu na X Kongresie Europejskiego Stowarzyszenia Biologii Ewolucyjnej ESEB w Krakowie.

W ramach pracy magisterskiej, wykonanej w Instytucie Ochrony Przyrody Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem dr hab. Tadeusza Zająca, zajmowałam się wpływem zapasozyczenia samców rokitniczki na kondycję i sukces reprodukcyjny. Wykazałam wówczas, że stopień zapasozyczenia krwi wpływa na czas przylotu na terytoria lęgowe. Dzięki temu mniej zapasozyczone osobniki zajmowały jakościowo lepsze terytoria, co z kolei determinowało ich późniejszy sukces lęgowy.

Dzięki zdobytemu wcześniej doświadczeniu w zastosowaniu metod molekularnych w badaniu procesów ewolucyjnych i demograficznych w ramach swojej pracy doktorskiej zajęłam się zastosowaniem tych metod w ocenie zmienności zagrożonych gatunków. Pracę doktorską wykonałam pod opieką prof. dr hab. Zbigniewa Głowacińskiego. Samodzielnie przygotowałam wniosek i uzyskałam finansowanie ze środków KBN projektu pt.: „Poziom heterozygotyczności i występowanie patogenów w zanikającej populacji susła perełkowanego w Polsce”, którego byłam kierownikiem. Otrzymałam także grant promotorski, finansowany przez KBN pt.: „Zmienność genetyczna susła perełkowanego *Spermophilus suslicus* w różnych częściach jego zasięgu”. W wyniku przeprowadzonych badań powstała moja praca doktorska pt.: „Wpływ zaniku i fragmentacji siedliska na różnorodność genetyczną susła perełkowanego”. W swoich badaniach udowodniłam, że polskie, zagrożone populacje susła charakteryzują się istotnie mniejszą zmiennością genetyczną i wyjątkowo silnym zróżnicowaniem międzypopulacyjnym w porównaniu z populacjami ze wschodniej części zasięgu, gdzie suseł ciągle występuje w siedlisku o dużym stopniu łączności (Biedrzycka i Konopiński, 2008, praca nr 13). Praca została nominowana do nagrody Prezesa Rady Ministrów w 2008 roku. Badania neutralnej zmienności genetycznej u skrajnie zagrożonego gatunku i opracowanie praktycznych wskazówek, które zostały włączone do zarządzania populacjami susła perełkowanego były jednymi z pierwszych tego typu w Polsce.

W czasie trwania studiów doktoranckich uzyskałam kolejne stypendium na Uniwersytecie w Barcelonie, w Zakładzie Genetyki Ewolucyjnej w ramach programu Marie Curie Training Sites. W czasie tego sześciomiesięcznego wyjazdu pracowałam pod kierunkiem prof. Montserrat Aguade i prof. Julio Rozas. W prowadzonych tam badaniach

udało mi się wykazać działanie doboru naturalnego i tzw. efektu „podwiezienia” (*hitchhiking effect*) w populacji *Drosophila melanogaster* dzięki ocenie polimorfizmu sekwencji regionów niekodujących. Projekt ten zaowocował wystąpieniami na IX Kongresie Europejskiego Stowarzyszenia Biologii Ewolucyjnej ESEB w Leeds oraz na kolejnym kongresie, który odbył się w Krakowie.

Również w czasie studiów doktoranckich uzyskałam stypendium Marie Curie Training Sites w ramach programu MOTIVE w laboratorium Ekologii Molekularnej dr Kirsten Wolff na Uniwersytecie w Newcastle upon Tyne w Wielkiej Brytanii. Miałam tam możliwość opracowania specyficznych markerów mikrosatelitarnych dla susła perełkowanego metodą wzbogaconego klonowania i sekwencjonowania klonów (Gondek i in., 2006, praca nr 14). Rozszerzyłam tam również doświadczenie w zastosowaniu metod statystycznych w genetyce populacyjnej.

b) Dorobek naukowy zdobyty po uzyskaniu doktoratu

Problematyka badawcza opisywana w cyklu pięciu publikacji „*Wpływ interakcji pasożyt-gospodarz na budowę i kształtowanie się zmienności głównego kompleksu zgodności tkankowej w populacjach naturalnych oraz narzędzia umożliwiające ich badanie*” stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego. Łączny „impact factor” (zgodny z rokiem publikacji) wyniósł 16.01 a łączna liczba punktów MNiSW 170. Lista prac przedstawiona jest w odwróconej kolejności chronologicznej.

Lista publikacji składających się na osiągnięcie habilitacyjne:

1. Biedrzycka A.*, O'Connor E., Sebastian A., Migalska M. Radwan J., Zając T., Bielański W., Solarz W., Ćmiel A., Westerdahl H. Extreme MHC class I diversity in the sedge warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*); selection patterns and allelic divergence suggest that different genes have different functions. 2017. BMC Evolutionary Biology, DOI: 10.1186/s12862-017-0997-9; IF 3,406; pkt. MNiSW 30
Swój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 60%. Byłam autorem i kierownikiem projektu w ramach którego wykonane zostały badania, stworzyłam całościową koncepcję badań, zaplanowałam eksperyment i przeprowadziłam całość badań laboratoryjnych. Wykonałam również większość analiz i napisałam część manuskryptu.

2. Biedrzycka A., Kloch A.* Development of novel associations between MHC alleles and susceptibility to parasitic infections in an isolated population of an endangered mammal. 2016. *Infection, Genetics and Evolution* 44: 210-217; IF 2,598; pkt. MNiSW 30

Swój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 50%. Byłam autorem projektu w ramach którego wykonane zostały badania, stworzyłam generalną koncepcję badań, zaplanowałam eksperyment i wzięłam udział w zbieraniu materiału. Przeprowadziłam całość badań laboratoryjnych. Przeprowadziłam analizy dotyczące zmienności genetycznej i napisałam znaczną część manuskryptu.

3. Biedrzycka A.*, Migalska M., Bielański W. Quantitative PCR for detection of specific *Haemoproteus* lineages and molecular characterization of blood parasites in sedge warbler population from southern Poland. 2013. *Journal of Ornithology* 156: 201-208; IF 1,72; pkt. MNiSW 40

Swój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 90%. Byłam autorem i kierownikiem projektu w ramach którego wykonane zostały badania, stworzyłam generalną koncepcję badań, zaplanowałam eksperyment i wykonałam większość prac laboratoryjnych oraz kierowałam pracą magistrantki. Wykonałam analizę danych i napisałam manuskrypt.

4. Biedrzycka A.*, Kloch A., Buczek M., Radwan J. Major histocompatibility complex DRB genes and blood parasite loads in fragmented populations of the spotted suslik *Spermophilus suslicus*. 2011. *Mammalian Biology* 76: 672-677; IF 1,609; pkt. MNiSW 30

Swój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 80%. Byłam autorem projektu i kierownikiem w ramach którego wykonane zostały badania, stworzyłam generalną koncepcję badań, zaplanowałam eksperyment i wzięłam udział w zbieraniu materiału. Wykonałam prace laboratoryjne i analizy dotyczące zmienności genetycznej. Napisałam główną część manuskryptu.

