



UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
Instytut Biologii
Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
Tel.: 085 738 83 80

Prof. dr hab. Mirosław Ratkiewicz prof. UwB
e-mail: ermi@uwb.edu.pl

Białystok, 08.06. 2015r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Agaty Lis

pt. "Specjacja i struktura genetyczna populacji *Philaenus spumarius* (Hemiptera)
w strefie kontaktu głównych linii filogenetycznych"

wykonanej w Instytucie Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN w Krakowie pod kierunkiem
dr hab. Łukasza Kajtocha

Ocena ogólna

Przedstawiona do recenzji rozprawa została wykonana w formie dwóch opublikowanych prac anglojęzycznych w czasopismach posiadających *impact factor* (J. Insect Sci. 14 (1). 219 oraz Microb. Ecol. DOI: 10.1007/s00248-015-0570-2.), które opatrzone zostały polskojęzycznym wprowadzeniem oraz streszczeniem w jęz. polskim i angielskim. Badania dotyczyły interesującej z punktu widzenia biologii ewolucyjnej sytuacji, gdy dwie zróżnicowane genetycznie linie ewolucyjne tego samego gatunku tworzą strefę kontaktu, w której powstają osobniki mieszańcowe. Stan taki może być doskonałą okazją do badania mechanizmów izolacji postzygotycznej w procesie specjacji. Dodatkowym atutem rozprawy jest uwzględnienie w badaniach obecności endosymbiotycznej *Wolbachii*, która może mieć związek z zapoczątkowaniem i/lub wzmocnieniem specjacji allopatrycznej. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie analiz sekwencji mtDNA (cytochrom b i w przypadku niektórych prób oksydaza cytochromowa) jak i genu jądrowego (EF) a także przeprowadzenie testów na obecność oraz zdefiniowanie grup i linii *Wolbachia*. Stworzyło to szansę zgłębienia ważnego ewolucyjnie problemu, którego zrozumienie pozwoli w przyszłości wyjaśnić wiele pytań na temat specjacji i procesów towarzyszących wtórnemu kontaktowaniu się podgatunków. Autorka w rozprawie sformułowała dwie hipotezy badawcze, natomiast w obu publikacjach wymienia ona po kilka hipotez szczegółowych. Przeprowadzone przez nią badania pozwoliły uzyskać odpowiedzi na stawiane cele i pytania.

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 53 strony, wliczając wprowadzenie, oba streszczenia, dwie publikacje, literaturę, która jest aktualna i zawiera niemałą liczbę pozycji zebranych na 5 stronach tego rozdziału. Znalazły się tutaj wszystkie ważne cytacje, w tym najnowsze prace w dziedzinie. Na końcu znalazły się oświadczenia współautorów.

Problemy naukowe zostały przedstawione przez Autorkę rozprawy w sposób świadczący o niezłej znajomości tematyki badawczej, a badania wykonała Ona z uwzględnieniem podstawowych kanonów pracy laboratoryjnej, zakresu analiz filogenetycznych jak i statystycznej obróbki danych.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Lis spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie Autorki pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ocena szczegółowa

Zadaniem recenzenta jest wskazanie zarówno mocnych, jak i słabych stron rozprawy doktorskiej, tak, by jej Autorka mogła poszerzyć zakres wykonywanych analiz, pogłębić stan posiadanej wiedzy oraz wzmocnić wnioskowanie. Rzetelna i konstruktywna krytyka jest nieodłącznym elementem poszukiwania prawdy w badaniach. Taka też intencja przyświecała mi podczas recenzowania niniejszej rozprawy. Ponieważ rozprawa składa się z polskojęzycznego opisu uzyskanych wyników w dwóch anglojęzycznych publikacjach naukowych, w pierwszej kolejności oceniam polskojęzyczną część rozprawy. Autorka rozprawy na 18 stronach tekstu (wliczając oba streszczenia) w syntetyczny sposób przedstawiam polskojęzycznemu czytelnikowi to, co uzyskała w swoich badaniach. Wprowadzenie jest bardzo krótkie, dominują w nim stwierdzenia o ważności i istotności badań filogeograficznych, jednak nie odnalazłem uzasadnienia, dlaczego takie badania są ważne. Część ogólna, to dosłownie jeden mały akapit, po którym Autorka skupia się na badanym przez siebie gatunku. Hipotezy badawcze są klarowne, jednak niezwykle uproszczone, pytanie w hipotezie 1 sformułowane jest na zasadzie zero-jedynkowej: czy w Karpatach stykają się dwie linie ewolucyjne badanego podgatunku? Obie odpowiedzi twierdząca jak i przecząca będą w tym przypadku równie poprawne. W hipotezie 1 Autorka zakłada ograniczony przepływ genów i uważa, że sugerować on może niepełną specjację allopatryczną. Autorka nie testuje jednak, jak bardzo ten przepływ jest ograniczony. W hipotezie 2 (w części polskojęzycznej) pada sugestia, że *Wolbachia* infekuje osobniki tylko z jednej linii, co również jest stanem zero-jedynkowym, raczej trudnym do wyobrażenia w naturze. Polskojęzyczny opis metod i wyników są bardzo skrótowe i ogólnikowe i nie pokazują szerszego kontekstu, choćby na tle cytowanej przez Autorkę pracy Rodriguez i in. 2014. Uważam, że porównanie uzyskanych wyników przez Autorkę z wynikami Rodriguez i in. 2014 w części polskojęzycznej byłoby znakomitym zwieńczeniem rozprawy.

