

**Recenzja rozprawy doktorskiej**  
**Pana mgr. Sebastiana Chmielewskiego**  
pod tytułem  
**„GENOMIKA DOBORU PŁCIOWEGO ROZKRUSZKA**  
**HIACYNTOWEGO, RHIZOGLYPHUS ROBINI”**

Przedstawiona do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem Promotora Pana Prof. dra hab. Jacka Radwana oraz Promotora pomocniczego Pana dra hab. Mateusza Konczala w Pracowni Biologii Ewolucyjnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Badania opisane w pracy zostały sfinansowane z trzech źródeł: grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2017/27/B/NZ8/00077, grantu Dziekana Wydziału Biologii UAM GDWB-07/2020 oraz Minigrantu POWR.03.02.00-00-I006/17 przyznanego w ramach projektu „*Passport to the future – Interdisciplinary doctoral studies at the Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University*”. Dwa ostatnie z wymienionych grantów zostały przyznane Doktorantowi.

**Ocena formalna**

Rozprawę doktorską Pana mgr. Sebastiana Chmielewskiego stanowią trzy rozdziały – gotowe, lecz jeszcze nieopublikowane manuskrypty wieloautorskie, z których każdy odnosi się do odrębnego zagadnienia związanego z doбором płciowym. Zgodnie z oświadczeniami Doktoranta oraz Współautorów dołączonymi do rozprawy, Pan Sebastian Chmielewski miał dominujący wkład w powstanie powyższych rozdziałów. Brał udział w prowadzeniu eksperymentów, analizie danych, jak i pisaniu manuskryptów. Wspomniane rozdziały poprzedza wspólny wstęp, streszczenie w języku polskim i angielskim. Na końcu rozprawy zamieszczono krótkie podsumowanie oraz wspólną bibliografię. Praca jest napisana w języku angielskim i jest bardzo starannie zredagowana. Format przedstawionej pracy jest odpowiedni dla rozprawy doktorskiej.

## Ocena merytoryczna

Praca dotyczy zagadnień związanych z doбором płciowym u rozkruszka hiacyntowego *Rhizoglyphus robini*. Przeprowadzone w niej badania miały na celu sprawdzenie, czy dobór płciowy wpływa na poziom zmienności genetycznej w populacjach i jaki jest mechanizm takiego wpływu. Kolejnym celem było określenie architektury genetycznej leżącej u podstaw determinacji morfu samca, jak również sprawdzenie, czy architektura ta może wskazywać na uzależnienie ekspresji tej cechy od kondycji samca. Wreszcie w ramach doktoratu stworzone zostały mapy genetyczne rozkruszka, które wykorzystano do złożenia genomu referencyjnego tego gatunku do poziomu całych chromosomów. Testowano także hipotezę tłumaczącą często obserwowane różnice w częstości i umiejscowieniu crossing-over pomiędzy płciami ochroną przed elementami genetycznymi prowadzącymi do odchylenia mejotycznego. Podsumowując, tematyka recenzowanej pracy jest w mojej opinii ważna i leży w centrum zainteresowania biologii ewolucyjnej. Praca poszerza dotychczasową wiedzę i przyczynia się do rozwiązania oryginalnego problemu naukowego. W ramach pracy uzyskano także ważne zasoby genomiczne dla rozkruszka hiacyntowego, które pełniejszą interpretację wyników eksperymentów ewolucyjnych z wykorzystaniem tego gatunku modelowego w przyszłości.

We wspólnym wstępie pracy przedstawiono hipotezy dotyczące wpływu doboru płciowego na poziom zmienności w populacjach, a tym samym na zdolność populacji do adaptacji. Omówiono także hipotezy odnoszące się do ewolucji cech płciowych. Przedstawiono także pokrótce wyniki dotychczasowych badań odnoszących się do tych tematów. Wstęp w mojej opinii stanowi dobre wprowadzenie do całej pracy i jest przejrzysto napisany. Wstępy do poszczególnych rozdziałów skupiają się już na dokładniejszym zarysowaniu problematyki danego fragmentu rozprawy. Opisy metod zamieszczone w poszczególnych rozdziałach są szczegółowe i pozwalają na odtworzenie uzyskanych wyników. W dalszej części recenzji omówię wyniki zamieszczone w rozprawie, z podziałem na poszczególne rozdziały.

