

Gdańsk, 7 listopada 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sebastiana Chmielewskiego pt. Genomika doboru płciowego rozkruszką hiacyntowego, *Rhizoglyphus robini*

Formalna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr Sebastiana Chmielewskiego została przygotowana w Pracowni Biologii Ewolucyjnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem profesora Jacka Radwana oraz dr hab. Mateusza Konczala, który pełnił rolę promotora pomocniczego. Rozprawa składa się z trzech rozdziałów, z których pierwszy został złożony do recenzji w czasopiśmie *Genetics*, a pozostałe dwa są maszynopisami w formie artykułów naukowych. Wszystkie rozdziały są napisane w języku angielskim. Rozdziały są spójne tematycznie, a ich tematyka jest zgodna z tytułem pracy. Rozdziały poprzedzone są wstępem, zawierającym zwięzłe wprowadzenie do tematyki badań oraz opis celów pracy. Pierwszy rozdział bada różnice między płciami w rozmieszczeniu rekombinacji w chromosomach rozkruszką hiacyntowego. Drugi rozdział dotyczy wpływu natężenia doboru płciowego na niesynonimiczną zmienność genetyczną populacji tego samego gatunku. Trzeci rozdział charakteryzuje architekturę genetyczną leżącą u podstaw determinacji typu morfologicznego samca. Rozprawa zakończona jest rozdziałem przedstawiającym ogólne wnioski z cyklu prac oraz zarys możliwych kierunków kontynuacji badań w opisywanej tematyce.

Autor rozprawy deklaruje, że jego rola w powstaniu trzech maszynopisów polegała na zaplanowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu eksperymentów, izolacji DNA, analizie danych, interpretacji wyników, napisaniu pierwszej wersji maszynopisu i edycji kolejnych wersji. Udział mgr Chmielewskiego w przygotowaniu pierwszego i trzeciego rozdziału pracy został oceniony na 80%, zaś drugiego rozdziału – na 70%. Nie ma zatem wątpliwości, że mgr Chmielewski odegrał wiodącą rolę w powstaniu wszystkich trzech maszynopisów wchodzących w skład jego rozprawy doktorskiej. Wątpliwości pojawiają się natomiast odnośnie szczegółów. Zgodnie z podziękowaniami zawartymi w pierwszym maszynopisie, krzyżówki eksperymentalne zostały wykonane przez dwie inne osoby, więc wkład mgr Chmielewskiego w tę część prac nie jest do końca jasny. Wszystkie trzy prace zawierają informację, że sekwencjonowanie zostało wykonane w SNP&SEQ Sequencing Facility w Uppsali, nie jest natomiast jasne, czy przygotowanie bibliotek również zostało zlecone, czy też zostało wykonane samodzielnie przez Doktoranta bądź przez innego współautora pracy. Opis wkładu Doktoranta w poszczególne etapy prac mógłby być zatem bardziej precyzyjny. Oczywiście nie umniejsza to jego wkładu w powstanie przedstawionych maszynopisów.

Struktura rozprawy

Trzy główne rozdziały rozprawy zostały zaprezentowane w logicznej kolejności. Są one poprzedzone streszczeniem w języku polskim i angielskim, które dobrze podsumowuje ich zawartość, oraz wstępem, stanowiącym zwięzłe, precyzyjne wprowadzenie do tematyki rozprawy. Elementem, którego zabrakło we wstępie do rozprawy, jest charakterystyka aspektów biologii badanego gatunku

ważnych w kontekście tematyki rozprawy, a przede wszystkim charakterystyka systemu kojarzenia, proporcji płci oraz proporcji dwóch typów morfologicznych samców w naturalnych populacjach. W tekście można pośrednio znaleźć informacje na ten temat, np. z informacji o intensywnej konkurencji plemników o gamety samic można wyciągnąć wniosek o poliandrii. Tym niemniej jasny opis systemu kojarzenia pozwoliłby na zrozumienie pracy bez konieczności odnoszenia się do innych źródeł. Z drugiej strony, wstęp zawiera bardzo dobre wprowadzenie do problematyki doboru płciowego.

