Warszawa, dn. 19 sierpnia 2015 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 mgra Grzegorza Migdałka
pt. „Population genetic diversity and relationships between two closely related forest violets *V. reichenbachiana* Jordan ex Bor. and *V. riviniana* Rchb. (Violaceae) based on nuclear, plastid and AFLP markers"

Rozprawa mgra Grzegorza Migdałka napisana jest w języku angielskim i liczy 111 stron, z czego 35 zajmuje wstęp, a 22 – spis literatury. Jest to studium różnorodności genetycznej dwóch blisko spokrewnionych taksonów, między którymi możliwy jest przepływ genów. Oba taksony różnią się ploidalnością i dotychczasowe dane sugerują, że jeden z nich – *V. riviniana* – jest mieszańcem drugiego (*V. reichenbachiana*) oraz innego, nieidentyfikowanego taksonu, przy czym hybrydyzacji towarzyszyła poliploidyzacja. Mimo różnej liczby chromosomów fiołki te mogą się krzyżować. Choć pierwsze pokolenie mieszańców ma ograniczoną płodność, to u mieszańców kolejnych pokoleń liczba chromosomów może się stabilizować na poziomie gatunków rodzicielskich i dzięki temu możliwa jest introgresja. Istnieją pewne przesłanki, aby podejrzewać, że populacje mieszańcowe dobrze sobie radzą na siedliskach przekształconych przez człowieka dzięki większej różnorodności genetycznej i fenetycznej, a tym samym większej możliwości przystosowania się do lokalnych warunków, odmiennych od typowych siedlisk gatunków rodzicielskich. Autor zidentyfikował potencjalne populacje o charakterze mieszańcowym i jego rozprawa doktorska poświęcona jest przede wszystkim określeniu ich statusu oraz analizie ich różnorodności genetycznej na tle różnorodności gatunków rodzicielskich.

Doktorant wykazał, że oba gatunki fiołków mają (mniej więcej) tę samą pulę haplotypów plastydowego DNA, są też słabo rozróżnialne na podstawie sekwencji nrDNA ITS. Natomiast analiza markerów AFLP wykazała, że są one wyraźnie genetycznie odrębne. Żadna z analiz nie dowiodła mieszańcowego pochodzenia populacji wykazujących przejściowe cechy morfologiczne między gatunkami, choć nie wykluczyła introgresji, sugerowanej przez uwspólnienie puli cpDNA. Tym samym, mimo hybrydyzacji i introgresji te dwa blisko spokrewnione gatunki fiołków zachowują swoją integralność genetyczną. Są to interesujące wyniki, choć czytając pracę odnosi się wrażenie, że sam autor nie docenia ich waloru, skupiając się na zagadnieniach pobocznych, jak *barcoding*, i nie wykorzystując w pełni potencjału zebranych przez siebie danych.

Najbardziej dyskusyjną częścią pracy jest właśnie zagadnienie barcodingu. Trzeba jasno zaznaczyć, że barcoding jest konceptem wątpliwym z teoretycznego punktu widzenia. Nie ma żadnych podstaw ewolucyjnych, aby

zakładać, że da się rozróżniać gatunki roślin na podstawie sekwencji jednego albo zaledwie kilku loci, uniwersalnych dla wszystkich roślin lądowych. Powody są rozmaite i w zasadzie o wszystkich pisze doktorant we wstępie albo w dyskusji swojej rozprawy. Jego badania zresztą pokazują fiasko tego podejścia, podobnie jak wiele podobnych, wcześniejszych badań. Jak to podsumował jeden z krytyków barcodingu, sprawdza się on w zasadzie tylko w sytuacjach oczywistych, kiedy gatunki są odległe ewolucyjnie, a tym samym łatwo rozróżnialne morfologicznie, natomiast zazwyczaj zawodzi w wypadku gatunków bliźniaczych i kryptycznych, czyli wtedy, kiedy byłby najbardziej przydatny.

