

Warszawa, dn. 30 stycznia 2019 r.

Prof. dr hab. Krzysztof Spalik
Zakład Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji
Instytut Botaniki, Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski
Aleje Ujazdowskie 4, 00-478 Warszawa
e-mail: spalik@biol.uw.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr Hanny Kijak

pt. „Polimorfizm haplotypów chloroplastowego i mitochondrialnego DNA
u wątrobowca *Marchantia polymorpha* sensu lato”

Rozprawę doktorską pani mgr Hanny Kijak recenzuję ponownie, ponieważ drugi recenzent wniosł o uzupełnienie i poprawienie niektórych elementów tej pracy. Niektóre niedociągnięcia, wskazane przeze mnie w pierwszej recenzji, także zostały poprawione, niemniej jednak pozostały pewne słabości, wynikające z konstrukcji badań oraz układu pracy.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr Hanny Kijak jest analiza różnorodności genetycznej organellanego DNA u trzech podgatunków *Marchantia polymorpha*. Najważniejsze zadania badawcze, jakie autorka przed sobą postawiła, to:

- ocena polimorfizmu haplotypów organellarnego DNA u porostnicy wielokształtnej *sensu lato*, tzn. obejmującej trzy taksony niższego rzędu, którym w zależności od systemu klasyfikacji nadawano rangę podgatunków lub gatunków;
- sekwencjonowanie genomu chloroplastowego *Marchantia polymorpha* subsp. *ruderalis* w celu porównania z genomami chloroplastowymi *Marchantia* zdeponowanymi w GenBanku;
- opracowanie prostego testu identyfikacyjnego dla taksonów tego kompleksu z wykorzystaniem metody qPCR-HRM.

W poprawionej wersji pracy doktorantka sformułowała je także w postaci siedmiu pytań badawczych (numerowanych 8–14, co zapewne wynika z ich przekopiowania ze streszczenia i kontynuacji numerowania), nieco zbyt szczegółowych i odwołujących się do metod zamiast do luk w wiedzy, wymagających wypełnienia. Pozwolę sobie zatem powtórzyć z poprzedniej recenzji moje ujęcie problematyki tej pracy.

- Czy obecnie używany, dokonany na podstawie cech morfologicznych podział porostnicy wielokształtnej na trzy podgatunki znajduje odzwierciedlenie w zróżnicowaniu DNA chloroplastowego i mitochondrialnego tych taksonów?
- Jeśli tak, to czy można wskazać dla nich sekwencje diagnostyczne (tzw. „kody kreskowe”) albo bazujący na nich prostszy sposób rozróżniania? A w konsekwencji – czy linie komórkowe porostnicy używane w badaniach laboratoryjnych są poprawnie oznaczone?

- Czy hipoteza o mieszańcowym pochodzeniu podgatunku *ruderalis* jest wsparta danymi molekularnymi?

Jak już pisałem poprzednio, pytania te są istotne zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia. Wiele szczepów i roślinnych linii komórkowych w kolekcjach kultur jest źle oznaczonych, podobnie jak materiał zielnikowy, wykorzystywany do molekularnych badań filogenetycznych. Użycie takiego materiału prowadzi do błędnych wniosków, utrudnia też weryfikację wyników. W błąd może też wprowadzać system klasyfikacji niezgodny z filogenezą. Dlatego też badania służące oznaczeniu materiału laboratoryjnego, zwłaszcza gatunków modelowych, oraz weryfikacji ich systemu klasyfikacji są niezbędne.

W części poświęconej analizie zmienności *Marchantia polymorpha* doktorantka wykorzystwała 31 georeferencjonowanych próbek z tego rodzaju, w tym 27 reprezentujących różnorodność taksonomiczną i geograficzną *M. polymorpha sensu lato*. Grupę zewnętrzną stanowiły cztery próby *M. paleacea*. Zsekwencjonowała dla nich sześć¹ regionów DNA chloroplastowego oraz dwa introny w genach mitochondrialnych. Okazały się one jednak bardzo mało zmienne na poziomie wewnątrzgatunkowym.

