

prof. dr hab. Jakub Sawicki

Katedra Botaniki i Ochrony Przyrody

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Tel. 89 524 51 90

e-mail: jakub.sawicki@uwm.edu.pl

RECENZJA

Pracy doktorskiej Hanny Kijak

wykonanej w Zakładzie Genetyki, Instytutu Biologii Eksperymentalnej

Wydziału Biologii Uniwersytetu im Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod opieką naukową
Pana dr hab. Ireneusza J. Odrzykoskiego oraz dr Konrada Celińskiego, pt:

"Polimorfizm haplotypów chloroplastowego i mitochondrialnego DNA u wątrobowca
Marchantia polymorpha sensu lato."

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, zgodnie z wymaganiami art. 20 ust. 5 Ustawy z 14 marca 2003 roku o stopnia i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Hanny Kijak porusza problem zróżnicowania genetycznego genomów organellowych wątrobowca *Marchantia polymorpha* s.l., ważnego gatunku modelowego. Celem pracy było zbadanie polimorfizmów organellowego DNA oraz oszacowanie różnic genetycznych pomiędzy trzema taksonami tego kompleksu oraz między *M. polymorpha* i *M. paleacea*.

Jako dodatkowy cel pracy postawiono sekwencjonowanie i charakterystykę genomu plastydowego *Marchantia polymorpha* subsp. *ruderalis*. Recenzowana praca doktorska Pani mgr Hanny Kijak przedłożona została w formie obszernego, liczącego 193 stron manuskryptu, podzielonego na 8 rozdziałów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Pracę otwiera liczący niespełna dwie strony wstęp, będący próbą zdefiniowania problemu i uzasadnieniem celowości podjętych badań.

Drugi rozdział stanowi 24-stronnicowy przegląd literatury, podzielony dodatkowo na cztery podrozdziały. Pierwszy z nich porusza zagadnienie roślin modelowych, skupiając się jedynie na najczęściej badanych organizmach, z szczególnym uwzględnieniem badań na *Arabidopsis*. *Marchantia polymorpha* jako roślina modelowa jest opisywana w kolejnym z podrozdziałów. Uważam, że informacje zawarte w tym podrozdziale, powinny zostać umieszczone w wstępie

pracy, co lepiej wprowadziłoby czytelnika w poruszane zagadnienia. Trzeci podrozdział przeglądu literatury przedstawia pobieżną, aczkolwiek wystarczającą na potrzeby pracy, charakterystykę genomów organellowych roślin. Doktorantka nie ustrzegła się w nim jednak paru błędów, szczególnie w opisie genomów mitochondrialnych wątrobowców. Nie możemy zakładać, że u wszystkich wątrobowców pseudogenizacji uległy geny *cob* i *nad7*. Gen *cob* jest funkcjonalny u wielu gatunków, natomiast wątrobowce z rodzajów *Treubia* i *Haplomitrium* posiadają również funkcjonalny gen *nad7*. Ostatni podrozdział porusza zagadnienie barkodingu roślin. Mimo, że jest to zagadnienie, bardzo często poruszane przez współczesnych badaczy, ten ważny, z punktu widzenia celu pracy rozdział jest potraktowany pobieżnie, a wybór omawianej literatury sprawia wrażenie dość przypadkowego, szczególnie pod kątem roślin zarodnikowych, do których zaliczany jest przecież obiekt badań niniejszej pracy. Superbacodingowi, czy identyfikacji organizmów w oparciu o kompletne genomy organellowe, który dominuje w najnowszej literaturze, poświęcono zaledwie jedno, pięciolinijkowy akapit poparty pojedynczym cytowaniem. W kontekście roślin niższych, kontrowersyjne jest również stwierdzenie o trudności analizy genomów mitochondrialnych, gdyż w tym przypadku mitogenomy są łatwiejsze do uzyskania i analizy, a wspomniana homologiczna rekombinacja dostała do tej pory potwierdzenia tylko u jednego gatunku wątrobowca. Ostatnią część tego rozdziału poświęcono możliwości zastosowania techniki HMR w identyfikacji gatunkowej. Wybór prac do przeglądu literatury oczywiście może być w dużym stopniu subiektywny, tym bardziej, że waga poszczególnych prac w opinii recenzentów, promotorów i Doktorantki może być rozbieżna.