5. Biedrzycka A.*, Radwan J. Population fragmentation and major histocompatibility complex variation in the spotted suslik, *Spermophilus suslicus*. 2008. *Molecular Ecology* 17: 4801-4811; IF 5,325; pkt. MNiSW 40

Swój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 80%. Byłam autorem i kierownikiem projektu w ramach którego wykonane zostały badania, razem z prof. Radwanem stworzyłam generalną koncepcję badań, zaplanowałam eksperyment. Przygotowałam i przeprowadziłam prace terenowe. Wykonałam analizy laboratoryjne i przeprowadziłam zdecydowaną większość analiz danych. Napisałam część manuskryptu.

Konsekwencją mojego zainteresowania działaniem procesów prowadzących do ograniczenia neutralnej zmienności genetycznej małych, izolowanych populacji było podjęcie tematu zmienności regionów funkcjonalnych w podobnych systemach i tą tematyką zajęłam się w badaniach prowadzonych po uzyskaniu doktoratu. W pierwszej dekadzie XXI wieku na świecie zaczęły pojawiać się publikacje dotyczące poziomu zmienności genetycznej głównego kompleksu zmienności tkankowej MHC w populacjach zwierząt dziko żyjących. Region MHC jest zespołem genów kodujących białka biorące udział w rozpoznawaniu antygenów przez limfocyty T, które pełnią kluczową rolę w tworzeniu adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej (Murphy i in., 2007). Klasyczne geny MHC należą do jednych z najbardziej zmiennych funkcjonalnych regionów genomu, ale jednocześnie ich struktura jest bardzo odmienna w zależności od grupy, a nawet gatunku kręgowców (Kelley i in., 2005). Dokładne poznanie struktury i funkcji tych genów u człowieka i gatunków laboratoryjnych stało się podstawą najpierw do opisu zmienności MHC w naturalnych populacjach, a następnie do próby rozpoznania czynników ją kształtujących. Jednym z głównych mechanizmów utrzymujących tak wysoki polimorfizm wydaje się być pozytywny dobór naturalny działający jako wynik presji ze strony patogenów na organizmy gospodarzy (Bernatchez i Landry, 2003; Spurgin i Richardson, 2010). Geny głównego kompleksu zmienności tkankowej stały się modelem mającym odpowiedzieć na pytanie w jaki sposób funkcjonalna zmienność genetyczna utrzymuje się w dzikich populacjach. Mimo postępu badań, ciągle brakuje jasnej odpowiedzi na pytanie, który z mechanizmów tłumaczących działanie doboru poprzez wpływ patogenów ma największe relatywne znaczenie i w jakich sytuacjach możemy oczekiwać powstawania zależności pomiędzy poziomem zmienności czy występowaniem specyficznych alleli a częstością i intensywnością zapasożycenia. Dokładne przyczyny tak wielkiego zróżnicowania poziomu zmienności MHC pomiędzy gatunkami a nawet w obrębie poszczególnych gatunków nie są również znane. W cyklu prac składających się na moje osiągnięcie naukowe przedstawiam wyniki badań, które przyczyniają się do pogłębienia wiedzy na temat roli i siły czynników kształtujących zmienność genetyczną tego niezwykle ważnego regionu oraz proponuję warsztat metodyczny pozwalający na badanie szczegółowych aspektów związanych z presją selekcyjną wywieraną przez patogeny na organizmy gospodarzy.

Presja ze strony pasożytów jest jednym z głównych czynników przyczyniających się do ekstynkcji populacji i gatunków (Smith i in., 2009). Spadek zmienności genetycznej,

jakiego doświadczają populacje izolowane, o dużym stopniu fragmentacji, lub takie, które przeszły gwałtowne załamanie liczebności dotyczy również genów biorących udział w wytwarzaniu odporności przeciw patogenom. Zbadanie, jak czynniki losowe i kierunkowe wpływają na ten funkcjonalny region genomu oraz wyznaczenie ich relatywnego udziału w kształtowaniu zmienności MHC było wyjątkowo istotne dla określenia roli tej zmienności w funkcjonowaniu izolowanych populacji zagrożonych gatunków. Z tego powodu wybrałam tematykę badań związaną z kształtowaniem się zmienności MHC w krytycznie zagrożonych populacjach susła perełkowanego. W populacjach tych wcześniej udało mi się wykazać prawie całkowitą izolację genetyczną i istotnie obniżony, zarówno w wyniku izolacji jak i działania dryfu genetycznego, poziom zmienności neutralnie ewoluujących loci mikrosatelitarnych. We współpracy z prof. dr hab. Jackiem Radwanem zbadaliśmy poziom zmienności MHC DRB (MHC klasy II) w 14 populacjach susła perełkowanego różniących się pod względem stopnia izolacji i poziomu zmienności genetycznej. Analiza polimorfizmu badanego regionu wykazała istotne znaczenie pozytywnej selekcji w kształtowaniu zmienności badanego regionu w przeszłości. Jednocześnie nasze badania dowiodły, że **zmienność MHC w izolowanych populacjach susła perełkowanego jest istotnie niższa w porównaniu z populacjami charakteryzującymi się intensywnym przepływem genów**. Co więcej, wykazaliśmy, że **zmienność MHC w populacjach, w których dochodzi do intensywnego działania dryfu genetycznego jest skorelowana ze zmiennością w loci mikrosatelitarnych. Wskazuje to na istotniejsze znaczenie dryfu genetycznego w porównaniu z presją doboru w kształtowaniu zmienności MHC (Biedrzycka i Radwan 2008, *Molecular Ecology*)**. Praca ta wniosła istotny przyczynek do wiedzy na temat zmienności MHC w zagrożonych populacjach i pomimo czasu, jaki upłynął od jej opublikowania ciągle jest cytowana w nowo pojawiających się publikacjach, szczególnie tych dotyczących zmienności MHC w populacjach zagrożonych gatunków.

