



UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
Instytut Biologii
Świerkowa 20B, 15-950 Białystok
tel: 085 745 73 04, fax: 085 745 73 01

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

Białystok, 27.04. 2014r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Herdegen

pt. "*Phenotypic traits, genetic variation and gene flow between guppy populations in Venezuela*"

wykonanej na Uniwersytecie Jagiellońskim
pod kierunkiem dr hab. Wiesława Babika

Ocena ogólna

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej, która składa się ze zbioru dwóch opublikowanych prac oraz jednego maszynopisu, Autorka prezentuje wyniki badań z zakresu genetyki populacji, filogeografii i biologii ewolucyjnej, jakimi były: (1) określenie zróżnicowania genetycznego w loci mikrosatelitarnych i mtDNA oraz pod względem cech fenotypowych między dwoma grupami populacji gupika *Poecilia reticulata* zasiedlającymi dwie sąsiadujące ze sobą zlewnie w Wenezueli, (2) badanie zależności między heterozygotycznością a ekspresją ornamentów samców w celu testowania hipotezy zakładającej związek heterozygotyczności z dostosowaniem, (3) porównania zmienności genów MHC między regionami i między populacjami w obrębie regionów z neutralnym tłem genetycznym w postaci loci mikrosatelitarnych w celu testowania wpływu doboru równoważącego na obserwowany poziom zmienności.

Przeprowadzone badania pozwoliły na obalenie hipotezy sugerującej rolę pasma górskiego Cordillera de la Costa, jako bariery wzmacniającej niepełną barierę pre-zygotyczną między dwoma badanymi grupami gupików oraz nie wskazały obecności dwóch gatunków z tego rodzaju w badanych regionie. Autorka wykazała ponadto związek między średnią heterozygotycznością w 13 badanych loci mikrosatelitarnych i wielkością pomarańczowych plamek na ciele samców gupików, która jest cechą silnie preferowaną przez samice. Na uznanie zasługuje fakt, że Autorka, stosując techniki sekwencjonowania nowej generacji (ION PGM oraz MiSeq) wykonała analizy loci MHC i

testowała rolę doboru równoważącego w kształtowaniu struktury genetycznej populacji z dwóch regionów na tle neutralnego tła genetycznego.

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 96 ponumerowanych stron, *de facto* jest jednak znacznie obszerniejsza. Liczne tabele oraz ryciny w większości zgrupowane zostały jako materiały dodatkowe na końcu każdej z trzech części rozprawy. Autorka zamieściła oświadczenia wszystkich współautorów prac. Lista cytowanej literatury jest aktualna i bardzo obszerna, należy podkreślić, że zawiera ona najnowsze prace w dziedzinie. Rozprawa jest podzielna na trzy części. Każda z tych części posiada osobne rozdziały: Abstrakt, Wstęp, Metody, Wyniki i zakończona jest dyskusją. W rozprawie, oprócz wspomnianych trzech prac badawczych, znalazły się także: Streszczenie w języku angielskim i polskim, wprowadzenie ogólne oraz uwagi końcowe. Tytuł dobrze odzwierciedla zawartość rozprawy. Problemy naukowe zostały przedstawione przez Autorkę w sposób świadczący o jej bardzo dobrej znajomości tematyki badawczej, a badania były wykonane zgodnie ze standardami pracy laboratoryjnej, analiz komputerowych jak i statystycznej obróbki danych, w tym z zastosowaniem zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych. Przeprowadzone przez Autorkę analizy uzyskanych wyników i wnioskowanie są poprawne i zgodne z aktualnym stanem wiedzy. Sam maszynopis jest przygotowany starannie i został napisany fachowym językiem angielskim spełniającym wymagania publikacji naukowych.

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Herdegen jest kompletna i spełnia wszelkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Z pełnym przekonaniem wnoszę o dopuszczenie Autorki pracy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ocena szczegółowa

Polsko- i anglojęzyczne streszczenia zajmują nieco ponad dwie strony każde. Są one napisane zgodnie z zasadą „KISS” (*ang.* Keep it short and simple). Autorka przedstawia w obu streszczeniach problem badawczy, hipotezy i cele, a uzyskane wyniki zostały opatrzone najważniejszymi wnioskami. Język angielski nie budzi najmniejszych zastrzeżeń, jednak wersja polskojęzyczna streszczenia sprawia wrażenie bezpośredniego tłumaczenia z angielskiego, co skutkuje niekiedy sformułowaniami zapożyczonymi z tego języka, np. zmienność jest „rozdystrybuowana”, co choć nie jest błędne, w naszym ojczystym języku brzmi obco.