Cele pracy zostały zdefiniowane w rozdziale trzecim. Doktorantka przedstawiła w nim siedem pytań badawczych, których numeracja, zapewne w wyniku błędu edytorskiego zaczyna się od numeru 8. Sformułowane pytania (cele?) są dość drobiazgowo. Pierwsze trzy równie dobrze można zamknąć w formie jednego, tym bardziej, że są wzajemnie potwierdzające lub wykluczające. W podobnym kontekście postawione są kolejne 3 pytania. Wystarczy jedna odpowiedź negatywna, na którekolwiek z pytań 1-6, aby przecząco odpowiedzieć na pozostałe. Ostatnie pytanie dotyczy weryfikacji hipotezy o hybrydowym pochodzeniu *M. polymorpha* ssp. *ruderalis*.

Realizacji postawionych celów miały służyć 4 zadania badawcze, polegające na sekwencjonowaniu wybranych regionów metodą Sangera (nb, na nieistniejącym urządzeniu typu ABI 3010XL, zapewne chodziło o 3130XL), sekwencjonowaniu genomowym na platformie Ion Torrent, opracowaniu testu diagnostycznego w oparciu o technikę HMR, oraz analizie wyników. Ponownie muszę stwierdzić, że takie sformułowanie celi i zadań badawczych jest moim zdaniem dość dyskusyjne. Praca doktorska powinna na pierwszym planie stawiać hipotezy, które oczywiście mogą być formułowane w formie pytań, ale nie powinny być od siebie zależne w tak dużym stopniu.

Podsumowując pierwszą część rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, że autorka wykazała się dostateczną znajomością leżących u podstawy pracy zagadnień. W przypadku wstępu w prezentowanym układzie, samo wprowadzenie powinno być moim zdaniem bardziej skupione na zagadnieniu zmienności i taksonomii rodzaju *Marchantia*, umożliwiłoby to, wraz z pełniejszym i bardziej trafnym doбором literatury, lepsze wprowadzenie czytelnika w poruszane zagadnienie.

Nadal pewien niedosyt pozostaje również po lekturze rozdziału poświęconego celom i zadaniom badawczym, gdzie brakuje wyraźnie zdefiniowanej głównej hipotezy, a na część spośród stawianych pytań można odpowiedzieć bez potrzeby prowadzenia badań.

Materiał i metody badawcze zostały przedstawione w rozdziale czwartym. Materiał badawczy obejmował 27 prób z kompleksu *M. polymorpha* oraz 4 próby z *M. paleacea*. Ilościowo materiał nie wydaje się być zbyt obszerny, ale do realizacji postawionych celów w pełni wystarczający. Szkoda tylko, że tak kosmopolityczny gatunek jak *M. polymorpha* został zebrany z niewielkiego obszaru geograficznego.

Metody badawcze zostały przedstawione skrupulatnie i ich opis nie budzi większych zastrzeżeń. Dość długo można natomiast dyskutować nad sensem prowadzonych analiz, bo część z nich wydaje się słabo przemyślana, szczególnie w części dotyczącej sekwencjonowania genomu plastydowego. Próby izolacji frakcji chloroplastów miały być może sens kilkanaście lat temu, ale w dobie kosztów sekwencjonowania 1G pz na poziomie tysiąca złotych, wydają się niepotrzebnie wykonaną pracą. Traktowanie wyizolowanego DNA jako "chloroplastowego" jest również sporym nadużyciem, gdyż opisana metoda nie pozwala na eliminację jądrowego DNA, a jedynie na zwiększenie udziału chloroplastowego DNA z 3-5% do kilkunastu procent.

Moje zastrzeżenia budzi także wybór platformy do sekwencjonowania plastomu, która znana jest z generowania dużej ilości błędów typu indel w obrębie regionów homopolimerowych, których w genomie referencyjnym przecież nie brakuje. Do sekwencjonowania genomów pod kątem analizy SNP (a taką prowadzono w pracy) stosuje się zwykle metodę SBS.

Decydując się jednak (choć trudno mi znaleźć do tego logiczne uzasadnienie) na platformę Ion Torrent, zdecydowanie należałoby skorzystać z chipów o wyższej przepustowości, gdyż nawet dwie analizy (1x200 i 1x 400pz) mogły dostarczyć w najlepszym przypadku (w praktyce niespotykanym) zaledwie 150M pz.

Błędne założenia metodyczne dotyczące sekwencjonowania genomu chloroplastowego *M. polymorpha* doprowadziły do konieczności uzupełnienia luk w plastomie za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera. Nie do końca rozumiem natomiast potrzebę klonowania amplifikowanych, brakujących fragmentów. Genom plastydowy jest haploidalny, na potrzeby zapelnienia luk zaprojektowano specyficzne startery, dlaczego zatem wymagane było klonowanie?

Mimo powyższych uwag, redakcyjne opracowanie omawianego rozdziału jest na wysokim poziomie, a przebiegi poszczególnych etapów analiz są opisane bardzo skrupulatnie.