W kolejnej pracy podjęłam problematykę związku pomiędzy zapasożyceniem populacji a zmiennością MHC (**Biedrzycka i in. 2011, *Mammalian Biology***). Wpływ patogenów na kształtowanie się zmienności MHC może być tłumaczony przez kilka mechanizmów, z których każdy doczekał się potwierdzenia empirycznego, jednak ciągle wątpliwości budzi ich relatywne znaczenie. Jedno z założeń mówi, że osobniki będące heterozygotami w danym locus mają większą szansę posiadania allelu chroniącego przed danym patogenem (tzw. naddominacja, zaleta posiadania heterozygoty, Doherty i Zinkernagel, 1975). Dodatkowo, szybko ewoluujące patogeny dostosowują się do najczęstszych w populacji alleli MHC, natomiast posiadanie rzadkich alleli daje ochronę

przed patogenami (selekcja zależna od częstości, Borghans i in., 2004). W końcu, związek ten tłumaczony jest działaniem doboru fluktuacyjnego, kiedy zmienność we frekwencji alleli MHC wyjaśniana jest poprzez różnice w presji patogenów w zależności od miejsca i czasu ich działania (Hedrick, 2002; Hill, 1998). We wcześniej opisywanych badaniach udowodniliśmy, że główny wpływ na zmienność MHC w populacji poddanej silnemu działaniu czynników demograficznych mają właśnie one (Biedrzycka i Radwan, 2008), jednak dane symulacyjne (Ejmond i Radwan, 2011) wykazały, że również dobór, obok dryfu genetycznego ma wpływ na zmianę frekwencji alleli MHC w małych populacjach. Mimo licznych prac wskazujących na związek występowania konkretnych alleli MHC a częstością występowania patogenów, badania takich zależności w populacjach gatunków zagrożonych należą do rzadkości. Dlatego moje badania zostały przeprowadzone w izolowanych populacjach susła perełkowanego, które po raz kolejny okazały się świetnym systemem modelowym do badania czynników kształtujących zmienność MHC. W pracy tej oszacowaliśmy zmienność markerów neutralnych (loci mikrosatelitarne) oraz zmienność drugiego exonu locus DRB MHC klasy II oraz oznaczyliśmy zapasożycenie pasożytami krwi z rodzaju *Babesia*, *Bartonella* i *Haemobartonella*. Badania nie wykazały związku pomiędzy poziomem heterozygotyczności MHC a częstością występowania ani intensywnością infekcji pasożytniczych. **Udało nam się jednak udowodnić wpływ jednego z alleli MHC DRB na częstość występowania i intensywność zarażenia *Haemobartonella* w części badanych populacji.** Wynik ten potwierdza hipotezę, że **interakcje pasożyt-gospodarz mogą być różne w zależności od warunków środowiskowych, co stanowi ważny element kształtowania się zmienności MHC w skali przestrzennej.** Dodatkowo, w opisywanej pracy wykazaliśmy odchylenia od równowagi Hardy'ego-Weinberga w kilku populacjach w locus MHC, podczas gdy loci mikrosatelitarne pozostawały w równowadze, co sugeruje wpływ działania doboru na region MHC. Badania te potwierdziły, że badane locus MHC jest pod wpływem doboru kształtowanego przez pasożyty, co z kolei dowodzi znaczenia kompleksu MHC w utrzymaniu kondycji zagrożonych populacji.

Temat wpływu związku pasożyt-gospodarz na kształtowanie się zmienności głównego kompleksu zmienności tkankowej w małych, izolowanych populacjach podjęłam raz jeszcze, w badaniach prowadzonych z dr Agnieszką Kloch, gdzie skupiliśmy się na zbadaniu zmian w poziomie zapasożycenia i zmienności MHC oraz związków zachodzących między nimi w skali czasowej, a więc zależności istotnych dla potwierdzenia roli doboru fluktuacyjnego w kształtowaniu zmienności badanego regionu (**Biedrzycka i Kloch 2016, *Infection, Genetics and Evolution***). Mimo, że założenia teoretyczne przewidują kształtowanie się zmienności

genów MHC poprzez dynamikę interakcji pomiędzy populacją gospodarza, w której osobniki posiadają allele odporności czy podatności na konkretne infekcje a populacjami pasożytów wywierających na nie presję w danej chwili (Spurgin i Richardson, 2010), to badania wykazujące zmiany frekwencji alleli MHC w czasie są nieliczne. Badania takie, poza koniecznością wykonania ich w długiej skali czasowej, są utrudnione poprzez istnienie, zwykle niemożliwych do kontrolowania, migracji w naturalnych populacjach. W opisywanej pracy badania zostały przeprowadzone w całkowicie izolowanej populacji susła perełkowanego, w której utrzymywała się stała liczebność w okresie prowadzenia badań, dlatego możliwe było zaobserwowanie kształtowania się związków pomiędzy allelami MHC a specyficznymi infekcjami pasożytniczymi. Badania objęły 3 pokolenia susła perełkowanego, a poziom zapasożycenia pasożytami krwi z grupy *Babesia* i pasożytami przewodu pokarmowego (*Capillaria* i *Coccidia*) oraz poziom zmienności locus MHC DRB i loci mikrosatelitarnych został zbadany w roku 2011 i 2014. Ocena zmienności locus MHC została przeprowadzona przy pomocy sekwencjonowania amplikonów w technologii Solexa Illumina co pozwoliło na uzyskanie bardzo wysokiej dokładności genotypowania. Przeprowadzone badania wykazały istotny wzrost częstości występowania i intensywności zarażenia pasożytami przewodu pokarmowego pomiędzy pierwszym i drugim próbkowaniem populacji. Jednocześnie, w roku 2014, **udało się wykazać, nie istniejące wcześniej, związki pomiędzy allelami MHC DRB a częstością występowania (*Babesia*) oraz intensywnością infekcji (*Capillaria*).** Uzyskane wyniki udowadniają, **że w zamkniętej populacji, w tak krótkim czasie mogą wytworzyć się związki pomiędzy specyficznymi patogenami i allelami MHC oraz dowodzą znaczenia selekcji fluktuacyjnej w kształtowaniu się zmienności MHC.**

Badania nad stosunkowo prostym systemem jakim jest MHC ssaków, a w szczególności niezduplikowane locus MHC DRB susła perełkowanego postanowiłam rozszerzyć o układ wielokrotnie bardziej skomplikowany. Badania przeprowadziłam w ramach projektu POMOST pt.: *“Discovering the role of pathogen mediated selection and mate choice in MHC evolution in the natural population. An example of extensively studied sedge warbler population”* przyznanego mi przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej, we współpracy z dr Heleną Westerdahl z Uniwersytetu w Lund w Szwecji i z prof. Jackiem Radwanem z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Ptaki z rzędu wróblowych charakteryzują się wyjątkowo skomplikowanym systemem MHC, zarówno klasy pierwszej jak i drugiej. Region ten u wróblowych posiada wyjątkowo wysoki poziom polimorfizmu, długie introny i liczne pseudogeny (Westerdahl, 2007). Wielokrotna duplikacja i