Markery DNA do badań różnorodności genetycznej muszą być dobierane nie pod kątem domniemanej uniwersalności dla wszystkich grup roślin, ale każdorazowo do danego problemu badawczego. Co więcej, sekwencje o dużej przydatności do barcodingu powinny wykazywać duże zróżnicowanie międzygatunkowe przy małym wewnątrzgatunkowym, podczas gdy w badaniach z zakresu różnorodności genetycznej liczy się właśnie zmienność między- i wewnątrzpopulacyjna. Gdyby doktorant przy wyborze sekwencji cpDNA nie kierował się wytycznymi literatury dotyczącej barcodingu, ale pracami o wyborze markerów molekularnych do badań populacyjnych i filogenetycznych, np. serią publikacji o wspólnymi tytule „the tortoise and the hare" [1, 2], pominąłby zapewne geny *rbcL* i *matK*, które są kompletnie nieprzydatne do analiz na niskim poziomie taksonomicznym. O niewystarczającej rozdzielczości tych markerów do analizy kompleksu *V. riviniana-V. reichenbachiana* autor mógł się zresztą wcześniej przekonać na podstawie porównania sekwencji dostępnych w GenBanku. Na szczęście dla doktoranta trzeci z wybranych markerów należy do najbardziej zmiennych sekwencji plastydowych. Uzupełnienie tego markera inną sekwencją niekodującą o dużej zmienności mogłoby zwiększyć rozdzielczość i umożliwić wyróżnienie większej liczby haplotypów cpDNA. Doktorant mógł np. wykorzystać przestrzeń międzygenową *trnS-trnG*, która była już stosowana w analizie filogeograficznej obu fiołków. Wprawdzie praca doktorska, w której tej analizy dokonano, jest wciąż nieopublikowana, ale sekwencje są od dawna dostępne w GenBanku. We wstępie doktorant cytuje też analizy filogenetyczne dla rodzaju *Viola*, w których wykorzystano intron w genie *trnL* oraz przestrzeń międzygenową *trnL-trnF*. Tym bardziej wybór genów *rbcL* oraz *matK* jest zaskakujący.

W swoich analizach zmienności cpDNA i nrDNA ITS autor użył jedynie uzyskanych przez siebie sekwencji obu fiołków. W GenBanku dostępne są sekwencje otrzymane przez innych badaczy, w tym ok. 150 sekwencji *trnH-psbA* dla rodzaju *Viola*. Wykorzystując je, doktorant mógłby sprawdzić, czy zidentyfikowane przez niego haplotypy cpDNA występują także u innych gatunków fiołków z sekcji *Viola*. Wyniki przedstawione na rycinach 18 i 19 sugerują występowanie dwóch grup haplotypów o rozmieszczeniu geograficznym raczej niż taksonomicznym – północno-zachodniej (H2, H5, H6) i południowo-wschodniej (H1, H3, H4). Lepsze próbkowanie taksonomiczne i geograficzne pozwoliłoby sprawdzić tę hipotezę. Podobnie wykorzystanie sekwencji ITS *V. riviniana* i *V. reichenbachiana* z GenBanku pozwoliłoby lepiej scharakteryzować relacje między- i wewnątrzgatunkowe.

Uwagi szczegółowe

1. Doktorant, przedstawiając zagadnienie ploidalności u fiołków, określa podstawową liczbę chromosomów jako $x = 6$ lub 7, natomiast jako wtórną liczbę dla sekcji *Viola* podaje $x_s = 10$. Jednocześnie określa badane fiołki o $2n = 20$ i 40 jako tetra- i oktoploidy, co sugeruje podstawową liczbę chromosomów równą 5.
2. Doktorant nie podaje liczby chromosomów dla domniemanych populacji mieszańcowych, co powinno być pierwszym testem sprawdzającym ich pochodzenie. Oczywiście, jak zaznacza doktorant, u mieszańców kolejnych pokoleń liczba chromosomów może ustabilizować się na poziomie gatunków rodzicielskich, niemniej jednak należało tę liczbę określić dla populacji *Vh* i *Vr'*. Co więcej, wykorzystanie w analizach AFLP populacji o niekwestionowanym mieszańcowym charakterze ułatwiłoby interpretację wyników, a zwłaszcza weryfikację statusu domniemanych mieszańców, których hybrydowego pochodzenia nie można jednoznacznie określić na podstawie liczby chromosomów. Być może dane te są zawarte we wcześniejszych publikacjach autora lub jego promotorów, jednak warto byłoby je podać przy opisie materiału badawczego.
3. We wstępie i w dyskusji doktorant szeroko cytuje literaturę przedmiotu, jednak czasem popada w dygresje luźno związane z tematem pracy. Na przykład omówienie rejonu rDNA IGS na str. 26 oraz jądrowych markerów niskokopijnych na str. 27-28 jest całkowicie zbędne, skoro autor i tak ich nie wykorzystuje. Podobnie w rozdz. 1.5 doktorant opisuje przewagi innych systemów markerów PCR nad metodą AFLP – po czym stosuje właśnie AFLP.
4. Niejasne są dla mnie powody, dla których analizy haplotypów cpDNA były powtarzane dla odrębnych podzbiorów populacji (podrozdziały 4.1.2 oraz 4.2), a nie od razu dla całości. Co więcej, analizy te są rozdzielone prezentacją wyników nrDNA. Jest to nielogiczne i można się w tym pogubić – np. na rycinach 12 i 13 (podrozdz. 4.1.2) jest wyszczególnionych pięć haplotypów, a dalej na ryc. 17 (podrozdz. 4.2) jest ich sześć, przy czym ta rycina – poza dodaniem szóstego haplotypu – jest powtórzeniem ryc. 12. Na ryc. 19 mamy dwa warianty sieci haplotypów, przy czym wariant B jest tylko uboższą wersją wariantu A i nie niesie żadnej dodatkowej informacji. Niepotrzebnie w głównym tekście prezentowane są kompletne przyrównania sekwencji (np. ryc. 7, 8, 11), a na dodatek w pomniejszeniu, co sprawia, że są nieczytelne (można je było dać do załącznika).
5. Opis zmian ewolucyjnych w sekwencjach *trnH-psbA* jest nieprecyzyjny. Wszystkie zmiany poza substytucjami są w tym wypadku indelami – a nie tylko pojedyncze wstawienie czterech nukleotydów. Takie określenia, jak SSR, STR czy sekwencje homopolimerowe, dotyczą powtarzalnych elementów sekwencji, a nie rodzaju mutacji. Charakter indelu – czy była to insercja czy delecja – można było określić przez porównanie z grupą zewnętrzną.
6. W pracy przedstawiono drzewa filogenetyczne fiołków uzyskane na podstawie *rbcL* oraz *matK* (ryciny 9 i 10). Są one raczej zbędne, ponieważ w porównaniu z publikowanymi już analizami filogenetycznymi rodzaju *Viola* i poszczególnych jego kladów nie wnoszą nowych informacji. Ta sama uwaga