W analizach filogenetycznych w nowej wersji pracy obok metody największej wiarygodności zastosowano także metodę bayesowską oraz – zupełnie niepotrzebnie – metodę łączenia sąsiadów (*neighbor-joining*, NJ). O ile włączenie metody bayesowskiej jest dobrym krokiem, ponieważ stanowi ona przedziałowe (a nie punktowe) oszacowanie filogenezy, to przy metodzie NJ – jako algorytmicznej – istnieje duże prawdopodobieństwo wpadnięcia w optimum lokalne i nie wnosi ona nic nowego do wnioskowania. Wszystkie analizy dały zbliżone wyniki: w *M. polymorpha* wyróżnione zostały trzy klady, ale w ich obrębie nie było praktycznie żadnego zróżnicowania sekwencji. Klady te odpowiadają podgatunkom wyróżnianym na podstawie danych morfologicznych. Wynik ten potwierdza zasadność podziału taksonomicznego porostnicy wielokształtnej na trzy podgatunki – czego weryfikacja była jednym z celów pracy – wymaga jednak krytycznego komentarza dotyczącego przeprowadzonych analiz oraz wyboru markerów.

Po pierwsze, jak już zaznaczyłem w poprzedniej recenzji, przy szacowaniu filogenezy z wykorzystaniem modeli substytucji, a takimi są wszystkie trzy metody wykorzystane w analizach, sekwencje identyczne powinny być reprezentowane przez jeden obiekt, a na wynikowym drzewie można go rozwinąć w politomię z gałęziami o zerowej długości. Po drugie, wątpliwości budzi wykonanie analiz bayesowskich. Według informacji w pracy wykonano je posługując się pakietem Geneious. Nie korzystałem dotychczas z tego pakietu, ale według informacji na stronie producenta nie implementuje on samodzielnie żadnych metod filogenetycznych, ale wykorzystuje dostępne programy, w tym MrBayes do analizy bayesowskiej. MrBayes nie nakłada wspomnianych przez doktorantkę ograniczeń na modele substytucji. W analizie bayesowskiej zresztą nie precyzuje się szczegółowo modelu, ale określa klasę modeli – nie rozumiem zatem sensowności wykonania dwóch analiz, których wyniki zilustrowano na ryc. 9 i 10. Co więcej, przedstawione tam drzewa są ultrametryczne (mają wyrównane gałę-

¹ W tabeli 5 doktorantka rozdziela dwa regiony na geny i przestrzenie międzygenowe, ale w dalszym tekście omawia je łącznie.

zie), co sugeruje, że oszacowano je z założeniem zegara molekularnego, czego w opisie metod nie zaznaczono. Po trzecie, wspomniane trzy kłady nie mają silnego wsparcia w analizie bayesowskiej, co nie dziwi, biorąc pod uwagę bardzo niski stopień zróżnicowania sekwencji w obrębie poszczególnych podgatunków *M. polymorpha*, mimo szerokiego próbkowania geograficznego. Różnice między sekwencjami znaleziono tylko w obrębie jednego kładu dla dwóch pozycji przyrównania w przestrzeni międzygenowej *rps4-trnT*.

Tak niska zmienność wynika z wyboru do analizy wolno ewoluujących sekwencji, przede wszystkim *rbcL* i *matK*, które wykorzystuje się w szacowaniu filogenezy na znacznie wyższym poziomie taksonomicznym niż wewnątrzgatunkowy. Doktorantka uzasadniła swój wybór tym, że są to „uniwersalne” sekwencje barkodowe, co nie jest właściwą argumentacją. Sekwencje barkodowe wybrano tak, aby zapewnić rozdzielczość w zakresie całego drzewa życia, co jest istotne przy identyfikacji bezpostaciowego materiału, np. zielarskiego, który trudno oznaczyć na podstawie morfologii lub anatomii. W takim wypadku przydają się wolno ewoluujące markery, pozwalające na umiejscowienie nieznannej rośliny na drzewie filogenetycznym. Natomiast w celu uzyskania rozdzielczości filogenetycznej na określonym poziomie taksonomicznym należy dobrać markery do postawionego pytania badawczego. Sekwencjonowanie *rbcL* i *matK* w celu zbadania zmienności wewnątrzgatunkowej to duży wysiłek i koszt, ale żaden zysk – i taki wynik był do przewidzenia. Być może należało uwzględnić przynajmniej jedną szybko ewoluującą sekwencję jądrową, np. popularny rDNA ITS, który można łatwo amplifikować za pomocą uniwersalnych starterów. Innym wyjściem byłoby rozpocząć od szczegółowej analizy znanych genomów chloroplastowych *Marchantia* – tak jak to uczyniono w nowej wersji pracy – i na tej podstawie wybrać najbardziej zmienne regiony. Może dzięki temu dałoby się uzyskać większą rozdzielczość filogenetyczną w obrębie wyróżnionych kładów.