Rozdział *Sex-specific recombination landscape in a species with holocentric chromosomes* opisuje konstrukcję map genetycznych dla obu płci rozkruszka hiacyntowego. Badania obejmowały wyprowadzenie linii wsobnych, przeprowadzenie krzyżowań i analizę sekwencji osobników z pokolenia P, F1 i F2, tak aby precyzyjnie określić umiejscowienie i liczbę zdarzeń crossing-over zachodzących przy wytwarzaniu gamet u samców oraz samic. Autorzy podkreślają, że po raz pierwszy

otrzymano tutaj mapy dla gatunku rozdzielnopłciowego o holocentrycznych chromosomach. Mapy te posłużyły następnie do udoskonalenia – złożenia do poziomu całych chromosomów – uzyskanego wcześniej w tym samym laboratorium genomu referencyjnego rozkruszka. Wartości współczynników N50 i BUSCO, jak również zbieżność wielkości uzyskanego genomu z oszacowaniem opartym na wynikach z cytometru przepływowego pozwala wnioskować, że otrzymano referencję o dużej jakości. Ponadto, wykorzystując otrzymane mapy genetyczne, autorzy wykazali, że rekombinacja u rozkruszka hiacyntowego zarówno u samców, jak i samic, zachodzi głównie przy końcach chromosomów. Częstość rekombinacji jest natomiast dużo wyższa u samic. Ponadto skorelowali tempo rekombinacji z lokalnymi właściwościami genomu. Pokazali, że rekombinacja u analizowanego gatunku zachodzi częściej w regionach genomu bogatych w powtórzenia i ubogich w geny. Nie wykazano zależności tempa rekombinacji od zawartości par GC. Rekombinacja była także ujemnie zależna od długości chromosomów, istotność tego wyniku była jednak spowodowana przez bardzo niskie tempo rekombinacji uzyskane dla najdłuższego z chromosomów.

Przy czytaniu tej części rozprawy nasunęło mi się następujące pytanie. Autorzy piszą, że ogólnie przy konstrukcji map wykryli 516 zdarzeń crossing-over u samic i 205 u samców. Przy tworzeniu map analizowano około 180 osobników z pokolenia F2. Jeśli więc założymy, że przy mejozie konieczne jest zajście jednego crossing-over na chromosom, to wydaje mi się (nigdy nie zajmowałam się tworzeniem map genetycznych i mogę się mylić), że spodziewana liczba crossing-over w opisanym eksperymencie powinna wynosić nie mniej niż 2700 ( $8 \times 180$  u samic i  $7 \times 180$  u samców). Autorzy zaznaczają jednocześnie, że zastosowana gęstość markerów zapewniała wykrycie niemalże wszystkich zdarzeń crossing-over, być może z wyjątkiem końców chromosomów. Czy tak duża rozbieżność wskazywałaby jednoznacznie, że u rozkruszka u obu płci mejoza nie wymaga tworzenia się chiasm? Taka możliwość jest jedynie bardzo ostrożnie wspomniana w dyskusji.