homogenizacja, jaka zachodzi między allelami uniemożliwia dopasowanie alleli do konkretnych loci, a co za tym idzie, zwykle niemożliwe jest takie zaprojektowanie eksperymentu, aby możliwe było badanie zmienności poszczególnych loci osobno. Do niedawna dokładne i wiarygodne określenie całego spektrum zmienności MHC w takich sytuacjach było technicznie wyjątkowo trudne, a często niemożliwe (Sommer i in., 2013). Zastosowanie wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji, które pozwala na jednoczesne sekwencjonowanie dowolnej liczby wariantów danego genu, od oceny zmienności MHC klasy I i II u niemodelowych organizmów, wykazujących bardzo wysoki polimorfizm i często jednoczesne silne zróżnicowanie liczby kopii w obrębie gatunku stało się rozwiązaniem dla tego typu problemów (Babik, 2010). W opisywanych badaniach zastosowałam metodę sekwencjonowania ampikonów przy użyciu platformy Illumina MiSeq oraz opracowaną wcześniej w podobnym zespole metodę genotypowania (Biedrzycka i in., 2017b) do oszacowania zmienności i dokładnej charakteryzacji 3 exonu MHC klasy I u rokitniczki (**Biedrzycka i in. 2017, *BMC Evolutionary Biology***). W tym celu wykorzystałam 863 próbki zebrane w latach 2004-2011 w populacji rokitniczki występującej na terenie rozlewisk środkowej Nidy. Przy pomocy opublikowanych wcześniej primerów PCR oszacowałam zmienność 2, 3 i 4 exonu MHC klasy I w komplementarnym DNA (cDNA) u kilku osobników i zaprojektowałam specyficzne dla gatunku primery w celu oszacowania zmienności wszystkich badanych osobników w trzecim exonie, który charakteryzuje się najwyższym poziomem zmienności funkcjonalnej. Uzyskane wyniki dowiodły, że rokitniczka posiada najwyższy do tej pory zbadany poziom zmienności MHC klasy pierwszej. **Wśród analizowanych osobników wykryłam 3566 alleli 3 exonu MHC klasy I, a liczba alleli występująca u osobnika wahała się od 12 do 65, co jest najwyższą do tej pory opisaną u wróblowych liczbą alleli i dowodzi wysokiej zmienności liczby kopii badanego regionu.** Opisywane allele występowały w trzech różnych długościach (allele o pełnej długości, allele z delecją 3 par zasad i allele z delecją 6pz). **Przeprowadzone testy badające działanie selekcji oraz zróżnicowanie, dywergencję i rozkład częstości alleli każdej z trzech grup wykazały, że allele różnej długości różnią się również pod kątem pełnionej funkcji. Allele pełnej długości i allele z delecją 6pz prawdopodobnie kodują klasyczne geny MHC, podczas gdy allele z delecją 3pz należą do nieklasycznych i mają inną funkcję.** Mimo, że coraz więcej prac opisuje wyjątkowo wysoki poziom zmienności MHC wróblowych, ciągle brakuje gruntownego wyjaśnienia tego zjawiska. Badania wskazują, że genom ptaków śpiewających może podlegać szybszej ewolucji, a geny MHC silniejszej selekcji adaptacyjnej. Jest to prawdopodobnie związane z ich małymi rozmiarami ciała, szybką wymianą pokoleń,

oraz zajmowaniem bardzo zróżnicowanych siedlisk, co z kolei zwiększa presję pasożytniczą. Nasze badania wskazują, że tak wysoki polimorfizm jaki charakteryzuje MHC ptaków wróblowych ma związek z przejmowaniem przez część alleli nowych funkcji. Mimo, że zmienność MHC rozmaitych gatunków ptaków, również wróblowych, jest obecnie bardzo popularnym tematem badań, to moje badania, jako jedne z nielicznych, podejmują próbę odpowiedzi na pytanie o rzeczywistą rolę utrzymywania się tak wysokiego poziomu zmienności u tej grupy ptaków. Co więcej, wykorzystanie danych wieloletnich umożliwiło nam zaobserwowanie zmiany frekwencji supertypów (grup alleli o podobnym znaczeniu funkcjonalnym) MHC w czasie i dało podstawę do wnioskowania na temat roli pasożytów w kształtowaniu się zmienności tego skomplikowanego systemu.

W chwili obecnej przygotowuję do publikacji wyniki badań wskazujących na wpływ pasożytów malarycznych na zmianę częstości supertypów MHC klasy I u rokitniczki. Przeprowadzenie takich badań wymagało zastosowania precyzyjnej i powtarzalnej metody szacowania częstości i intensywności infekcji pasożytniczych. Tradycyjne podejście zakłada mikroskopową ocenę poziomu zapasożycenia, idealnie wykonywaną przez jednego, wykwalifikowanego badacza. Ograniczeniem jest więc poziom doświadczenia osoby wykonującej analizy, ale problematyczne jest również prawidłowe szacowanie częstości zarażenia w przypadku najczęściej występujących infekcji chronicznych, kiedy liczba gametocytów pasożyta w rozmazie krwi jest bardzo niska. Dodatkowo, metoda mikroskopowa z reguły nie pozwala na rozróżnianie szczepów a nawet gatunków poszczególnych pasożytów. Zastosowanie metod molekularnych pozwala na wyeliminowanie wspomnianych problemów. Co więcej, coraz częściej sugeruje się, że tzw. infekcje mieszane, czyli wywoływane przez więcej niż jedną linię genetyczną pasożyta danego gatunku mają szczególny wpływ zarówno na kondycję osobników i funkcjonowanie populacji (Davidar i in., 2006; Marzal i in., 2008), jak i na kształtowanie się zmienności MHC (Biedrzycka i in., 2017a). Dodatkowym ważnym, a często pomijanym w badaniach aspektem, jest wpływ intensywności infekcji na funkcjonowanie populacji czy kształtowanie się zmienności genetycznej. Do tej pory zdecydowana większość prac skupiała się jedynie na badaniu wpływu częstości infekcji na cechy związane z dostosowaniem (Marzal i in., 2008). W opisywanej pracy opracowałam protokół, który umożliwia jakościowe i ilościowe oznaczenie dwóch najpopularniejszych szczepów pasożytów malarycznych występujących w badanej wcześniej populacji rokitniczki (**Biedrzycka i in. 2015, *Journal of Ornithology***). W pierwszym etapie, przy pomocy metody zagnieżdżonego PCR (nestedPCR, Waldenström i in., 2004) został określony skład pasożytów z grupy tzw. ptasiej malarii (*Plasmodium*,

Haemoproteus i *Leucocytozoon*) w populacji rokitniczki, z dokładnością do poszczególnych linii. Ponieważ 93% wszystkich infekcji występujących w populacji było wywołanych zarażeniem dwoma szczepami *Haemoproteus* (SW1 i/lub SW3), został opracowany szczegółowy protokół, który posłużył do ilościowego określenia intensywności zarażenia tymi dwoma liniami z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). **Główną zaletą opracowanej metody jest możliwość rozróżnienia obu linii, co jest poza zasięgiem oznaczenia mikroskopowego. Co więcej, pozwala ona na wykrycie pięciokrotnie wyższego poziomu infekcji mieszanych występujących w populacji w porównaniu z zastosowaną wcześniej metodą zagnieżdżonego PCR.** Oznaczenie dotyczy patogenów infekujących wiele gatunków ptaków z rzędu wróblowych, a związek pomiędzy infekcjami wywoływanymi przez pasożyty malaryczne i zmiennością genów MHC został wykazany w szeregu prac (przegląd w Spurgin i Richardson, 2010). Co więcej, coraz częściej wykazywane jest znaczenie wpływu infekcji mieszanych na dostosowanie osobników. Dlatego opisana metoda daje precyzyjny warsztat umożliwiający badanie kształtowania się zmienności MHC i innych genów immunologicznych w dzikich populacjach ptaków.