Kolejnym, krótkim rozdziałem rozprawy jest opis celów pracy. Opis ten przedstawia jednak zadania badawcze (*objectives*), które zostały utożsamione z celami pracy (*aims*). Jest to nieścisłością, gdyż realizacja zadań badawczych nie jest celem samym w sobie, lecz służy poszukiwaniom odpowiedzi na konkretne pytania (które zostały przedstawione we wstępie). Zadania badawcze są prawidłowo sformułowane i zostały one w pełni zrealizowane w poszczególnych rozdziałach rozprawy.

Struktura trzech głównych rozdziałów rozprawy jest prawidłowa. Mają one formę publikacji naukowych i zawierają wszystkie oczekiwane elementy. Wszystkie trzy główne rozdziały są bardzo obszerne i opisują bardzo rozbudowane badania.

Ostatnia część rozprawy zawiera ogólne wnioski oraz propozycje dalszych badań. Mile widzianym, choć niewymaganym elementem pracy byłaby generalna dyskusja poprzedzająca ogólne wnioski. Umożliwiłoby to syntezę uzyskanych wyników i pokazanie, w jaki sposób poszczególne rozdziały rozprawy łączą się w całość. Należy podkreślić, że pomimo powyższych uwag, rozprawa zawiera wszystkie oczekiwane elementy i jej struktura jest prawidłowa.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Znaczenie podjętej tematyki badań

Rozprawa doktorska mgr Sebastiana Chmielewskiego dotyczy wpływu doboru płciowego na zmienność genetyczną i jej rozmieszczenie w obrębie genomów. Wiedza na ten temat jest ograniczona w porównaniu z wiedzą na temat wpływu na zmienność genetyczną doboru naturalnego i doboru sztucznego. Jednocześnie jest to bardzo istotne zagadnienie, ponieważ zmienność genetyczna wszystkich organizmów posiadających płęć pozostaje pod wpływem doboru płciowego. Doktorant badał szereg ważnych zagadnień związanych z wpływem doboru płciowego na zmienność genetyczną w obrębie genomów, a także na tempo rekombinacji i rozmieszczenie miejsc o wysokim tempie rekombinacji w chromosomach. Rozprawa w znacznym stopniu przyczyniła się do rozwoju wiedzy na temat ewolucyjnych konsekwencji doboru płciowego.

Należy podkreślić, że chociaż rozprawa jest spójna tematycznie i oparta o jeden gatunek modelowy, porusza ona wiele różnych zagadnień w obrębie generalnej tematyki doboru płciowego. Obejmuje ona tak różnorodne tematy jak (1) rola doboru płciowego oraz struktury chromosomów (a w szczególności obecności lub braku centromerów) w kształtowaniu różnic w tempie rekombinacji między płciami, (2) wpływ intensywności doboru płciowego na zmienność genetyczną populacji, (3) identyfikacja polimorfizmów genetycznych odpowiedzialnych za zróżnicowanie fenotypowe samców pod wpływem doboru płciowego. Każdy z tych tematów wymagał innego podejścia analitycznego oraz szerokiej znajomości tematu, od czynników kształtujących organizację chromosomów po mechanizmy ewolucji trzeciorzędowych cech płciowych jako wiarygodnych sygnałów świadczących o jakości osobnika. Przygotowanie rozprawy o tak szerokiej skali tematycznej wymagało rozległej wiedzy w dziedzinie biologii ewolucyjnej i genetyki. Autor bardzo dobrze sobie poradził z tym zadaniem. Co więcej, w trakcie studiów doktoranckich mgr Chmielewski opublikował jako współautor siedem artykułów naukowych związanych z ogólną tematyką jego rozprawy doktorskiej, w tym jest drugim autorem artykułu opublikowanego w *Nature Ecology & Evolution*.