dotyczy analizy sekwencji nrDNA ITS – jednej z najczęściej używanych w badaniach filogenetycznych fiołkowatych.

7. Doktorant powinien przemyśleć główne konkluzje swojej pracy – niektóre z nich to oczywistości, a inne nie wynikają z jego badań. Wniosek o słabej rozdzielczości wybranych markerów chloroplastowych w wypadku rodzaju *Viola* jest oczywisty i wynika z wcześniejszych badań. Wziąwszy pod uwagę fakt, że *V. reichenbachiana* jest mieszańcem, którego jednym z rodziców jest *V. riviniana*, a dodatkowo między nimi możliwy jest przepływ genów, nie należy się spodziewać znalezienia jednej sekwencji różnicującej te gatunki. Co więcej, aby sprawdzić przydatność potencjalnych sekwencji do barcodingu, należałoby dysponować znacznie lepszym próbkowaniem geograficznym badanych gatunków oraz grupą zewnętrzną. Konkluzje nr 3 i 5 dotyczące hybrydyzacji i introgresji nie są wnioskami z badań doktoranta, nie udało mu się bowiem jednoznacznie wykazać tych zjawisk w badanych populacjach. Zbyt daleko idzie także wniosek nr 4, uzasadniający mniejszą różnorodność genetyczną *V. reichenbachiana* w stosunku do *V. riviniana* liczbą ostoi w okresie zlodowaceń (o tym można by wnioskować jedynie na podstawie analizy filogeograficznej, która nie była wykonana). Mniejsze zróżnicowanie *V. reichenbachiana* może po prostu wynikać z jej krótszej historii ewolucyjnej w stosunku do gatunku rodzicielskiego.

Moje krytyczne uwagi w stosunku do pewnych aspektów metodycznych rozprawy oraz do interpretacji wyników nie umniejszają jej walorów, przede wszystkim bardzo interesujących wyników o wyraźnym zróżnicowaniu międzygatunkowym przy wspólnej puli haplotypów cpDNA. Głównym celem badań miało być sprawdzenie, czy populacje fiołków o cechach morfologicznie pośrednich rzeczywiście reprezentują formy mieszańcowe i introgresywne, co jest bardzo dobrze postawionym pytaniem badawczym. Odnoszę wrażenie, że kiedy nie udało się tego wykazać, doktorant próbował skonstruować alternatywną narrację, maskując negatywny wynik erudycyjnym przeglądem literatury. Było to niepotrzebne – wynik negatywny jest też dobrym wynikiem.

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 i Nauk o Ziemi UJ o dopuszczenie Pana mgra Grzegorza Migdałka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Krzysztof Spalik

---

1. Shaw, J., et al., *The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analyses.* American Journal of Botany, 2005. **92**(1): p. 142–166.
2. Shaw, J., et al., *Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III.* American Journal of Botany, 2007. **94**(3): p. 275–288.