Podsumowując, prace badawcze, które zaliczam w skład mojego osiągnięcia naukowego wnoszą znaczący wkład w poznanie struktury genów głównego kompleksu zmienności tkankowej i kształtowania się jego zmienności w wyniku działania presji ze strony patogenów oraz proponują warsztat metodyczny, który umożliwia badania nad szczegółowymi aspektami tych zagadnień. Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- Zbadanie interakcji między dryfem genetycznym i dobozem naturalnym i ich roli w kształtowaniu się zmienności MHC w małych, izolowanych populacjach.
- Udowodnienie roli selekcji fluktuacyjnej działającej w czasie i przestrzeni w utrzymywaniu polimorfizmu MHC.
- Opisanie i próba wyjaśnienia zmienności MHC klasy I u rokitniczki, gatunku ptaków wróblowych charakteryzującym się najwyższym poziomem zmienności tego regionu wśród do tej pory opisanych oraz zaproponowanie mechanizmów wyjaśniających bardzo wysokie zróżnicowanie poziomu zmienności MHC w obrębie tego gatunku.
- Opracowanie czulej, powtarzalnej i charakteryzującej się wysoką rozdzielczością metody ilościowego oznaczania specyficznych linii pasożytów malarycznych, która umożliwia badanie wpływu infekcji mieszanych na kształtowanie się zmienności MHC.

Pozostałe publikacje, nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Moje zainteresowania czynnikami wpływającymi na kształtowanie się zmienności w populacjach zagrożonych gatunków zaowocowały również powstaniem pracy przeglądowej. Przewidywania teoretyczne mówią, że utrata zmienności w genach odpowiedzialnych za odporność przeciw patogenom sprzyja rozwojowi infekcji, natomiast właśnie patogeny są jednym z głównych czynników mających wpływ na wymieranie populacji (Smith i in., 2009). Coraz lepsze poznanie zmienności MHC, również u dziko żyjących gatunków, a co za tym idzie stosunkowa łatwość stosowania MHC jako genetycznego markera w badaniu zmienności adaptacyjnej sprawiło, że geny te stały się podstawowym narzędziem stosowanym w badaniu zagrożonych populacji (Hughes, 1991). Jednak liczba prac jednoznacznie potwierdzająca związek między zmiennością MHC, a rzeczywistą kondycją populacji jest niewielka. Dlatego moja kolejna praca, przygotowana we współpracy z prof. Jackiem Radwanem i prof. Wiesławem Babikiem miała formę przeglądu, w którym analizowaliśmy wyniki prac badających związek zmienności MHC i infekcji na poziomie populacji. Naszym celem była odpowiedź na pytanie czy dryf, mający wpływ na obniżenie zmienności genetycznej w małych populacjach, niweluje działanie doboru na loci MHC, a więc redukuje również ich zmienność, oraz czy ograniczenie zmienności MHC wpływa na wzrost częstości występowania infekcji w populacji i wzrost prawdopodobieństwa jej ekstynkcji (**Radwan i in. 2010, *Biological Conservation*, praca nr 11**). **W pracy wykazaliśmy, że mimo widocznego historycznego wpływu selekcji balansującej na zmienność MHC, w przeważającej większości, to właśnie czynniki demograficzne są odpowiedzialne za poziom zmienności genetycznej w populacjach.** Zwróciliśmy uwagę, że odpowiedź na pytanie, czy w populacjach, które przeszły niedawne załamanie liczebności lub wykazują istotny stopień izolacji i fragmentacji, rzeczywiście zwiększone jest prawdopodobieństwo ekstynkcji związane z obniżoną zmiennością MHC, wymaga analizy tej zmienności w powiązaniu z presją patogenów. W pracy tej podkreśliliśmy również znaczenie badania poziomu heterozygotyczności całego genomu, nie tylko samego regionu MHC oraz przedyskutowaliśmy kryterium ochrony zmienności MHC w programach hodowli zagrożonych gatunków w niewoli. Biorąc pod uwagę niepewność znaczenia zmienności MHC dla kondycji zagrożonych populacji, ważniejszym wydaje się przeciwdziałanie kojarzeniu wsobnemu, a tym samym utrzymanie jak najwyższej ogólnej zmienności genomu. Praca ta stała się niezwykle ważna dla badaczy zajmujących się znaczeniem zmienności MHC

w ochronie zagrożonych gatunków, na co wskazuje wysoki indeks cytowań (118) uzyskany w ciągu ostatnich lat.

Niezależnie od badań przedstawionych w cyklu tematycznym osiągnięcia naukowego moje zainteresowania skupiały się wokół zastosowania metod molekularnych w rozwiązywaniu problemów związanych z ochroną populacji ssaków. W dużej mierze dotyczą one: rozpoznawania zmienności genetycznej i planowania ochrony zagrożonych gatunków, badania działania doboru naturalnego w małych, izolowanych populacjach, a także badania wpływu gatunków inwazyjnych na gatunki rodzime pod kątem zmienności genetycznej.

Hybrydyzacja i introgresja genomu obcych gatunków introdukowanych poza ich naturalny zasięg występowania jest jednym z podstawowych zagrożeń dla gatunków rodzimych (Arnold, 2004). Przekazywanie genów między gatunkami, które nie miały wcześniej ze sobą kontaktu i utrzymywanie się mieszańców w populacji poprzez tworzenie płodnych hybryd i krzyżówki wsteczne może doprowadzić do całkowitej utraty rodzimej puli genowej (Huxel, 1999). Badania dotyczące hybrydyzacji i introgresji między rodzimym gatunkiem jelenia szlachetnego, a introdukowanym jeleniem sika przeprowadziłam w pięciu różnych regionach w Polsce, na Litwie i w Obwodzie Kaliningradzkim, gdzie gatunki te mają ze sobą kontakt (**Biedrzycka i in. 2012, *Journal of Mammalogy*, praca nr 9**). Jeleń sika jest gatunkiem obcym, uznanym za jeden z najbardziej inwazyjnych w Europie, którego obecność stanowi poważne zagrożenie dla gatunków rodzimych. Jednym z głównych zagrożeń jest prawdopodobieństwo introgresji genów jelenia sika do puli genowej jelenia szlachetnego. Mimo, że zjawisko hybrydyzacji i introgresji będące wynikiem kontaktu między tymi dwoma gatunkami zostało wykazane w kilku populacjach na Wyspach Brytyjskich (Senn i Pemberton, 2009), a występowania krzyżówek dowiedziono w populacjach hodowlanych, brak było dowodów na występowanie tego procesu w populacjach w Europie wschodniej i środkowej. Co więcej, opinia środowiska myśliwskiego silnie negowała jego występowanie. **Badana zestawu diagnostycznych (różniących się zakresem długości alleli w zależności od gatunku) loci mikrosatelitarnych oraz regionu kontrolnego DNA mitochondrialnego dowiodły intensywnej hybrydyzacji we wszystkich badanych populacjach, a poziom introgresji okazał się wyższy niż wcześniej wykazany w Irlandii i Wielkiej Brytanii.** Dodatkowo, analizy haplotypów mitochondrialnych dowiodły, że wschodnioeuropejskie populacje jelenia sika zostały założone w wyniku co najmniej dwóch niezależnych introdukcji, w ramach których niezależnie wprowadzone zostały osobniki pochodzące z południowej Japonii i z wschodnich Chin.