Cel badawczy rozprawy

Ponieważ podrozdział „Aims of the thesis” opisuje zadania badawcze jako cele pracy, podaję własną interpretację celu rozprawy, który wydaje się jasny po przeczytaniu poszczególnych rozdziałów. Celem omawianej pracy doktorskiej było zrozumienie, jaki jest wpływ doboru płciowego na zmienność genetyczną i jej rozmieszczenie w obrębie genomów, przy użyciu rozkruszka hiacyntowego jako organizmu modelowego. Cel ten został osiągnięty przez realizację następujących zadań badawczych:

- 1) złożenie genomu rozkruszka hiacyntowego w skali chromosomowej oraz zbadanie różnic między płciami w tempie rozmieszczenia rekombinacji mejotycznej w holocentrycznych chromosomach tego gatunku (Rozdział 1);
- 2) zbadanie wpływu zmian intensywności doboru płciowego na zmienność genetyczną w obrębie całego genomu (Rozdział 2);
- 3) zmapowanie wariantów genetycznych związanych z ekspresją fenotypu charakterystycznego dla walczących samców rozkruszka hiacyntowego w celu stwierdzenia, czy decyduje o niej zmienność genetyczna zlokalizowana w jednym regionie konkretnego chromosomu, czy też polimorfizmy rozproszone w całym genomie (Rozdział 3).

Wszystkie zadania badawcze zostały starannie zaplanowane i w pełni wykonane. Wykonanie tych trzech zadań badawczych i wnioski wyciągnięte na podstawie uzyskanych wyników umożliwiły osiągnięcie głównego celu pracy doktorskiej.

Metodyka badań

Metodyka prac w tej rozprawie doktorskiej miała dwa główne komponenty: eksperymentalne manipulowanie populacjami gatunku modelowego w warunkach laboratoryjnych oraz resekwencjonowanie genomów. Eksperymenty polegały na (1) stworzeniu linii wsobnych oraz ich krzyżówek F1 i F2 (rozdział 1), (2) manipulacji stosunkiem płci (rozdział 2), (3) stworzeniu linii outbredowej z trzech geograficznie odległych dzikich populacji, a także linii wsobnych, z których każda charakteryzowała się tylko jednym morfotypem samców (rozdział 3). Każdy z eksperymentów został starannie zaplanowany dla określonego celu, np. dzięki użyciu jako źródła dwóch morfotypów linii outbredowej powstałej z dzikich populacji upewniono się, że sekwencjonowane osobniki reprezentują naturalnie występujące morfotypy, bez nadmiernego nagromadzenia mutacji związanych z adaptacją do warunków laboratoryjnych. W przypadku eksperymentu z manipulacją stosunkiem płci mam jednak pewną wątpliwość: czy w tym przypadku jako punkt odniesienia nie powinna być badana również populacja ze stosunkiem płci 1:1 (lub naturalnie występującym stosunkiem płci, jeśli odbiega on od tej proporcji)?

Resekwencjonowanie genomów osobników powstałych w wyniku powyższych eksperymentów zostało wykonane przy użyciu Illumina NovaSeq6000, co jest obecnie częstym wyborem ze względu na korzystny stosunek ilości i jakości uzyskanych danych do ceny. Uzyskane sekwencje zostały poddane analizom bioinformatycznym i populacyjnym, odpowiednim dla tematyki poszczególnych rozdziałów. Metody analityczne zostały dobrze dobrane do celów pracy. We wszystkich rozdziałach metodyka została opisana szczegółowo i precyzyjnie.

Każdy z rozdziałów rozprawy, a w szczególności rozdział 1, zawiera bardzo obszerny materiał, za którym stoi ogrom pracy. Analiza danych genomicznych związana z realizacją poszczególnych zadań badawczych nie była trywialna i wymagała zarówno dobrej znajomości metod bioinformatycznych, jak i metod analitycznych w genomice (m.in. mapowanie sprzężenia, analiza tempa rekombinacji w chromosomach, identyfikacja loci pod wpływem doboru naturalnego, szacowanie efektywnej wielkości populacji, GWAS, konstrukcja drzew filogenetycznych). Metody analityczne zostały prawidłowo dobrane do celów badawczych.