W kolejnym rozdziale, zatytułowanym *The impact of sex ratio manipulation on genome-wide genetic diversity during experimental evolution*, przedstawione są wyniki ewolucji eksperymentalnej, w której manipulowano stosunkiem płci. Ewolucji podlegało 8 dużych (po 1000 osobników) populacji rozkruszka hiacyntowego, eksperyment prowadzono przez 28 pokoleń. W czterech z nich obniżono stosunek samców do samic do 1:3, w czterech natomiast stosunek ten podwyższono (3:1). Zabieg ten miał na celu odpowiednio obniżenie lub zwiększenie siły doboru płciowego. Jednocześnie utrzymywano stały stosunek obu morfów wśród samców. Po 200 osobników z każdej z populacji

z pokolenia początkowego oraz końcowego poddano następnie sekwencjonowaniu. Głównym celem eksperymentu było sprawdzenie, jak zmiana siły doboru płciowego wpłynie na poziom zmienności w populacji, co jest ważnym i otwartym pytaniem biologii ewolucyjnej. Autorzy zaobserwowali istotny spadek zmienności – mierzonej jako różnorodność nukleotydowa i estymator Wattersona – we wszystkich populacjach. Spadek ten, dla wszystkich badanych klas markerów, był odrobinę wolniejszy dla populacji o wysokim stosunku samców do samic (silniejszy dobór płciowy), choć różnica ta była istotna tylko dla markerów synonimowych. Nie wykryto różnic w efektywności doboru negatywnego. Ten wynik był odmienny od rezultatów wcześniejszego eksperymentu, w którym manipulowano intensywnością doboru płciowego poprzez zmianę udziału morfów wśród samców rozkruszka. Za potencjalne wytłumaczenie tej rozbieżności autorzy podają mniejszą siłę doboru lub też odmienną architekturę genetyczną obu cech. Ponadto, w eksperymencie zidentyfikowano grupy markerów (haplotypy), których częstość zmieniała się istotnie tylko w jednym lub w obu typach linii. Poniżej wypiszę kilka pytań dotyczących interpretacji wyników uzyskanych w tej bardzo ciekawej części rozprawy, które chciałabym zadać Doktorantowi.

- Czy test wykrywający dobór negatywny i porównujący zmiany w  $\pi$  i  $\theta$  dla markerów synonimowych i niesynonimowych (wyniki przedstawione na rycinie 2), nie powinien jako grupy kontrolnej (w szczególności dla estymatora Wattersona), używać tylko części markerów synonimowych, dobranych tak, aby spektrum częstości alleli w pokoleniu początkowym dla obu porównywanych klas markerów było zbliżone? Intuicja podpowiada, że markery rzadsze będą się łatwiej tracić z populacji zarówno pod wpływem dryfu, jak i doboru. Markery niesynonimowe, w porównaniu do synonimowych, mają zazwyczaj (i też w tym eksperymencie, co widać przy porównaniu  $\pi$  i  $\theta$  na rysunku 1) spektrum przesunięte w kierunku alleli rzadszych, więc mogą być łatwiej tracone.

- Przyglądając się wynikom przedstawionym na rycinach 5 i dodatkowej 2 wydaje się, że zmiany częstości, zachodzące najbardziej prawdopodobnie pod wpływem doboru dotyczyły dużych fragmentów chromosomów. To sugeruje, że podczas eksperymentu nie było dość czasu na oddzielenie markerów będących pod wpływem doboru od markerów tła. Czy w takiej sytuacji spodziewane jest wykrycie jakichkolwiek różnic w spadku  $\pi$  i  $\theta$  pomiędzy miejscami niesynonimowymi i synonimowymi w wyniku działania doboru oczyszczającego?

- Podobnie, czy takie zmiany rozciągające się na sporą część genomu nie zaburzają oszacowań efektywnej wielkości populacji? O ile dobrze rozumiem, zastosowana metoda zakłada, że zmiany

w częstości zachodzą niezależnie dla poszczególnych markerów i pod wpływem dryfu genetycznego, a nie doboru i sprzężenia. Wprawdzie istotne zmiany w częstościach dotyczyły niewielkiego odsetka markerów, ale jestem ciekawa opinii Doktoranta na ten temat.

- Czy zwiększenie pokrycia, poprzez podniesienie szans na wiarygodne wykrycie rzadkich (domyślnie szkodliwych) alleli mogłoby istotnie zmienić uzyskane wyniki?
- Czy ogólnie uznawana i zastosowana tutaj metoda manipulacji stosunkiem płci, jest zawsze skutecznym środkiem prowadzącym do zmiany intensywności doboru płciowego, czy można to jakoś sprawdzić?