Tematyka dotycząca sukcesu gatunków inwazyjnych w nowym środowisku jest niezwykle interesująca, jednocześnie ciągle nie jest jasne, jakie warunki muszą być spełnione, aby wprowadzona do nowego siedliska niewielka liczba osobników rozprzestrzeniła się szybko i na szerokim obszarze, co doprowadzi do skutecznej inwazji. Niewątpliwie rolę odgrywa tutaj sam moment założenia populacji, liczba osobników i liczba poszczególnych introdukcji (Lockwood i in., 2009). Wprowadzenie osobników pochodzących ze zróżnicowanych genetycznie źródeł może doprowadzić do zwiększenia zmienności genetycznej i potencjału adaptacyjnego w stosunku do populacji rodzimej, co z kolei może się przełożyć na szczególny sukces gatunku w nowym środowisku i zwiększenie jego inwazyjności (Dlugosch i Parker, 2008). Zmienność genetyczna gatunku w czasie inwazji jest sumą działania intensywnego przepływu genów, do jakiego dochodzi w czasie rozprzestrzeniania się gatunku obcego w nowym środowisku, co prowadzi do ujednoczenia struktury genetycznej oraz lokalnego działania dryfu i powstawania adaptacji, a w konsekwencji wytworzenia silnej struktury genetycznej. W pracy (**Biedrzycka i in. 2014, *Biological Invasions, praca nr 6***) scharakteryzowałam strukturę genetyczną i szlaki inwazji populacji szopa pracza na terenie środkowej Europy. Gatunek ten jest bardzo inwazyjny. Początkowo został wprowadzony na teren Niemiec i obecnie jest w fazie bardzo silnej ekspansji. Niska zmienność haplotypów mitochondrialnych wskazuje na silną redukcję zmienności genetycznej w wyniku introdukcji ograniczonej liczby osobników. Jednocześnie wykazaliśmy istnienie dwóch niezależnych szlaków inwazji szopa pracza na teren Polski. Jeden z nich wiedzie ze wschodnich Niemiec na tereny zachodniej Polski, a drugi z Niemiec południowych, przez Czechy do Polski południowej. Analizy loci mikrosatelitarnych dowiodły silnego zróżnicowania między populacjami szopa z różnych regionów i prawdopodobnego istnienia w południowej Polsce strefy kontaktu między osobnikami pochodzącymi z dwóch różnych szlaków inwazji. Jednocześnie, zmienność markerów mikrosatelitarnych, w porównaniu z tą z naturalnego zasięgu gatunku, została w dużej mierze zachowana, co wskazuje na potencjał adaptacyjny inwazyjnych populacji. Niezwykle ciekawym wynikiem okazało się wykrycie silnego zróżnicowania międzypopulacyjnego pomiędzy osobnikami zamieszkującymi Park Narodowy Ujście Warty, a tymi zamieszkującymi tereny poza Parkiem, mimo niewielkiej dzielącej je odległości i braku barier przestrzennych. Populacje te różnią się pod względem zajmowanego siedliska, a analiza kierunku i intensywności migracji sugeruje istnienie dynamiki typu źródło-ujście. Nasze badania wskazują, że intensywność inwazji szopa pracza, jaką obecnie obserwujemy może wynikać ze stosunkowo wysokiego poziomu zmienności genetycznej, który daje możliwość

dostosowania do lokalnych warunków. Jednocześnie opracowaliśmy wskazówki do zarządzania populacjami szopa w sposób, który umożliwi ograniczenie stopnia inwazji. Badania te dały podstawy do przygotowania projektu, na którego finansowanie uzyskałam fundusze w ramach projektu OPUS finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt.: „Czasowa i przestrzenna zmienność genów związanych z odpornością i presja pasożytów w inwazyjnej populacji szopa pracza *Procyon lotor*”. Celem projektu jest zbadanie zależności jakie kształtują związek między zmiennością genów wpływających na inicjowanie i utrzymanie odpowiedzi immunologicznej (MHC klasy II, geny kodujące cytokiny, interleukiny, receptory toll-podobne) i patogenami występującymi w populacji szopa pracza w centralnej Europie a sukcesem inwazji tego gatunku. Szczególne znaczenie ma tutaj porównanie wzorców zmienności populacji będących w centrum inwazji i na jej czele oraz z populacjami z naturalnego zasięgu gatunku.

Innym zagadnieniem, jakie podjęłam w swoich badaniach były genetyczne skutki ekspansji bobra na terenie Polski (**Biedrzycka i in. 2014, *Mammalian Biology*, praca nr 7**). Spektakularny wzrost liczebności tego gatunku, jaki nastąpił po okresie bardzo silnego załamania jego liczebności w całym zasięgu występowania jest jednym z nielicznych przykładów ogromnego sukcesu reintrodukcji zagrożonego gatunku. Wcześniejsze badania wykazały, że wśród obecnie występujących populacji bobra można wyróżnić dwie (wschodnią i zachodnią) odrębne jednostki o znaczeniu ewolucyjnym, a więc takie, które zachowały odrębny potencjał ewolucyjny i pochodzą prawdopodobnie z odrębnych refugium glacialnych. Ich historyczny podział mógł przebiegać przez terytorium Polski, natomiast nie ma danych potwierdzających przynależności polskich populacji do którejkolwiek z linii. Informacje dotyczące reintrodukcji bobra na terenie całego kraju, wykonywanych przy użyciu osobników pochodzących z Litwy, Białorusi i zachodniej Rosji sugerują ich pochodzenie ze wschodniej linii. Nasze badania przeprowadzone przy użyciu markerów mikrosatelitarnych i mitochondrialnego wykazały, że obecnie występujące w Polsce populacje bobra charakteryzują się wysokim poziomem zmienności genetycznej mimo wcześniejszego załamania liczebności. Wynik ten jest dość zaskakujący, szczególnie że badania zmienności MHC tych samych populacji wykazały bardzo ograniczoną zmienność (Durka i in., 2005). Wyniki te wskazują na odbudowanie zmienności genetycznej na skutek mieszania osobników z różnych populacji reliktowych. Co więcej, analizy haplotypów mitochondrialnych wykazały obecność na terenie Polski osobników zarówno z wschodniej, jak i zachodniej linii. Świadczy to niewątpliwie o intensywnej migracji bobrów z populacji niemieckich na teren Polski. Interesujące, że w zachodniej części Polski uzyskaliśmy jedynie haplotypy zachodnie, mimo