Wnioski z przeprowadzonych badań

Przeprowadzone badania prowadzą do szeregu wniosków, których znaczenie wykracza poza charakterystykę genetycznych podstaw doboru płciowego u badanego gatunku.

Jednym z najważniejszych wniosków z tej pracy jest potwierdzenie hipotezy, że różnice między płciami w tempie rekombinacji i rozmieszczeniu tempa rekombinacji w chromosomach są kształtowane przez wpływ „samolubnych” elementów genomu na mejozę. Ma to ważne implikacje dla zrozumienia roli centromerów w zróżnicowaniu rozmieszczenia tempa rekombinacji w chromosomach pomiędzy samcami a samicami. Wyniki tej pracy mogą się również przyczynić do lepszego zrozumienia mechanizmu ewolucji chromosomów, a w szczególności czynników prowadzących do niezależnego powstania chromosomów holocentrycznych z monocentrycznych u różnych taksonów. W rozprawie stwierdzono również, że fragmenty chromosomów z dużą liczbą powtarzalnych elementów genetycznych charakteryzują się wysokim tempem rekombinacji, natomiast fragmenty, w których koncentrują się geny, charakteryzują się niskim tempem rekombinacji. Jest to wynik zgodny z przewidywaniami i z wcześniejszymi badaniami tempa rekombinacji u innych gatunków, tym niemniej przyczynia się on do gromadzenia informacji o tempie rekombinacji w różnych typach chromosomów, co wzbogaca naszą wiedzę na temat czynników wpływających na proces rekombinacji.

Drugi ważny wniosek z pracy dotyczy mechanizmu usuwania z genomu recesywnych, szkodliwych wariantów genetycznych wskutek doboru płciowego. Przeprowadzone badania pokazały, że mechanizm ten nie polega na bezpośredniej selekcji na podstawie indywidualnych cech fenotypowych poprzez konkurencję wewnątrzpłciową, lecz poprzez mechanizm uzależniający ekspresję niektórych trzeciorzędowych cech płciowych od jakości genetycznej wynikającej z liczby nagromadzonych szkodliwych wariantów (*genetic load*). Tym samym praca opisała mechanizm powstawania wiarygodnego sygnału (*honest signal*) jakości osobnika, który według Zahaviego (1975) jest podstawą ewolucji trzeciorzędowych cech płciowych. Autor wspomina o hipotezie Zahaviego we wstępie, ale potem już do niej nie wraca. Tymczasem ta hipoteza nadaje kontekst ewolucyjny otrzymanym wynikom dotyczącym zmienności genetycznej, co moim zdaniem zasługuje na większą uwagę.

Rozdział 3 opisuje wyniki pokazujące, że wśród loci związanych z ekspresją alternatywnych morfotypów samców oprócz „supergenu” znajdują się też SNPy rozmieszczone w obrębie całego genomu (poza chromosomem 7, w którym zlokalizowany jest supergen), a konkretnie 569 SNPów zidentyfikowanych w analizie Pool-GWAS oraz 1872 SNPów zidentyfikowanych w analizie linii wsobnych. Te dwa zbiory SNPów nie mają jednak żadnych wspólnych elementów, co w rozprawie jest tłumaczone „idiosynkratycznym wkładem pozycji genomowej w determinację ekspresji morfów samców”. Innym, prostszym wyjaśnieniem tego wyniku może być obecność dużej liczby fałszywie pozytywnych wyników wśród zidentyfikowanych SNPów. Ta możliwość powinna zostać rozważona w dyskusji.

