

dr hab. Igor J. Chybicki

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego
Wydział Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Katedra Genetyki
ul. Powstańców Wielkopolskich 10
85-090 Bydgoszcz

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani **mgr inż. Marty Niedzickiej**

pt. „**A genetic linkage map of *Lissotriton newts***”

wykonanej w Zespole Ekologii Molekularnej i Behawioralnej, w Instytucie Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
pod opieką promotora prof. dr. hab. Wiesława Babika

1. Kwestie formalne

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została napisana w j. angielskim i składa się z pięciu głównych rozdziałów, gdzie zamieszczono wstęp teoretyczny dla podjętych badań (Rozdz. 1) oraz cele badawcze (Rozdz. 2), a także gdzie opisano materiały i metody badawcze, wyniki i wnioski (Rozdz. 3-5). Ponadto, integralną częścią pracy jest spis literatury, suplement, podziękowania oraz streszczenie (w j. angielskim i polskim) i podziękowania. Całość zajmuje 165 stron.

Praca ma strukturę monografii naukowej, przy czym rozdziały 3-5 strukturą przypominają artykuły naukowe, tj. posiadają wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusję, natomiast nie posiadają spisu literatury, który jest wspólny dla całej dysertacji. Struktura nie budzi zastrzeżeń. Mam jednak pewne wątpliwości odnośnie wkładu doktorantki w powstanie pracy doktorskiej, które wynikają z faktu, że dwa pierwsze rozdziały opisują badania, których wyniki opublikowano w formie dwóch artykułów w recenzowanych czasopismach, tj.

1. Niedzicka M, Fijarczyk A, Dudek K, Stuglik M, Babik W. 2016. Molecular Inversion Probes for targeted resequencing in non-model organisms. Scientific Reports 6, Article number: 24051. doi: 10.1038/srep24051.
2. Niedzicka M, Dudek K, Fijarczyk A, Zieliński P, Babik W. 2017. Linkage Map of *Lissotriton Newts* Provides Insight into the Genetic Basis of Reproductive Isolation. G3 7(7):2115-2124. doi: 10.1534/g3.117.041178.

Przede wszystkim, nie jest dla mnie jasne, dlaczego w rozprawie nie podano *explicite*, że rozdziały 3 i 4 opisują te same badania co wspomniane artykuły, tym bardziej, że recenzowana rozprawa datowana jest na rok 2018, podczas gdy publikacje ukazały się w 2016 i 2017 roku.

Ponadto, wymienione artykuły są wieloautorskie, przy czym jedynie w przypadku publikacji z 2016 roku można dowiedzieć się jaką rolę pełnili poszczególni autorzy. Dodatkową kwestię stanowi źródło finansowania badań, które nie zostało wskazane w dysertacji, a jedynie we wspomnianych publikacjach. Pani mgr Niedzicka jest pierwszym autorem w przypadku obu artykułów, co wskazuje na jej dominującą rolę w badaniach. Niemniej, ze względu na wieloautorski charakter publikacji zasadne byłoby umieszczenie oświadczeń pozostałych autorów odnośnie ich wkładu w powstanie niniejszej dysertacji.

2. Ocena merytoryczna

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Niedzickiej było: 1) przetestowanie możliwości zastosowania markerów molekularnych, tzw. *molecular invresion probes*, u gatunków niemodelowych, 2) opracowanie mapy genetycznej traszek z rodzaju *Lissotriton* w oparciu o markery molekularne oraz 3) określenie zmienności morfologicznej traszek na poziomie międzygatunkowym. Przedstawione w rozdziale 2 cele rozprawy są sformułowane w sposób jasny, a wstęp do każdego z rozdziałów nie pozostawia wątpliwości co do zasadności podjęcia badań w tych obszarach.