intensywnej reintrodukcji osobników pochodzących z zachodniej granicy również na te tereny, co wskazuje na przeważający wpływ migracji z zachodu na kształtowanie się obecnej struktury genetycznej, silniejszy niż wpływ reintrodukcji. Nasze badania wskazują na brak depresji outbredowej mimo mieszania się osobników należących do różnych jednostek o znaczeniu ewolucyjnym, co więcej, sugerują, że to właśnie wysoki poziom zmienności genetycznej, jaki się dzięki temu wytworzył jest jedną z przyczyn obecnie obserwowanej ekspansji bobra na terenie Europy.

W kolejnej pracy (**Bielecki i in. 2017, *Journal of Avian Biology*, praca nr 3**) wykorzystaliśmy opracowaną przeze mnie wcześniej metodę ilościowego oszacowania intensywności infekcji dwóch różnych linii pasożytów krwi z gatunku *Haemoproteus* i określiliśmy ich wpływ na długość życia samców rokitniczki. Użyliśmy danych dotyczących przeżywalności samców w kolejnych dziewięciu latach. Intensywna śmiertelność osobników będących w drugim roku życia i istotnie niższy poziom infekcji wywołanych przez obie badane linie pasożytów u osobników, które dożyły do następnego roku wskazują, że intensywność infekcji jest zależnym od wieku wskaźnikiem przeżywalności osobników.

W ramach działalności naukowej opublikowałam również artykuły metodyczne. W pracy **Biedrzycka i in. (2013, *Parasitology*, praca nr 8)** udało mi się zweryfikować status gatunkowy jednego z pasożytów krwi rokitniczki. Analizy mikroskopowe rozmazów krwi osobników z badanej przez nas populacji wykazały obecność pasożytów z gatunku *Hepatozoon* należącego do typu *Apikompleksa* zidentyfikowanych wcześniej (Kruszewicz i Dyrz, 2000) jako *Hepatozoon kabeeni*. Przeprowadzone przez nas analizy filogenetyczne fragmentu jednostki 18S rybosomalnego DNA (rDNA) wykazały, że w rzeczywistości opisywany patogen należy do gatunku *Lankestrella*. Nasze wyniki wpisują się w trwającą obecnie dyskusję dotyczącą problemów z morfologiczną identyfikacją gatunków w obrębie Apicompleksa i koniecznością zastosowania do tego celu markerów molekularnych.

Moje badania zmienności genetycznej MHC klasy I u rokitniczki, które stanowi najbardziej zmienny wśród ptaków wróblowych system stały się motorem do przeprowadzenia weryfikacji metod służących do rozróżnienia pomiędzy prawdziwymi allelami a artefaktami, które powstają w czasie sekwencjonowania z powodu stosunkowo wysokiej częstości generowanych błędów (insercji, delecji i substytucji oraz tzw. chimer powstających z połączenia dwóch prawdziwych wariantów; **Biedrzycka i in. 2017, *Molecular Ecology Resources*, praca nr 2**). Ponieważ zastosowanie sekwencjonowania następnej generacji do oceny zmienności MHC jest ciągle podejściem relatywnie nowym, w krótkim czasie powstało kilka równoległych metod służących do odróżnienia i eliminacji

błędów sekwencjonowania (Lighten i in., 2014; Radwan i in., 2012; Sebastian i in., 2016; Sommer i in., 2013). Każda z metod przyjmuje założenie, że artefakty będą pojawiać się w uzyskanych danych ze zdecydowanie mniejszą frekwencją niż prawdziwe allele, natomiast różnią się pod względem zastosowanych metod klasyfikacji czy filtrowania wykrytych wariantów. Wiadomo również, że wiarygodne zgenotypowanie systemu charakteryzującego się wysoką zmiennością wymaga zastosowania bardzo wysokiego pokrycia sekwencjonowania, co w praktyce oznacza częstość z jaką konkretny wariant pojawił się w otrzymanych danych. Pojawienie się kilku równoległych podejść doprowadziło do braku zgodności między naukowcami co do metody, która oferuje najlepszy schemat pozwalający na uzyskanie nie obciążonego błędem genotypu składającego się z wielu alleli. Aby zweryfikować skuteczność i powtarzalność każdej z tych metod wykonaliśmy dwukrotne sekwencjonowanie trzeciego exonu MHC klasy I przy użyciu tzw. ultragłębokiego sekwencjonowania (dającego bardzo wysoką liczbę odczytów danego wariantu) w technologii Illumina w 24 próbkach pochodzących od rokitniczki, gatunku należącego do wróblowych, a więc posiadającego system MHC o bardzo wysokim stopniu skomplikowania. Następnie przeprowadziliśmy genotypowanie przy pomocy czterech opisanych wyżej metod. Co ważne, żadna z opisywanych metod nie była wcześniej testowana na tak skomplikowanym systemie. **Udowodniliśmy, że nawet w przypadku wieloallelicznych genotypów, gdzie liczba alleli występujących u jednego osobnika przekracza 40, zastosowanie pokrycia przekraczającego 5 tys. odczytów na amplicon pozwala na uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych genotypów. Dowiedliśmy również, że mimo różnych zasad postępowania przy grupowaniu alleli i usuwania artefaktów stosowanych w opisywanych metodach występuje między nimi wysoka zgodność. Ponadto wskazaliśmy słabości poszczególnych metod oraz wytypowaliśmy metodę opublikowaną w pracy Sebastian i in. (2016) jako najbardziej efektywną.** Uzyskane przez nas wyniki mają kluczowe znaczenie dla badaczy stosujących metodę genotypowania przez sekwencjonowanie w ocenie zmienności wielokrotnie zduplikowanych loci. Do tej pory metodyka stosowana w genotypowaniu takich systemów rozwijała się niezwykle szybko, a nowe metody często nie były wystarczająco weryfikowane.

Plany na przyszłość

W najbliższym czasie chcę kontynuować badania dotyczące wpływu infekcji pasożytniczych na kształtowanie się zmienności genów immunologicznych w inwazyjnej populacji szopa pracza; badania te wykonuję w ramach przyznanego mi przez Narodowe Centrum Nauki grantu OPUS. W przyszłości chciałabym skupić się na badaniach, które przyczynią się do lepszego poznania znaczenia infekcji jako jednego z głównych czynników będącym motorem zmian ewolucyjnych w naturalnych populacjach. W związku z niezwykle szybkim rozwojem metod masowego sekwencjonowania i metod bioinformatycznych, które dają możliwość analizowania wybranych regionów genomu również u niemodelowych gatunków ta gałąź badań ewolucyjnych uległa obecnie ogromnemu przyspieszeniu. Dlatego planuję również rozwinąć swój warsztat analityczny, który pozwoli mi na lepsze niż do tej pory wykorzystanie danych genomowych.