Pewną wątpliwość może budzić fakt, że w tytule rozprawy zawarty jest termin „specjacja”, który w mojej ocenie nie został w pełni przetestowany i zweryfikowany w niniejszej rozprawie. Przykładem tego może być stwierdzenie w podsumowaniu, że w strefie kontaktu zaobserwowano przenikanie *Wolbachii* z jednej linii do drugiej, a w następnym zdaniu pojawia się sugestia, że fakt ten może być czynnikiem indukującym lub wzmacniającym specjację. Sugestia ta odnosi się, jak sadzę, raczej do wcześniejszego zdania (obecność *Wolbachii* prawie wyłącznie w kładzie NE). Ta niezręczność powoduje pewne niezrozumienie podczas lektury tekstu. Szkoda, że Autorka nie wyakcentowała z większą siłą obecności unikalnej gałęzi w obrębie kładu SW, którą wykryła.

W pracy nr 1 Autorka wykazała obecność dwóch linii mtDNA badanego gatunku w Karpatach. Co ciekawe, wykryła rzadko spotykaną heteroplazmię w mtDNA u niektórych osobników świadcząca

najprawdopodobniej o hybrydyzacji. Szkoda, że nie posłużyła się Ona opcją UNPHASE (w programie DNASp), by w pełni obiektywnie rozdzielić te sekwencje. Nie odnalazłem w pracy nr 1 drzewa filogenetycznego dla mtDNA, a dwie linie mtDNA zostały stwierdzone na podstawie samej sieci ewolucyjnej. Wynik ten jest w częściowej opozycji do wyników Rodriguez i in 2014, gdzie u tego gatunku stwierdzono trzy linie ewolucyjne mtDNA a także do wyników uzyskanych dzięki sekwencjonowaniu jądrowego genu EF. Zapewne, po dodaniu sekwencji genu oksydazy cytochromowej, które były wykonane w pracy nr 1, Autorka uzyskałaby bardziej jednoznaczny wynik analizy filogenetycznej markera cytoplazmatycznego. Ryciny 4a i 4b w pracy nr 1 pokazują bardzo ograniczone obszary, gdzie współwystępują obecnie obie linie mtDNA (dwie populacje na terenie Polski) i jednocześnie dokumentują heteroplazmię u niektórych osobników, w populacjach, gdzie obecna jest linia NE mtDNA, co pozwala zidentyfikować kierunek hybrydyzacji/introgresji z SW do NE. Moim zdaniem sytuacja w Polsce może być zupełnie inna niż w Rumunii, gdzie hybrydyzacja zaszła najprawdopodobniej dosyć dawno, co Autorka słusznie zauważa opisując heteroplazmię. Rycina 4 pokazuje pewne różnice w rozmieszczeniu linii mtDNA i jądrowego genu EF, jednak w pracy nie ma wnikliwej analizy, czym to może być spowodowane. Nie odnalazłem rozdzielania haplotypów dla jądrowego genu EF (lub jego fragmentu pozbawionego indeli) w programie UNPHASE, co pomogłoby w analizach tego genu. Posiadając haplotypy dla genu EF Autorka mogłaby pokusić się o ocenę stopnia i kierunków introgresji w genach jądrowych. Warto by przyjrzeć się osobnikom heterozygotycznym w genie EF (w odcinku pozbawionym indeli), by ocenić, czy są one heterozygotami w obrębie jednej linii, czy też ich heterozygotyczny genotyp to efekt krzyżówek między liniami. Nie odnalazłem w pracy zestawienia liczby haplotypów w obrębie danej linii mtDNA czy EF, analiz *mismatch distribution*, które pozwoliłyby wnioskować o ekspansji demograficznej lub jej braku oraz ją datować. Brak też testów na selekcję, np. Tajima, Fu, Fs. Sekwencje *cytb* mtDNA mogłyby być przetłumaczone na sekwencje białka, a to umożliwiłoby wykonanie analiz substytucji synonimowych względem niesynonimowych, można by też zidentyfikować krytycznie ważne mutacje i przeprowadzić pełniejsze wnioskowanie o dywergencji w mtDNA. Wiele z tych testów mogłoby dostarczyć informacji przydatnej do oceny stopnia dywergencji allopatrycznej, a przez to wnioskować o specjacji. w Na rycinie 1 (drzewo filogenetyczne dla EF, praca nr 1) znajduje się prawdopodobnie błąd: jeden z gatunków stanowiących outgrup (*P. tessellatus*) grupuje się z wysokim wskaźnikiem bootstrapu z sekwencjami *P. spumarius*. Najprawdopodobniej badana próbka uznana za *P. tessellatus* należy do *P. spumarius*. Dyskusja nt ten temat znajduje się w pracy opublikowanej w Systematic Entomology (2010), 35, 318 – 328, jednak ewidentnie brakuje wzmianki o tym w pracy nr 1. Cenna byłaby też analiza SAMOVA, czy regresja wielokrotna w testowaniu roli Karpat jako bariery oraz zgodności obrazu filogeograficznego dla mtDNA i EF, bo bez wymaganych obliczeń wnioskowanie o roli Karpat jako bariery ma cechy spekulacji. W streszczeniu pracy nr 1 w abstrakcie pojawia się sugestia, że strefa kontaktu jest raczej nowopowstała, jednak w dyskusji na stronie 8 pada sformułowanie temu przeczące: „*This observation suggests that recent hybridization is unlikely*”. Bardzo bym prosił o wyjaśnienie tej dosyć istotnej kwestii.