W rozdziale poświęconym opracowaniu markerów MIP, autorka w sposób przejrzysty wprowadza w zagadnienie oraz podaje szereg argumentów (m.in. wysoka specyficzność, powtarzalność czy niewielkie wymagania co do ilości wyjściowego materiału), które uzasadniają podjęcie próby opracowania markerów MIP dla traszek *Lissotriton* oraz określenia ich właściwości. Przedmiotem badań w rozdziale 4 było opracowanie mapy genetycznej traszek z rodzaju *Lissotriton*. Ta część rozprawy w sposób naturalny łączy się tematycznie z poprzednim rozdziałem, bowiem w celu określenia mapy genetycznej wykorzystano markery MIP opracowane na bazie metod opisanych w rozdziale 3. Istotnym aspektem było wykorzystanie potomstwa F2 dwóch gatunków traszki, tj. *Lissotriton montanonii* oraz *L. vulgaris* w układzie dwóch niespokrewnionych rodów do zbadania zaburzeń segregacji Mendlowskiej, które mogą świadczyć o istnieniu genetycznych mechanizmów izolacji gatunkowej. Pod względem metodologicznym (wyłączając analizy molekularne), praca bazuje na szeroko cytowanej publikacji Fishman i in. 2001, stanowiącej „podręcznik” w zakresie opracowywania map genetycznych. Rozdział 5 opisuje badania nad zmiennością morfologiczną traszek. Jako grupy referencyjne dla gatunków *L. montandonii* i *L. vulgaris* wybrano dziko żyjące osobniki z populacji w Karpatach charakteryzujące się brakiem oznak admiksji (introgresja). Jako próbę referencyjną dla mieszańców wykorzystano męskie potomstwo F1 pochodzące z krzyżówki 2 osobników każdego gatunku. Dodatkowo analizom poddano dziko żyjące osobniki zebrane losowo wzdłuż 2 transektów w Karpatach, dla których znany był poziom admiksji genetycznej. Do analiz 8 cech morfologicznych (w tym 5 drugorzędowych cech płciowych) wykorzystano zdjęcia fotograficzne. Wykazano, że indeks morfologiczny bardzo dobrze różnicuje osobniki w grupach referencyjnych, choć wyniki pomiarów indywidualnych cech mają istotnie subiektywny charakter (efekt mierzącego). Badani pokazały również, że osobniki z podgatunku *L. vulgaris ampelensis* są morfologicznie zbliżone do mieszańców, co może ułatwiać introgresję prowadzącą do zastępowania mieszańców F1 osobnikami z coraz to większym udziałem genomu *L. vulgaris*.

Przytoczona literatura (w liczbie 232 pozycji), sposób opracowania wstępu, swobodny i merytoryczny styl prowadzenia dyskusji oraz opis metod pokazują, że doktorantka świetnie orientuje się w podjętej tematyce oraz że postawione wyzwanie podjęła świadoma niuansów natury metodologicznej i technicznej, towarzyszących wykorzystanym metodom molekularnym. Pragnę podkreślić, że w mojej ocenie dobór metod był właściwy, a uzyskane wyniki zostały rzetelnie przedstawione i opracowane statystycznie (np. z uwzględnieniem podwyższonego ryzyka błędu pierwszego rodzaju).

Za najważniejsze osiągnięcia pracy można uznać:

1. Zakończoną powodzeniem próbę opracowania markerów molekularnych typu MIP dla traszek z rodzaju *Lissotriton*. Mimo że ta część rozprawy ma charakter raczej techniczny, jest przykładem pracy o charakterze nowatorskim i może stanowić inspirację dla innych badaczy. Optymizmem napawa fakt, że skuteczne opracowanie markerów MIP jest możliwe dla gatunków o dużych i skomplikowanych strukturalnie genomach, dla

których sekwencja nie jest poznana. Przykładem takiej grupy mogą być rośliny nagonasienne.