Rozdział prezentujący wyniki podzielony został na trzy podrozdziały. W pierwszym z nich Doktorantka przedstawia wyniki analizy gatunków *M. polymorpha s.l.* i *M. paleacea* w oparciu o zsekwencjonowane regiony genomu plastydowego i mitochondrialnego. Wszelkie wykryte polimorfizmy opisane zostały szczegółowo i zilustrowane stosownymi tabelami. Szczegółowo przeanalizowane zostały także wartości zróżnicowania nukleotydowego oraz odległości genetycznej obliczone na podstawie uzyskanych danych. Nowością w poprawionej wersji manuskryptu jest również analiza ABGD, która, w większości przypadków nie wyróżniła

badanych podgatunków. Sporo uwag budzi jednak podrozdział poświęcony opisowi wyników analizy filogenetycznej przeprowadzonej za pomocą metod NJ, ML i Bayesowskiej. O ile w przypadku analizy metodą odległościową (NJ) opis jest zgodny z wynikami przedstawionymi na rycinie 7, to w przypadku dwóch kolejnych analiz poprawność interpretacji może budzić pewne zastrzeżenia. W przypadku analizy ML (rycina 8) nie można mówić o trzech wyróżnionych grupach, gdyż tylko dwie są istotne statystycznie (MC i MP). W analizie Bayesowskiej hipotezę o monofiletyczności danej grupy przyjmuje się lub odrzuca (gdy $PP < 95$), co w opisywanym przypadku powinno ograniczyć się do stwierdzenia występowania dwóch grup, odpowiednio MP plus referencja, oraz wspólnej grupy MC, MB i MA. Rozpisywanie się o pozostałych „prawdopodobieństwach” jest w tym wypadku niefortunne. Niestety, ta błędna interpretacja otrzymanych wyników powielona została także w dyskusji.

Drugi z podrozdziałów, poświęcony jest otrzymaniu i analizie kompletnego genomu chloroplastowego. W poprawionej wersji pracy do tego rozdziału nie mam większych uwag. Zarówno opis wyników sekwencjonowania i analiza porównawcza zostały poprawnie przedstawione. W tekście początkowo nie mogłem natomiast znaleźć bardzo istotnej informacji o zmianie liczby genów w genomie NC_037507, który wg tabeli różni się ilością CDS-ów oraz genów tRNA (tabela 25). Zostało to wyjaśnione dopiero w osobnym podrozdziale (5.2.3), z którego wynika, że dane w tabeli 25 powinny być jednak skorygowane, chyba, że ORF29 nie wstępuje fizycznie, żadnym pozostałym plastomów.

Rozdział poświęcony sekwencjonowaniu genomu chloroplastowego został znacznie poprawiony i poszerzony. Szkoda tylko, że opisane w nim wyniki nie miały wpływu na wybór regionów analizowanych w pierwszym podrozdziale. Przy poszukiwaniu najbardziej optymalnych markerów gatunkowych należy raczej zastosować metodę „przesuwnego okna” (sliding window) o optymalnym dla barcodingu rozmiarze, w celu określenia najbardziej polimorficznych regionów, które niekoniecznie muszą być zbieżne z sztywno zdefiniowanymi loci.

W trzecim z podrozdziałów Doktorantka opisuje wyniki analizy qPCR mającej na celu szybką identyfikację poszczególnych grup genetycznych gatunków z rodzaju *Marchantia*. Test został opracowany w oparciu o fragment sekwencji genów *ycf1* oraz *ycf2*. W oparciu o przedstawione w pracy dane, opracowany test sprawdził się jedynie w identyfikacji *M. polymorpha* ssp. *ruderalis*.

Podsumowując rozdział wyniki, należy stwierdzić, że został on poprawiony i znacznie rozbudowany w poprawionej wersji manuskryptu, spełniając wszelkie warunki stawiane rzetelnym opisom uzyskanych w badaniach rezultatów.

Rozdział stanowiący dyskusję otrzymanych wyników składa się z czterech podrozdziałów.

Doktorantka już w pierwszym akapicie przypomina główny cel pracy, jakim była charakterystyka zróżnicowania haplotypów *M. polymorpha* s.l. oraz formułując swoisty wstęp do dalszej części, podzielonej już na podrozdziały dyskusji. Pierwszych z nich poświęcony jest molekularnej delimitacji taksonów z rodzaju *Marchantia* w oparciu o zastosowane markery. Otrzymane wyniki są względnie szeroko dyskutowane z opublikowanymi badaniami nad mchami, wątrobowcami, a także roślinami naczyniowymi. Pod koniec tego podrozdziału

Doktorantka próbuje przeprowadzić dyskusję z wynikami analiz filogenetycznych, powielając niestety błędy interpretacyjne z rozdziału wyniki. W oparciu o otrzymane w pracy wyniki w żaden sposób nie możemy stwierdzić, że „Wszystkie analizy dzielą taksony *M. polymorpha* na trzy grupy odpowiadające podgatunkom”. Warto też zaznaczyć, że zwiększanie ilości danych nie zawsze prowadzi do lepszego rozwinięcia drzewa filogenetycznego, tym bardziej, że niektóre z analizowanych regionów dobrze wyróżniały badane podgatunki.