Nieuwzględnienie znaczników jądrowych sprawia, że należy z pewną rezerwą podchodzić do odrzucenia przez doktorantkę hipotezy Burgeffa i Schustera o nieodległym w czasie, mieszańcowym pochodzeniu *Marchantia polymorpha* subsp. *ruderalis*. Gdyby ten podgatunek powstał niedawno w wyniku skrzyżowania się dwóch pozostałych, to odziedziczyłyby genom chloroplastowy po jednym z rodziców. Jednak każdy podgatunek ma swoisty haplotyp cpDNA. W dyskusji doktorantka podkreśla, że oszacowana przez Villarreala i wsp. (2015) dywergencja tych haplotypów miała miejsce ok. 5 mln lat temu, co zaprzecza hipotezie Schustera, iż zdarzenie to zaszło kilkadziesiąt tysięcy lat temu. Warto jednak zauważyć, że oszacowanie Villarreala i wsp. miało bardzo szeroki 95-procentowy przedział najwyższej gęstości prawdopodobieństwa *a posteriori*, a górna granica tego przedziału to ok. 2 mln lat temu. Jest też interesujące, że na drzewie tych badaczy podgatunki *polymorpha* i *ruderalis* były siostrzane, a dalej plasował się podgatunek *montivagans*. Rozejście się *polymorpha* i *ruderalis* zaszło ok. 4 mln lat temu (plus-minus 2,5 mln lat). Przy takim scenariuszu nie można wykluczyć dawnej hybrydyzacji podgatunków *polymorpha* i *montivagans* z udziałem tego pierwszego jako dawcy chloroplastu. Różnice w sekwencji między *polymorpha* a *ruderalis* mogły narosnąć po tym zdarzeniu ewolucyjnym, co w nowej wersji pracy przyznaje też doktorantka. Ta spekulacja pokazuje, że bez badań genomowych, w tym genomu jądrowego, odrzucenie hipotezy o mieszańcowym pochodzeniu subsp. *ruderalis* nie jest proste.

W nowej wersji pracy rozwinięte zostało porównanie zsekwencjonowanego genomu chloroplastowego *M. polymorpha* subsp. *ruderalis* z genomem referencyjnym, zweryfikowanym w wyniku badań doktorantki jako należącym do *M. paleacea*, dodano także krótkie porównania z innymi genomami, w tym nowym genomem referencyjnym dla *M. polymorpha*. Jeszcze raz powtórzę, że należy żałować, iż te analizy nie poprzedziły badań filogenetycznych – wybór bardziej zmiennych sekwencji chloroplastowych mógłby zwiększyć rozdzielczość na drzewie rodowym porostnic. Porównując zsekwencjonowany przez siebie genom chloroplastowy oraz nowy genom referencyjny w GenBanku dla *M. polymorpha*, doktorantka zidentyfikowała 56 SNP oraz aż 525 indeli, co pokazuje, że genom ten może być wartościowym źródłem informacji o zróżnicowaniu wewnątrzgatunkowym. Szkoda, że doktorantka nie przeprowadziła analizy indeli w sekwencjach kodujących, przede wszystkim pod kątem zmiany ramki odczytu. Takie zmiany są zwykle błędami w sekwencjonowaniu – ich częstość pozwoliłaby ocenić jakość odczytu. Dziesięciokrotna przewaga ilościowa indeli nad substytucjami (co jest zjawiskiem nierzadkim) sugeruje, że zawarty w nich sygnał filogenetyczny może być znacznie silniejszy niż w podstawieniach. Należy żałować, że doktorantka nie pokusiła się o zidentyfikowanie najbardziej zmiennych rejonów, przydatnych do analiz wewnątrzgatunkowych. Takiego wartościowania dokonała jedynie dla ośmiu przebadanych wcześniej markerów, a nie dla całych genomów chloroplastowych.