Część rozprawy zatytułowana „General Introduction” w bardzo dobry sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące przyczyn utrzymywania się i spadku zmienności genetycznej w naturalnych populacjach, przedstawia model specjacji allopatrycznej, rolę doboru płciowego oraz równoważącego w ewolucji oraz pokazuje, dlaczego gupiki w Wenezueli są idealnym obiektem do testowania ważnych hipotez ewolucyjnych w kontekście najnowszych badań.

Pierwsza część rozprawy obala hipotezę o obecności dwóch gatunków gupików na badanym obszarze, wskazuje na niewielką rolę Cordillera de la Costa jako bariery geograficznej (środowiskowej) we wzmacnianiu niepełnej bariery pre-zygotycznej oraz pokazuje genetyczne podobieństwo w loci mikrosatelitarnych gupików z fenotypowo zróżnicowanych populacji, co jest potwierdzeniem, że dobór płciowy jest w stanie utrzymywać różnice fenotypowe mimo przepływu genów. Praca ta jest opatrzona obszernym i starannie napisanym wstępem, gdzie omówione zostały najnowsze wyniki badań i zaprezentowane hipotezy dotyczące specjacji u gupików.

Autorka dobrze opisała skąd pochodziły badane próby, jednak według mnie skróty nazw populacji powinny nawiązywać do danego dorzecza, czy regionu, co umożliwiłoby szybką orientację podczas czytania, zwłaszcza, że napisy na Fig. 1 są mało czytelne. Różne metody statystyczne są dokładnie opisane, z podziałem na mikrosatelity, mtDNA i cechy fenotypowe. W Wynikach Autorka podaje wartości zróżnicowania genetycznego oraz najbardziej prawdopodobną liczbę genetycznie zróżnicowanych grup populacji uzyskaną z analiz mikrosatelitarnego DNA jak i cech morfologicznych. Wykonuje Ona także analizę izolacji przez dystans, IBD (zilustrowaną na przeciętnej jakości Fig. S3) i stwierdza, że znalazła niewielką korelację. Warto by tu dodać sformułowanie w jęz. angielskim „and marginally significant”, ze względu na wartość p równą 0,051. Podane są też wyniki analizy AMOVA oraz drzewo filogenetyczne dla sekwencji mtDNA. W dosyć obszernej dyskusji, która liczy 8 stron Autorka w sposób przejrzysty i logiczny omawia oraz komentuje uzyskane wyniki. Z całą pewnością ma rację, sugerując brak danych potwierdzających obecność dwóch gatunków gupików na tym obszarze. Wydaje mi się jednak, że nieco zbyt sztywno trzymając się hipotezy zerowej zakładającej rolę Cordillera de la Costa jako bariery geograficznej. Wobliczeniach, choćby AMOVA ogranicza porównanie do dywergencji między grupami populacji z dwóch dorzeczy. Uważam, że dodane takiej analizy z podziałem na dwie grupy populacji pod względem linii mtDNA, dałoby zarówno dla mikrosatelit jak i samego mtDNA obraz dywergencji zróżnicowanych genetycznie grup populacji. Taka analiza mogłaby być przeprowadzona po włączeniu populacji CAS i GUAR do grupy San Juan Drainage (adekwatnie do kolorów przedstawionych na Fig. S5 i ewentualnym odrzuceniu populacji SF). Fakt genetycznego podobieństwa populacji GUAR i CAS (dorzecze Cariaco) do populacji z dorzecza San Juan skłonił Autorkę do uznania niewielkiej roli bariery, jaką jest Cordillera de la Costa w utrzymywaniu się dywergencji genetycznej. I chociaż wniosek ten wydaje się słuszny, to mógłby być on poparty dodatkową analizą, np. wieloczynnikową analizą wariacji, którą można by przeprowadzić np. w programie DISTLM czy DISTLM*forward*. Podobna uwaga może dotyczyć porównania zmienności genetycznej i dywergencji fenotypowej.