2. Opracowanie mapy genetycznej, otwierającej możliwości dalszych badań nad hybrydyzacją i specjacją w rodzaju *Lissotriton*.
3. Wykazanie istnienia regionów genomu, w ramach których zachodzi zaburzenie segregacji Mendlowskiej w przypadku mieszańców F2. Mimo że nie udało się wskazać jednoznacznie na przyczyny obserwowanego zaburzenia, uważam że jest to odkrycie bardzo istotne dla dalszych badań nad hybrydyzacją u badanej grupy traszek. Perspektywy takich badań nakreśla Autorka w dyskusji w rozdziale 4.
4. Wykazanie różnic w długości map genetycznych dotychczas badanych płazów ogoniastych, wskazując przy tym na możliwe scenariusze w ewolucji tempa rekombinacji w tej grupie.
5. Ilościowa charakterystyka zmienności morfologicznej na tle poziomu admiksji genomu traszek z naturalnych transektów na tle grup referencyjnych. Wykazano przy tym, że naturalna zmienność morfologiczna może wykroczyć poza wzorce obserwowane w grupach referencyjnych. Wynik ten pokazuje, że zmienność morfologiczna nie jest ściśle związana z poziomem introgresji genomu.

Powyższe osiągnięcia stanowią wg mnie oryginalny wkład rozprawy doktorskiej do dyscypliny biologii. Rozprawa doktorska ma przy tym niewątpliwie duże znaczenie dla badań nad rolą hybrydyzacji i introgresji w kształtowaniu zmienności traszek z rodzaju *Lissotriton*.

3. Uwagi

Praca jest napisana starannym językiem, z dużą dbałością o czytelność przekazu, który ułatwiają liczne ryciny i tabele. Niemniej, korzystając z przywilejów recenzenta, podczas lektury poczyniłem nieliczne uwagi, które zamieszczam poniżej.

1. Po lekturze całej rozprawy odniosłem wrażenie, że rozdział 5, opisujący badania morfologiczne, odbiega pod względem celów od tytułu rozprawy. Umacnia mnie w tym przekonaniu stwierdzenie autorki, że (tłumacząc) „dostępność mieszańców F1 otrzymanych w krzyżówce eksperymentalnej stwarza okazję do przebadania cech morfologicznych...” (str. 29), które sugeruje, że badania morfologiczne wykonano niejako przy okazji. O ile pod względem naukowym rozdział 5 jest pełnowartościowym rozdziałem dysertacji, to jego obecność zaburza spójność tematyczną pracy. Z drugiej strony, zagadnienia podejmowane w pracy znajdują wspólny mianownik w postaci zmienności międzygatunkowej i hybrydyzacji. Być może wystarczyłoby zaproponować inny tytuł dla całej rozprawy?
2. Na stronie 46 podano wniosek, że niemal wszystkie markery MIP były polimorficzne. Można by uznać, że jest to pozytywna właściwość markerów MIP. Niemniej, przy opisie metod na stronie 36 podano, że kryterium wyboru regionów była obecność zmienności międzygatunkowej. Czy zatem wszystkie opracowane markery nie powinny być polimorficzne?
3. Na stronie 47 Autorka pisze, że przy opracowywaniu markerów genetycznych ważne jest skuteczne odfiltrowanie paralogów, szczególnie gdy markery mają być wykorzystane przy opracowywaniu mapy sprzężeń. Ciekaw jestem, czy znane są Autorce zastosowania markerów genetycznych, w przypadku których obecność paralogów byłaby dopuszczalna?