Referencje:

- Arnold, M.L., 2004. Natural hybridization and the evolution of domesticated, pest and disease organisms. *Mol. Ecol.* 13, 997–1007. doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02145.x
- Babik, W., 2010. Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 237–251. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02788.x
- Bernatchez, L., Landry, C., 2003. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *J. Evol. Biol.* 16, 363–377.
- Biedrzycka, A., Konopiński, M.K., 2008. Genetic variability and the effect of habitat fragmentation in spotted suslik *Spermophilus suslicus* populations from two different regions. *Conserv. Genet.* 9, 1211–1221.
- Biedrzycka, A., O'Connor, E., Sebastian, A., Migalska, M., Radwan, J., Zając, T., Bielański, W., Solarz, W., Ćmiel, A., Westerdahl, H., 2017a. Extreme MHC class I diversity in the sedge warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*); selection patterns and allelic divergence suggest that different genes have different functions. *BMC Evol. Biol.* 17, 159. doi:10.1186/s12862-017-0997-9
- Biedrzycka, A., Radwan, J., 2008. Population fragmentation and major histocompatibility complex variation in the spotted suslik, *Spermophilus suslicus*. *Mol. Ecol.* 17, 4801–4811.
- Biedrzycka, A., Sebastian, A., Migalska, M., Westerdahl, H., Radwan, J., 2017b. Testing genotyping strategies for ultra- deep sequencing of a co- amplifying gene family: MHC class I in a passerine bird. *Mol. Ecol. Resour.* 17, 642–655. doi:10.1111/1755-0998.12612
- Borghans, J.A.M., Beltman, J.B., De Boer, R.J., 2004. MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics* 55, 732–739. doi:10.1007/s00251-003-0630-5
- Davidar, P., Morton, E.S., Brittingham, M., 2006. Are multiple infections more severe for purple martins (*progne subis*) than single infections? *The Auk* 123, 141–147. doi:10.1642/0004-8038(2006)123[0141:AMIMSF]2.0.CO;2

- Dlugosch, K.M., Parker, I.M., 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol. Ecol.* 17, 431–449. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03538.x
- Doherty, P.C., Zinkernagel, R.M., 1975. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature* 256, 50–52. doi:10.1038/256050a0
- Durka, W., Babik, W., Ducroz, J.-F., Heidecke, D., Rosell, F., Samjaa, R., Saveljev, A.P., Stubbe, A., Ulevicius, A., Stubbe, M., 2005. Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber* L. *Mol. Ecol.* 14, 3843–3856. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02704.x
- Ejmond, M.J., Radwan, J., 2011. MHC diversity in bottlenecked populations: a simulation model. *Conserv. Genet.* 12, 129–137. doi:10.1007/s10592-009-9998-6
- Gondek, A., Verduijn, M., Wolff, K., 2006. Polymorphic microsatellite markers for endangered spotted suslik, *Spermophilus suslicus*. *Mol. Ecol. Notes* 6, 359–361.
- Hedrick, P.W., 2002. Pathogen resistance and genetic variation at MHC loci. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 56, 1902–1908.
- Hill, A.V.S., 1998. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 593–617. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.593
- Hughes, A.L., 1991. MHC Polymorphism and the Design of Captive Breeding Programs. *Conserv. Biol.* 5, 249–251. doi:10.1111/j.1523-1739.1991.tb00130.x
- Huxel, G.R., 1999. Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biol. Conserv.* 89, 143–152. doi:10.1016/S0006-3207(98)00153-0
- Kelley, J., Walter, L., Trowsdale, J., 2005. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* 56, 683–695. doi:10.1007/s00251-004-0717-7
- Kruszewicz, A.G., Dyrz, A., 2000. Hepatozoon kabeenin. sp. (Protozoa: Apicomplexa; Hemogregarina) from the sedge warbler, *Acrocephalus schoenobaenus* (Aves: Passeriformes). *Wiad. Parazytol.* 46, 507–510.
- Lighten, J., van Oosterhout, C., Paterson, I.G., McMullan, M., Bentzen, P., 2014. Ultra-deep Illumina sequencing accurately identifies MHC class IIb alleles and provides evidence for copy number variation in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Mol. Ecol. Resour.* 14, 753–767. doi:10.1111/1755-0998.12225
- Lockwood, J.L., Cassey, P., Blackburn, T.M., 2009. The more you introduce the more you get: the role of colonization pressure and propagule pressure in invasion ecology. *Divers. Distrib.* 15, 904–910. doi:10.1111/j.1472-4642.2009.00594.x
- Marzal, A., Bensch, S., Reviriego, M., Balbontin, J., De Lope, F., 2008. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *J. Evol. Biol.* 21, 979–987. doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01545.x
- Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M., 2007. *Janeway's Immunobiology*, 7 edition. ed. Garland Science, New York.
- Radwan, J., Zagalska-Neubauer, M., Cichoń, M., Sendecka, J., Kulma, K., Gustafsson, L., Babik, W., 2012. MHC diversity, malaria and lifetime reproductive success in collared flycatchers. *Mol. Ecol.* 21, 2469–2479. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05547.x
- Sebastian, A., Herdegen, M., Migalska, M., Radwan, J., 2016. AMPLISAS: a web server for multilocus genotyping using next-generation amplicon sequencing data. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 498–510. doi:10.1111/1755-0998.12453
- Senn, H.V., Pemberton, J.M., 2009. Variable extent of hybridization between invasive sika (*Cervus nippon*) and native red deer (*C. elaphus*) in a small geographical area. *Mol. Ecol.* 18, 862–876. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.04051.x
- Smith, K.F., Acevedo-Whitehouse, K., Pedersen, A.B., 2009. The role of infectious diseases in biological conservation. *Anim. Conserv.* 12, 1–12. doi:10.1111/j.1469-1795.2008.00228.x

- Sommer, S., Courtiol, A., Mazzoni, C.J., 2013. MHC genotyping of non-model organisms using next-generation sequencing: a new methodology to deal with artefacts and allelic dropout. *BMC Genomics* 14, 542. doi:10.1186/1471-2164-14-542
- Spurgin, L.G., Richardson, D.S., 2010. How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277, 979–988. doi:10.1098/rspb.2009.2084
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D., Ostman, O., 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *J. Parasitol.* 90, 191–194. doi:10.1645/GE-3221RN
- Westerdahl, H., 2007. Passerine MHC: genetic variation and disease resistance in the wild. *J. Ornithol.* 148, 469–477. doi:10.1007/s10336-007-0230-5

J. Biedrzycki