Mam też wątpliwość odnośnie założenia, że wyższa frekwencja rzadkich alleli omawianych powyżej SNPów u morfotypu „scrambler” świadczy o większym nagromadzeniu szkodliwych wariantów (*genetic load*) u tego morfotypu w porównaniu z „walecznym” morfotypem. W rozdziale 3 nie znalazłam żadnej informacji, że zestawy 569 i 1872 SNPów były badane pod kątem doboru/neutralności. Podobna analiza do tej opisanej w rozdziale 3 została przeprowadzona w pracy Parrett et al. (2022), jednak tam Autorzy skupili się na segregujących, niesynonimicznych pozycjach. Natomiast sam fakt, że badane w rozdziale 3 SNPy są istotnie związane z ekspresją morfotypów nie świadczy o tym, że są one pod bezpośrednim wpływem doboru, ponieważ na istotny wynik może mieć wpływ nierównowaga sprzężenia (*linkage disequilibrium*, LD), szczególnie w drugim eksperymencie dotyczącym linii wsobnych. Różnice w LD mogą tłumaczyć, dlaczego w drugim eksperymencie liczba SNPów potencjalnie związanych z ekspresją morfotypów była większa. SNPy

nie będące pod wpływem doboru i zlokalizowane poza genami i sekwencjami regulatorowymi mają niewielki potencjał, aby zawierać szkodliwe warianty. Nie można wykluczyć (bez sprawdzenia tego dla zmienności ogólnogenomicznej), że większa liczba rzadkich wariantów w tych SNPach obserwowana dla morfotypu „scrambler” wynika z większej zmienności genetycznej pomiędzy samcami o tym morfotypie w porównaniu z „walecznym” morfotypem. Ponieważ wniosek o zależności ekspresji „walecznego” morfotypu od liczby nagromadzonych szkodliwych wariantów genetycznych (*genetic load*) opiera się na tym wyniku, warto się upewnić, czy uzyskane wyniki rzeczywiście odzwierciedlają tę zależność i czy jest to ich jedyna możliwa interpretacja.

Przedstawione w rozprawie wyniki umożliwiły również lepsze zrozumienie wpływu doboru płciowego na zmienność genetyczną populacji. Według Doktoranta ta wiedza może być pomocna w tworzeniu planów ochrony dla gatunków mających cechy będące pod wpływem doboru płciowego. Ten wniosek może być nieco przedwczesny, gdyż związane z tym zagadnienia nie były badane w rozprawie, np. nie wiadomo, czy dobór płciowy może opóźnić lub przyspieszać utratę zmienności genetycznej oraz efektywnej liczebności w małych populacjach. Znane są przykłady szybkiego odbudowywania się populacji po przejściu przez szyjkę od butelki (bottleneck) u silnie poligamicznych gatunków (np. północnych słoń morskich). Nie wiadomo natomiast, jakie mechanizmy umożliwiły szybki wzrost populacji w takich przypadkach. Taka wiedza byłaby bardzo przydatna, aby zrozumieć potencjalną rolę doboru płciowego w odbudowywaniu się populacji po drastycznej utracie liczebności. Rozprawa nie badała jednak tych kwestii i nie dostarczyła odpowiedniego materiału do takich badań. Nie jest to krytycyzmem; rozprawa jest bardzo obszerna tematycznie, a ten aspekt nie wynika w sposób oczywisty z badanych tematów. Każdy z rozdziałów przyniósł ważne wyniki dla biologii ewolucyjnej, ale ich wykorzystanie w kontekście genetyki konserwatorskiej wymaga dalszych badań.