Praca nr 2 dotyczy ważnego zagadnienia obecności *Wolbachii* u badanego gatunku. Z dużym uznaniem stwierdzam, że Autorka niezwykle starannie analizowała sekwencje *Wolbachii* i identyfikowała

poszczególne linie metodą MLST. Nie rozumiem jednak, dlaczego porównania obecności Wolbachii odnoszą się tylko do dwóch linii mtDNA, a nie do EF. Faktem jest, że zarówno mtDNA jak i Wolbachia przenoszone są w linii żeńskiej, jednak porównanie z EF byłoby na pewno wartościowe. Autorka w pracy nr 2 w metodach nie wspomina, skąd pochodzą sekwencje mtDNA. Interesujące jest, że w strefie kontaktu częstość Wolbachii w linii NE jest bardzo wysoka. Nie mniej interesujące jest przenikanie Wolbachii między liniami w Karpatach, co jest swoistą miarą introgresji tego endosymbionta z NE do SW. W Polsce mtDNA wydaje się ulegać introgresji w przeciwnym kierunku niż Wolbachia (ryc 4a, praca nr 1), podobnie jak heteroplazmia obecna w Karpatach (w 6 populacjach z kladu NE obecne były osobniki z heteroplazmią, posiadające mtDNA z NE jak i SW, ta sama rycina w pracy nr 1). Ciekaw jestem opinii doktorantki na ten temat. W pracy nr 2 nie odnalazłem informacji, czy obecność lub brak Wolbachii wpływa na liczbę oraz stopień dywergencji haplotypów mtDNA w danej populacji czy linii mtDNA *P. spumarius*.

Podsumowanie

W mojej ocenie końcowej stwierdzam, że Autorka rozprawy podjęła próbę odpowiedzi na pytania dotyczące stopnia dywergencji genetycznej, hybrydyzacji i specjacji. Zidentyfikowała Ona strefę hybrydyzacji między liniami w obrębie badanego gatunku oraz wykryła obecność *Wolbachii*, która różniła się częstością występowania w obu liniach mtDNA u *Philaenus spumarius*. Analizy wykonała z zastosowaniem metod biologii molekularnej. Dwie publikacje wchodzące w skład rozprawy dostarczyły nowych, interesujących informacji dla nauki. Stwierdzam, że przedstawiona praca doktorska pt. "Specjacja i struktura genetyczna populacji *Philaenus spumarius* (Hemiptera) w strefie kontaktu głównych linii filogenetycznych", pomimo wymienionych powyżej niedociągnięć, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, o których mówi artykuł 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595; ze zm. w Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Agaty Lis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