W drugiej części rozprawy dotyczącej analizy korelacji między ogólną heterozygotycznością w loci mikrosatelitarnych i obecnością pomarańczowych plamek u samców Autorka wykazała, że ornamenty te mogą być wiarygodnym wskaźnikiem ogólnogenomowej heterozygotyczności. Autorka we wstępie w przekonujący i wyczerpujący zarazem sposób wyjaśnia, związek między heterozygotycznością a dostosowaniem w populacjach naturalnych, cytując najnowszą literaturę, w tym dotyczącą obiektu badań, tj. gupików. Autorka starannie opisuje metody genetyczne i analizy cech fenotypowych, stosuje poprawkę Bonferroni dla testów wielokrotnych i testuje modele efektu ogólnego jak i pojedynczych loci. W rozdziale „Results and Discussion” Autorka omawia i wyjaśnia uzyskanie wyników dla heterozygotyczności i cech fenotypowych dotyczących pomarańczowych plamek, jako jedynej z badanych cech fenotypowych powiązanej z MLH (multi locus heterozygosity), co jest wynikiem ważnym i interesującym. Na Fig. 1 (strona między s.55 i 56) brakuje wartości regresji. Praca ta, jest najkrótsza ze wszystkich trzech części rozprawy i jest napisana w sposób logiczny i klarowny. Autorka na jej końcu stwierdza, że ornamenty odzwierciedlające poziom heterozygotyczności mogą dawać korzyści genetyczne w ograniczonych liczebnie i wykazujących pewien stopień struktury populacjach. I chociaż Autorka podaje cytacje wskazujące na ograniczony przepływ genów, według mnie przydałaby się tutaj analiza pokazująca, jak bardzo zróżnicowane pod względem genetycznym były gupiki z badanej populacji zasiedlającej rzekę Casupo. Niewykluczone, że w tym celu pomocna byłaby analiza PCA wykonana na osobnikach zgenotypowanych w badanych loci (w programie GenAlEx). Dodatkowo, chciałbym się dowiedzieć, czy korelacja między MLH a pomarańczowymi ornamentami istnieje dla wszystkich badanych loci, a nie tylko będącymi w równowadze Hadry’ego-Weinberga i bez alleli zerowych, czy też analiza taka byłaby nieuprawomocniona, i jeśli tak, to dlaczego?

W trzeciej części rozprawy Autorce udało się wykazać związek między bogactwem allelicznym w loci MHC i neutralnych dla dobru mikrosatelitach, co podkreśla rolę dryfu genetycznego. Dywergencja między regionami w MHC była jednak mniejsza niż w neutralnych loci mikrosatelitarnych, co może oznaczać wpływ doboru równoważącego na obserwowany poziom zmienności w skali długoterminowej.

Wstęp jest napisany wzorcowo i nawet nieobyty z tematem czytelnik znakomicie się zorientuje w jego zawartości. W metodach na uznanie zasługuje zastosowanie dwóch technik sekwencjonowania NGS oraz procedury weryfikujące jakość i wiarygodność uzyskanych sekwencji. Nie odnalazłem jednak analiz istnienia sygnału doboru w samych sekwencjach MHC, np. proporcji miejsc synonimowych do nie-synonimowych, liczny mutacji w miejscu wiązania antygeny (ABS) i poza nim, czy też drzewa lub sieci ewolucyjnej badanych (a przynajmniej najczęstszych) sekwencji MHC.

W Tabeli 1 (AMOVA) nie podane zostały istotności statystyczne uzyskanych wartości wariancji. Intrygująca jest niezwykle duża liczba wykrytych alleli w MHC (380 na 440 analizowanych ampliconów). Czy Autorka wykonywała dodatkowo obliczenia dla loci MHC z uwzględnieniem tylko tych alleli (34), które wystąpiły w przynajmniej 10% prób i czy obliczenia te dały podobne wyniki/konkluzje jak dla ogółu alleli MHC? Na uwagę zasługuje zróżnicowanie średniej liczby alleli na osobnika między różnymi regionami badań, zapewne wskutek różnej liczby loci MHC oraz działanie selekcji na geny MHC, która doprowadziła do dywergencji między populacjami w danym regionie. Autorka w przekonujący sposób tłumaczy uzyskany wzorec zmienności, jako zależy od częstości efekt koewolucji gospodarza i pasożyta, który mógł też doprowadzić do mniejszego, w porównaniu z neutralnymi dla doboru mikrosatelitami, zróżnicowania genów MHC między badanymi regionami.

Podsumowanie

Rolą recenzenta jest wskazywanie słabych stron pracy, co ma na celu umożliwienie spojrzenia na problem badawczy w nieco innym świetle. Przedstawione powyżej nieliczne uwagi krytyczne w niczym nie obniżają doniosłości osiągnięć badawczych oraz wartości merytorycznej publikacji wchodzących w skład rozprawy. W mojej ocenie końcowej chciałbym podkreślić, że Autorka rozprawy podjęła próbę odpowiedzi na aktualne pytania dotyczące przyczyn dywergencji genetycznej oraz zweryfikowała rolę bariery środowiskowej, doboru płciowego oraz równoważącego w utrzymywaniu się różnic genetycznych między populacjami gupików z dwóch dorzeczy. Badania wykonane zostały prawidłowo i z zastosowaniem najnowocześniejszych metod biologii molekularnej. Praca jest nowatorska, a jej poziom naukowy oceniam jako wysoki. Stwierdzam więc, że rozprawa doktorska pt. "*Phenotypic traits, genetic variation and gene flow between guppy populations in Venezuela*" spełnia warunki, o których mówi artykuł 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule 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 jej wyróżnienie. Zwracam się zatem do Rady Naukowej Instytutu Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Herdegen do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku