



Prof. dr hab. Jacek Radwan

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Macieja Matosiuka pt. „Hybridization and gene introgression between European and Siberian roe deer”.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Macieja Matosiuka składa się z dwóch opublikowanych artykułów naukowych wraz z materiałami dodatkowymi i suplementami, abstraktu w języku angielskim i streszczenia w języku polskim. Rozprawa koncentruje się na badaniu historii i przyczyn introgresji genów mitochondrialnych sarny syberyjskiej do genomu sarny europejskiej. Badania introgresji stały się w obecnej dobie powszechne nie tylko z powodu poprawy dostępności metod molekularnych do badania gatunków dziko żyjących, ale także ze względu na coraz powszechniejsze docenianie znaczenia introgresji w ewolucji i ochronie gatunkowej. Badania takie przyczyniają się do lepszego zrozumienia integralności genetycznej gatunków, powstawania barier rozrodczych czy powstawania przystosowań na drodze introgresji adaptatywnej. Zatem problem badawczy podjęty w przedstawionej mi do oceny rozprawie dobrze wpisuje się w ważny nurt współczesnej ekologii molekularnej.

Pierwsza z dwóch prac wchodzących w skład rozprawy, opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Molecular Ecology*, używa dwóch markerów mitochondrialnych (region kontrolny i cytochrom b) i czterech markerów związanych z płcią do wykazania, że w południowo-wschodniej Polsce doszło do introgresji genów mitochondrialnych sarny syberyjskiej do genomów sarny europejskiej. Introgresja genów jądrowych nie miała jednak miejsca, co oprócz wyników dla badanych markerów związanych z płcią autorzy dodatkowo wspierają wzmianką o niepublikowanych danych uzyskanych metodą RADtag. Introgresja mtDNA jest znacząca i sięga w niektórych populacjach 50%. Haplotypy sarny syberyjskiej obecne u sarny europejskiej nie zostały jak dotąd odnalezione we współczesnych populacjach tego pierwszego gatunku, co wskazuje, że mogły należeć do linii już wymarłych. Świadczy to więc przeciw możliwości introgresji w wyniku niedawnych wsiedleń sarny syberyjskiej do Europy wschodniej, które miały miejsce na początku ubiegłego wieku.

Przeprowadzone przez autorów modelowanie nisz ekologicznych sugeruje, że badane przez nich gatunki saren mogły się krzyżować po ustaniu ostatniego zlodowacenia, kiedy to warunki klimatyczne na obszarze Europy wschodniej zmieniły się ze sprzyjających sarnie syberyjskiej na korzystniejsze dla sarny europejskiej. Pojawienie się czoła ekspansji tego drugiego gatunku na obszarze wciąż zdominowanym przez ten pierwszy sprzyjało asymetrycznej introgresji: samice rzadszego gatunku są wówczas narażone na częste kojarzenia z samcami częstego gatunku. Wyniki modelowania nisz ekologicznych są bardzo ciekawe i bardzo podnoszą walory pracy, co zapewne było jednym z istotnych powodów jej docenienia przez redaktorów *Molecular Ecology*. Autorzy podjęli też próbę identyfikacji potencjalnych czynników środowiskowych tłumaczących stopień introgresji. Czynnikiem tymi okazały się pokrywa śnieżna oraz temperatura w czasie zimy. Jednak wpływu czynników środowiskowych nie udało się autorom oddzielić od wpływu czynnika geograficznego: dodanie do analizy położenia geograficznego sprawiło, że znaczenie czynników środowiskowych spadło poniżej istotności statystycznej.

Niepewność, pozostawiona przez pierwszą pracę, co do roli doboru naturalnego w introgresji genów mitochondrialnych sarny syberyjskiej do genomów sarny europejskiej, zmotywowała doktoranta do podjęcia bardziej szczegółowych analiz, które zostały przedstawione w drugiej pracy. Wyniki tych analiz zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *Journal of Evolutionary Biology*. W pracy tej autorzy poddali analizie sekwencje genomów mitochondrialnych obydwu gatunków, włączając w tę liczbę 4 mitogenomy, które uległy introgresji międzygatunkowej. Na ich podstawie autorzy dokonali analizy zmienności genomów mitochondrialnych w obrębie gatunków i pomiędzy nimi, oraz wykonali szereg testów w celu wykrycia molekularnych sygnatur doboru naturalnego. Wyniki wskazały na silne zakonserwowanie sekwencji genów mitochondrialnych, szczególnie u sarny syberyjskiej. Autorom udało się wykazać działanie doboru oczyszczającego na sekwencje genów ND?. Znaleźli też pewne poszlaki wskazujące na działanie doboru pozytywnego na niektóre kodony, jednak wyniki te nie osiągnęły progu istotności statystycznej. Doprowadziło to autorów do wniosku, że badana przez nich introgresja miała charakter neutralny, czyli była spowodowana przez dryf genetyczny.

Obie omówione powyżej prace są dobrze napisane i prezentują wysoki poziom jeżeli chodzi o użycie zaawansowanych metod analitycznych. Oprócz dobrze dobranych analiz z arsenału nowoczesnej genetyki populacyjnej i ewolucyjnej, autorzy sięgnęli też po narzędzia do modelowania nisz ekologicznych, które bardzo pomogło zinterpretować wyniki pierwszej pracy. Z załączonych oświadczeń doktoranta i współautorów wynika, że ten pierwszy odegrał zasadniczą rolę w powstaniu obu prac (całkowity wkład oceniony został na 60% i 80%). Na

szczególne podkreślenie zasługuje deklarowana przez doktoranta wiodąca rola w przeprowadzeniu analiz. Według oświadczeń doktorant wniósł również główny wkład w pisanie prac, miał współdziałać w powstaniu koncepcji pierwszej z nich oraz był autorem koncepcji drugiej z nich. Zasadniczy wkład intelektualny w powstanie tych prac nie ulega więc wątpliwości.

Abstrakt rozprawy (i jego polski odpowiednik) odbiega nieco poziomem od prac opublikowanych. Napisany jest momentami niejasno, bez odpowiednich łączników pomagających czytelnikowi dostrzec związek pomiędzy kolejnymi stwierdzeniami, wyglądającymi na oderwane od siebie. Np. w trzecim akapicie na str. 8 zdanie o modelowaniu nisz ekologicznych następuje bez wyjaśnienia, co je łączyz poprzedzającym je stwierdzeniem o odkryciu młodych linii mtDNA sarny syberyjskiej. Podobnie zorientowanie się, co autor chce czytelnikowi przekazać w pierwszym akapicie na str. 8, wymaga sporo wysiłku i domysłów. Aby rozwiązać te wątpliwości, czytelnik zmuszony jest sięgnąć do dobrze napisanych abstraktów poszczególnych prac.

Obie zawarte w rozprawie prace zostały dobrze opublikowane, co oznacza, że były już poddane osądowi kompetentnych recenzentów. Jednak w trakcie czytania moją uwagę zwróciło uwagę kilka kwestii i niejasności, które najwidoczniej nie wzbudziły wątpliwości recenzentów.

Pierwsza kwestia dotyczy interpretacji wyników drugiej pracy. Autorzy wykryli sygnatury doboru oczyszczającego tylko u sarny europejskiej, gdzie są one istotne statystycznie tylko dla genów ND. Brak sygnatury doboru oczyszczającego u sarny syberyjskiej stoi w sprzeczności ze skrajnym stopniem konserwacji białek mitochondrialnych u tego gatunku (jedynie trzy z 21 niesynonimowych podstawień miały miejsce w linii prowadzącej do sarny syberyjskiej). Autorzy nie komentują tej sprzeczności wystarczająco dogłębnie. Jednak odnosząc się do ogólnie słabych sygnatur doboru oczyszczającego stwierdzają słusznie (3-ci akapit na str. 2491), że mogą one wynikać ze stosunkowo niewielkiej mocy testów w odniesieniu do gatunków o niskiej dywergencji. Tłumaczyłoby to, dlaczego dobór oczyszczający został wykryty paradoksalnie u gatunku, u którego stosunek $d_{\text{m}}/d_{\text{s}}$ do d_{s} jest znacznie niższy. Tego samego rodzaju paradoksy pojawiają się w analizie poszczególnych genów: dobór oczyszczający wykryto w genach, które są stosunkowo słabiej zakonserwowane, co również autorzy pozostawili bez komentarza.

Kolejna kwestia dotyczy wniosku, sformułowanego pod koniec dyskusji (ostatnie zdanie na str. 2491), że badania dostarczyły dowodu przeciw adaptatywnej introgresji. Po pierwsze,

wspomniana powyżej niska czułość testów na dobór, wynikająca z niskiej dywergencji DNA badanych gatunków oznacza także, że dobór pozytywny działający na sekwencje białek mitochondrialnych był trudny, a może nawet niemożliwy do wykrycia. Po drugie, adaptatywna introgresja nie musiała oznaczać, co wydają się sugerować autorzy, niesynonimowych podstawień w mtDNA, które uległo introgresji. Możliwy wydaje się scenariusz, że ewolucja przystosowawcza następowała w ciepłym klimacie refugium sarny europejskiej (co zgadzało by się z wyższym stosunkiem dn do ds u tego gatunku), natomiast w czasie ekspansji na wschód, pozyskanie od sarny syberyjskiej genów mitochondrialnych lepiej funkcjonujących w bardziej surowym klimacie okazało się przystosowawcze na obszarze, gdzie pokrywa śnieżna zalega dłużej. Na taką interpretację wskazuje dodatkowo modelowanie nisz ekologicznych, opisane w pierwszej pracy.

Inne uwagi i pytania zebrałem poniżej w porządku, w jakim pojawiają się one w rozprawie.

Abstrakt, str. 4, 1-wszy akapit (i streszczenie, str. 7): w jaki sposób adaptatywna introgresja może przyspieszać specjację? Wydaje się, że międzygatunkowy przepływ genów decydujących o przystosowaniach powinien raczej redukować różnice ekologiczne.

Pierwsza praca:

Metody: autorzy podają, za pomocą jakich programów zaprojektowano startery ZFX, ale nie podają, na podstawie jakich sekwencji.

s. 2566, akapit 1: prosiłbym o bardziej szczegółowe wyjaśnienie, na czym polega zgodność $K=3$ z wymienionymi dalej w akapicie faktami.

s. 2567, ostatni akapit: dlaczego introgresja miałaby być silniejsza dla genów, które przepływają wolniej? Chodzi o przepływ wewnątrz, czy międzygatunkowy?

Druga praca:

s. 2486, ostatnie zdanie pierwszego akapitu: w jaki sposób klasyfikacja białek jako transbłonowe (lub nie) pomaga zdecydować, czy niesynonimowe substytucje zmieniają właściwości białek?

Powyższe wątpliwości i uwagi krytyczne nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej mgr Macieja Matosiuka. Doktorant dowiódł swojej biegłości w wyborze i posługiwaniu się szerokim wachlarzem technik analitycznych. Rozprawa świadczy ponadto o zdolności doktoranta do dostrzegania istotnych problemów badawczych, czytelnego przedstawiania wyników badań i ich poprawnej interpretacji (moje uwagi w tym względzie miały charakter polemiczny i dotyczyły interpretacji jedynie niektórych wyników). Doktorant posiadał więc kompetencje niezbędne do samodzielnego prowadzenia badań. Wyniki zaprezentowane w rozprawie dostarczyły nowej, istotnej wiedzy dotyczącej ewolucyjnej historii i przyczyn introgresji mitochondrialnego DNA sarny syberyjskiej do genomu sarny europejskiej. Wyniki te zostały przedstawione na dobrze zarysowanym tle współczesnej wiedzy na temat przyczyn i znaczenia introgresji, dostarczając istotnych danych wiedzę tę poszerzających. W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Macieja Matosiuka spełnia więc w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych. Wnioskuje zatem o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 8.03.2017