Doktorantka sprawdziła także przydatność metody qPCR-HRM z wykorzystaniem genu *ycf1* do oznaczania badanych taksonów. W nowej wersji pracy autorka stonowała swój entuzjazm dla tej metody, ponieważ jej własne dane wskazywały na niemożność rozróżnienia podgatunków *polymorpha* i *montivagans*, wciąż jednak uważa ją za wartościową. Moim zdaniem jest to wątpliwe. Przede wszystkim jest to pośrednia metoda badania zmienności sekwencji, a jak wszystkie pośrednie metody może być zawodna, ponieważ służy identyfikacji jedynie dobrze poznanej i opisanej zmienności. Za pomocą tej metody trudno będzie wykryć nowy haplotyp cpDNA, ponieważ dla danego markera – mimo różnicy w sekwencji – krzywe topnienia produktu PCR w czasie rzeczywistym mogą być nieodróżnialne, jak to doktorantka pokazała dla podgatunków *polymorpha* i *montivagans*. Znacznie skuteczniejszą metodą identyfikacji, a przy tym dostarczającą nowych danych o zróżnicowaniu genetycznym badanego gatunku jest po prostu sekwencjonowanie wybranych markerów. Przy ciągle spadającej cenie sekwencjonowania różnica w kosztach między obiema metodami jest istotna tylko w wypadku konieczności masowej identyfikacji próbek, jak cytowane przez autorkę rozróżnianie odmian roślin uprawnych, odróżnianie mieszańców międzygatunkowych od gatunków rodzicielskich czy szybka identyfikacja roślin leczniczych. Trudno wskazać taką konieczność w wypadku badań nad porostnicą.

Praca jest napisana dobrym językiem, choć nie jest wolna od niezręczności stylistycznych i drobnych błędów, np. przypisanie Salviusowi współautorstwa dzieła *Species plantarum* Linneusza, podczas gdy był on tylko jego wydawcą. Wadą redakcyjną rozprawy jest rozwlekłość, w tym zdecydowanie nadmierne rozbudowane wprowadzenie, które w poprawionej wersji pracy stało się rozdziałem nr 2 pt. „Przegląd literatury”. Obejmuje on ponad dwadzieścia stron,

z czego tylko niewielka część odnosi się bezpośrednio do tematyki badań. Rolą wstępu w pracach naukowych jest wprowadzenie problemu badawczego, a przede wszystkim wykazanie luk w obecnej wiedzy, co umożliwia postawienie pytań badawczych. Tej roli wspomniany przegląd literatury nie odgrywa. Zwięzłości zabrakło także w innych rozdziałach. Na przykład opis zróżnicowania genetycznego wybranych markerów chloroplastowych i mitochondrialnych zajmuje aż 22 strony i obejmuje różne wskaźniki i wizualizacje, podczas gdy w standardowej publikacji filogenetycznej takie dane przedstawia się zazwyczaj w formie krótkiej tabeli. Z obszernością wstępu i prezentacji wyników kontrastuje krótka, licząca zaledwie 13 stron, dyskusja. Takie proporcje wskazują, że cała praca ma charakter bardziej opisowy niż problemowy.

Podsumowując, mimo krytycznych uwag dotyczących planu badań i sposobu prezentacji wyników, uważam dane zebrane przez doktorantkę za wartościowe, a jej najważniejsze wnioski – za zasadne. Badania doktorantki – potwierdzając zasadność wyróżniania trzech podgatunków oraz wzbogacając wiedzę o zróżnicowaniu ich genomu chloroplastowego – są istotnym wkładem do systematyki porostnic, co jest ważne z uwagi na rolę *M. polymorpha* jako organizmu modelowego. Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Hanny Kijak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Krzysztof Spalik