Ostatni rozdział pracy, ***Supergene polymorphism and its role in male morph differentiation in the bulb mite, Rhizoglyphus robini*** zawiera opis analiz mających na celu określenie, jakie części genomu rozkruszka hiacyntowego *Rhizoglyphus robini* odpowiadają za determinację ekspresji morfów u samców. Przeprowadzono tutaj całogenomowe badania asocjacyjne „pool-GWAS” porównujące częstości alleli pomiędzy populacją stu samców heteromorficznych i stu samców homeomorficznych. Ponadto porównywano genomy linii wsobnych selekcionowanych w kierunku utrwalenia się jednego lub drugiego z morfów. Analizy te pozwoliły na identyfikację silnie zróżnicowanego między morfami regionu na chromosomie siódmym. Region ten obejmował ponad 3 mln par zasad i zachowywał się jak supergen (zahamowanie rekombinacji, nadmiar transpozonów). W dalszej kolejności przeprowadzono ponowną analizę sekwencji tego regionu dla osobników wykorzystanych przy konstrukcji map genetycznych. Co ciekawe, region ten różnił się pomiędzy osobnikami mającymi odrębne morfy dla trzech z czterech analizowanych rodzin. W rodzinach, w których dochodziło do segregacji w obrębie supergeny, morf heteromorficzny dziedziczył się w sposób recesywny. Poza opisanym regionem autorzy zidentyfikowali ponad 2400 markerów, których częstość była istotnie różna w analizie „pool-GWAS” lub teście asocjacji dla linii wsobnych. Autorzy zwracają uwagę, że markery te były wzbogacone w *loci* o niskiej częstości u samców homeomorficznych. Według autorów allele te miałyby mieć szkodliwy charakter i wskazywać, że ekspresja kosztownego morfu zależy od braku takich alleli u samców. Muszę przyznać, że nie rozumiem tego wniosku. Po pierwsze, wydaje mi się, że żadna z zastosowanych metod nie jest w stanie zidentyfikować zmiany genetycznej leżącej u podstaw fenotypu – ich rozdzielczość pozwala one jedynie na wskazanie regionu (haplotypu), gdzie taka zmiana może się znajdować. Po drugie, na rycinie 7 widać, że wprawdzie zidentyfikowane *loci* są wzbogacone w rzadkie allele u samców homeomorficznych, to przecież te same allele występują w wysokich

częstościach u samców heteromorficznych. Wydaje mi się więc, że allele te nie mogą być szkodliwe (w absolutnym sensie) i nie mogą uniemożliwiać ekspresji tego morfu. Prosiłabym Doktoranta o wyjaśnienie.

Podsumowując, zawartość merytoryczną przedstawionej rozprawy oceniam bardzo wysoko. Opisane badania dostarczyły bardzo wartościowych dla biologii ewolucyjnej danych i analiz. Moje wątpliwości dotyczące interpretacji niektórych wyników nie umniejszają wartości i znaczenia całej pracy.

### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska Pana mgr. Sebastiana Chmielewskiego spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2023 r. poz. 742. Doktorant potrafi samodzielnie rozwiązać problemy naukowe poprzez odpowiednio zaplanowane i przeprowadzone badania, zdobył też szeroką wiedzę z zakresu biologii ewolucyjnej, genetyki populacyjnej i genomiki porównawczej. Ponadto Doktorant opanował i stosuje z powodzeniem liczne metody i programy bioinformatyczne. Warte podkreślenia jest także uczestnictwo Doktoranta w innych badaniach prowadzonych w Zakładzie, co znajduje odzwierciedlenie we współautorstwie w wielu opublikowanych pracach. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu do dopuszczenia Pana Sebastiana Chmielewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnioskuję o wyróżnienie pracy nagrodą.

Kraków, 24.10.2024



dr hab. Katarzyna Tomala