Aspektem rozprawy, który wydaje się niejasny, jest związek pomiędzy genem *6Pgdh* (opisanym w pracach innych autorów pod kierunkiem prof. Radwana jako gen wpływający pozytywnie na płodność samców i negatywnie na płodność samic) a nierekombinującym „supergenem” związanym z morfotypami samców. W rozdziale 3 ten gen nie jest wspomniany, natomiast w rozdziale 2 znalazłam informację, że jest on położony w chromosomie 2, a więc nie znajduje się w obrębie „supergenu” i prawdopodobnie nie jest bezpośrednio związany z ekspresją „walecznego” morfotypu. Wydaje się, że efektywną strategią dla morfotypu „scrambler” byłaby inwestycja w płodność, aby zwiększyć szansę wygranej w konkurencji plemników. Ważne byłoby zatem zbadanie potencjalnego związku pomiędzy zmiennością genu *6Pgdh* (i jego najbliższego otoczenia, biorąc pod uwagę wspomniane w rozdziale 2 wątpliwości, czy ten gen jest rzeczywistym determinantem płodności) a morfotypami samców. Taka informacja byłaby ważna dla pełnego zrozumienia mechanizmu umożliwiającego utrzymywanie się obu morfotypów samców w populacjach badanego gatunku.

Możliwości dalszych badań w oparciu o uzyskane wyniki

Jednym z proponowanych przez Autora zagadnień do dalszych badań jest analiza genomu „scramblera”. Umożliwiłoby to bezpośrednio zbadanie mechanizmu utrzymującego polimorfizm w locus związanym ze zróżnicowaniem fenotypowym samców. Drugim proponowanym tematem przyszłych badań jest analiza sekwencji genomów roztoczy z dzikich populacji, co dałoby możliwość zbadania segregacji zmienności genetycznej związanej z doбором płciowym w środowisku naturalnym. Trzecim proponowanym zagadnieniem jest zbadanie, czy alternatywne haplotypy „supergenu” związanego ze zróżnicowaniem morfotypów samców podlegają wewnętrznemu konfliktowi płci.

Ten ostatni temat wiąże się z innym ważnym zagadnieniem, związanym z ekspresją u samic haplotypu „supergenu” związanego z „walecznym” morfotypem samców. Ponieważ opisany w rozdziale 3 „supergen” zawiera ponad 500 genów, można przypuszczać, że nie wszystkie z nich są związane z trzeciorzędowymi cechami płciowymi. Zatem można się spodziewać, że posiadanie haplotypu charakterystycznego dla jednego bądź drugiego morfotypu (bądź obu w postaci heterozygotycznej) ma wpływ na cechy fenotypowe samic, choć niekoniecznie na łatwe do obserwacji cechy morfologiczne. Wydaje się, że ta kwestia jest ważna do zbadania w kontekście międzypłciowego konfliktu genetycznego.

Podsumowanie

Wyniki badań opisane w przedstawionej rozprawie doktorskiej stanowią istotny wkład w wiedzę na temat roli doboru płciowego w kształtowaniu zmienności genetycznej populacji, w tym zmienności strukturalnej na poziomie organizacji chromosomów. Praca dostarczyła również ważnych informacji na temat genetycznego mechanizmu determinacji morfotypu samców *R. robini*.

Rozprawa została przygotowana poprawnie i starannie. Przeprowadzone badania zostały dobrze zaplanowane i prawidłowo przeprowadzone. Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w trzech maszynopisach artykułach naukowych. Pierwszy z nich został złożony do recenzji w czasopiśmie *Genetics*, a drugi – w mojej ocenie – może zostać złożony do recenzji bez większych zmian. Trzeci maszynopis wymaga pewnych zmian, lecz dotyczą one przede wszystkim interpretacji wyników. W mojej recenzji znalazło się sporo uwag, lecz w dużej mierze wynika to z dużej złożoności każdego z rozdziałów pracy i zastosowania różnorodnych sposobów analizy danych. Przedstawione w recenzji uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny tej rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Sebastiana Chmielewskiego spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Wniosuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Sebastiana Chmielewskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Przedstawione w rozprawie badania mają wysoką wartość merytoryczną i są oparte na bardzo obszernym materiale, zarówno pod względem zakresu tematycznego, jak i wkładu pracy potrzebnej do wygenerowania i analizy danych. Wniosuję zatem o wyróżnienie tej rozprawy.

Małgorzata Pilot

dr hab. Małgorzata Pilot