4. Na stronie 59 Autorka błędnie podaje, że statystyka opisująca pokrycie genomu przez mapę była oszacowana w oparciu o założenie równomiernego rozmieszczenia markerów, podczas gdy statystyka zaproponowana przez Fishman i in. (2001) zakłada losowe (tj. następujące wg procesu Poissona) rozmieszczenie markerów. (Przy okazji dodam, że praca źródłowa Fishman i in. (2001) nie została zamieszczona w spisie literatury!) Błędnie podano również, że testu X^2 użyto w celu sprawdzenia, czy markery rozmieszczone są równomiernie, podczas gdy faktycznie testowano czy rozmieszczenie markerów jest zgodne z rozkładem losowym. Powyższa uwaga dotyczy również omówienia wyników (str. 61), gdzie powinno pojawić się stwierdzenie, że rozmieszczenie markerów na opracowanej mapie odbiega od rozkładu losowego (a nie równomiernego!).
5. Na stronie 61 podano, że (tłumacząc z j. angielskiego) „w obrębie 5 i 2 cM mapowanych markerów znajduje się szacunkowo 99,9% i 95,3% genomu”. Czytane dosłownie, zdanie to jest niewątpliwie nieprawdziwe, choć podobne zdanie można znaleźć w pracy Fishman i in. 2001. Podane wartości odnoszą się do statystyki pokrycia, która jest w istocie dystrybucją rozkładu wykładniczego, który z kolei opisuje zmienną losową równą odległości między losowo wybranym markerem a kolejnym markerem na mapie, przy założeniu że markery są losowo rozmieszczone z intensywnością równą n/L . Zmienna $2d$ w równaniu statystyki opisuje obszar genomu (w cM) wokół losowo wybranego markera. Zatem statystyka pokrycia określa, jakie jest prawdopodobieństwo wystąpienia kolejnego markera genetycznego w odległości nie większej niż d od losowo wybranego markera na mapie. Dodatkowo, warto zwrócić uwagę, że podane prawdopodobieństwa pokrycia mogą być błędne, ponieważ rozkład markerów nie jest losowy – wartości są zapewne zbyt optymistyczne ze względu na skupiskowe rozmieszczenie markerów. Z ryciny 4.5 łatwo bowiem można zauważyć, że istnieją liczne obszary genomu o zdecydowanie słabszym pokryciu. W tej sytuacji lepszym sposobem określenia pokrycia byłoby podanie empirycznych częstości występowania markera w obrębie 5 i 2 cM od losowo wybranego markera, np. na drodze symulacji Monte Carlo.
6. Na stronie 69, dyskutując możliwe przyczyny zaburzeń segregacji Mendlowskiej Autorka sugeruje, że depresja wsobna nie jest przyczyną obserwowanych wzorców, podając przy tym jako argument fakt, że zanotowano niedobór heterozygot w loci wykazujących największe odchylenia od proporcji Mendlowskich. Warto się jednak zastanowić, czy nie jest to efekt wstępnego filtrowania markerów pod kątem obecności paralogów (str. 58) na bazie nadmiernej heterozygotyczności markerów? Wiadomo, że rozmnażanie krzyżowe sprzyja utrzymywaniu się licznych czynników letalnych w genomie. Uzyskane eksperymentalnie potomstwo F2 wykazuje znaczny stopień wsobności (0.25), przez co depresja wsobna staje się realnym czynnikiem. Zakładając podstawowy model depresji wsobnej, można się spodziewać, że recesywne czynniki letalne (potencjalnie sprzężone z niektórymi z badanych regionów) wywołają nadmiar heterozygotyczności w potomstwie F2. Być może skutecznie odfiltrowano te markery, które niosły największy sygnał depresji wsobnej?
7. Na stronie 79 podano, że dla osobników zebranych wzdłuż transektów w Karpatach określono poziom admiksji w oparciu o blisko 3 tysiące markerów SNP. Niestety, nie podano żadnych szczegółów odn. markerów (w tym sposobu uzyskania i analizy sekwencji) oraz żadnych informacji dotyczących metod analizy statystycznej w celu określenia admiksji. Jednie wskazano na niepublikowane źródło „Zieliński i in., w

przygotowaniu”. Trudno jest odnieść się do poprawności i zasadności użytych metod w sytuacji, kiedy nie podano żadnych informacji.

Wniosek końcowy

Zamieszczone uwagi i wątpliwości nie podważają mojej ogólnej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej. Dysertacja ma istotny i oryginalny wkład w poznanie zmienności badanych gatunków traszek oraz stwarza podstawy dla dalszych badań nad zagadnieniem hybrydyzacji i specjacji tych gatunków. W mojej opinii recenzowana rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595, Art. 13). Wobec powyższego wnoszę o dopuszczenie pani mgr inż. Marty Niedzickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bydgoszcz 25.07.2018

dr hab. Igor J. Chybicki