Drugi z podrozdziałów dotyczy weryfikacji hipotezy o hybrydowym pochodzeniu *M. polymorpha* ssp. *ruderalis*. W kontekście przedstawionych przed Doktorantką wyników, można pośrednio odrzucić postawioną hipotezę, szczególnie, biorąc pod uwagę dobry dobór prób, pozwalający na odrzucenie potencjalnego wpływu czynnika geograficznego na zróżnicowanie haplotypów. Jak wspomniałem jest to jednak metoda pośrednia, w celu ostatecznego odrzucenia stawianej hipotezy należałoby przeanalizować loci genomu jądrowego. Kolejny podrozdział dedykowany jest zastosowaniu testów qPCR-HRM w molekularnej identyfikacji organizmów, skupiając się na zaletach zastosowanej metody. Niestety nie mogę się zgodzić z ostatnim akapitem tej części dyskusji, który przeczy przedstawionym wynikom. Identyfikację jednego z trzech analizowanych gatunków trudno nazwać sukcesem i możemy mówić w tym przypadku tylko o teoretycznej przydatności, której nie udało się potwierdzić w niniejszej pracy.

Czwarty i zarazem ostatni z podrozdziałów skupia się na porównaniu genomów chloroplastowych wątrobowców. Niewielka liczba znanych sekwencji genomów plastydowych wątrobowców ogranicza dość istotnie możliwości wyciągania wniosków odnośnie ich struktury, dlatego z dużym dystansem podchodziłbym do stwierdzeni o stabilności budowy plastomów. Nawet w obrębie słabo zróżnicowanych genomów plastydowych wątrobowców plechowatych (complex thalloids) występują zmiany strukturalne, czego najlepszym przykładem jest *Conocephalum conicum*, ale z oczywistych względów takie informacje mogły nie być dostępne Autorce. Rozdział ten jest generalnie dobrze napisany, a jedyna moja uwaga dotyczy próby uzasadnienia wyboru platformy do sekwencjonowania. Próby dość nieudolnej, gdyż nawet cytowana praca (Brozyska et al., 2014) jasno pokazuje jakie problemy generuje zastosowanie platformy Ion Torrent (Tabele 1-3), generując nawet kilkadziesiąt dodatkowych SNP. Wbrew stwierdzeniu, wyciągnięcie wniosków dotyczących różnic między genomami, nawet w oparciu o powoływany artykuł nie musi być szczególnie trudne.

Przedstawione w rozdziale siódmym wnioski w większości są uprawnione i wynikają z zrealizowanych zadań badawczych. Niefortunne sformułowania obecne w poprzedniej wersji pracy zostały poprawione, bądź usunięte.

Rozdział 8 stanowi spis literatury, a całość zasadniczej części pracy wieńczy spis tabel i rycin.

Ponad 1/4 objętości pracy stanowi suplement, w którym umieszczono tabele z sekwencjami starterów, składy buforów reakcyjnych, profile reakcji PCR czy numery akcesyjne sekwencji regionów uzyskane w wyniku realizacji pracy. Blisko 19 stron zajmuje tabela indeli powstałych w wyniku porównania zsekwencjonowanego genomu z genomem *M. paleacea*. Ostatnią, moim zdaniem całkowicie zbędną częścią suplementu są wydrukowane sekwencje nukleotydowe regionów wykorzystanych w badaniach. Trudno mi jest doszukiwać się sensu zamieszczania taki

danych nawet w suplemencie, równie dobrze, pracę można byłoby powiększyć o parę stron drukując jeszcze sekwencję genomu plastydowego.

Przedstawiona praca doktorska ma natomiast stosunkowo niewiele uchybień redakcyjnych, a większość z nich znajduje się w elementach dodanych do pierwotnej wersji manuskryptu. Nie rzutują one w jakikolwiek negatywny sposób na całość pracy.

Podsumowanie

Recenzowany manuskrypt sprawia wrażenie rzetelnej rozprawy naukowej i spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w myśl ustawy z dn. 14 marca 2003 roku (dz. U. Nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) art. 13, ust. 1.

W związku z powyższym zwracam się uprzejmie z wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani magister Hanny Kijak i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



Jakub Sawicki

Olsztyn, 15 stycznia 2019