

dr hab. Igor J. Chybicki, prof. UKW

Uniwersytet Kazimierza Wielkiego

Wydział Nauk Biologicznych

Katedra Genetyki

ul. Chodkiewicza 30

85-064 Bydgoszcz

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani **mgr Weroniki Antoľ**

pt. „**Experimental evolution of reproductive traits in *Caenorhabditis elegans***”

wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Wiesława Babika oraz dr hab. Zofii Prokop

1. Kwestie formalne

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została napisana w j. angielskim. Dysertację rozpoczynają podziękowania („Acknowledgements”) oraz streszczenie (również w języku polskim). W następnej kolejności rozprawa zawiera wstęp, gdzie zamieszczono uzasadnienie dla podjętych badań oraz cele i hipotezy badawcze, przedstawiono charakterystykę gatunku modelowego (*Caenorhabditis elegans*), a także opisano schemat eksperymentalny. Kolejne trzy rozdziały rozprawy („Study 1-3”) stanowią kopie artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych. Każdy z nich jest niezależną publikacją typu oryginalna praca badawcza. Taka struktura pracy sugeruje, że rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, co jest zgodne z wymogami zawartymi w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (zwanej dalej „Ustawą”) (Dz.U. 2016 poz. 882, Art. 13 Ust. 2). Wyniki opisane szczegółowo w artykułach są omówione wspólnie w rozdziale „Discussion”, gdzie zostały przedstawione konkluzje oraz dalsze kierunki badawcze. Ponadto, integralną częścią pracy jest spis literatury wykorzystanej we wstępie i dyskusji oraz rozdział zawierający oświadczenia dotyczące roli współautorów w badaniach opisanych w rozdziałach I-IV. Dysertację zamyka rozdział zawierający materiały dodatkowe „Supplementary material”. Całość zajmuje 84 strony.

Z oświadczeń dotyczących udziału doktorantki wynika, że pani magister Weronika Antoľ brała udział we wszystkich etapach badań, w tym w opracowaniu ich koncepcji, prowadzeniu eksperymentu, gromadzeniu i analizie statystycznej danych, opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów publikacji. Z oświadczeń współautorów poszczególnych prac wynika, że ich rola miała w większości charakter pomocniczy, co wiąże się ze specyfiką podjętych badań i jest częste dla współczesnych dysertacji. W tym miejscu pragnę podkreślić, że badania stanowiące podstawę do przygotowania niniejszej dysertacji były częściowo finansowane w ramach grantu PRELUDIUM kierowanego przez doktorantkę. Biorąc pod uwagę zarówno opis jak i deklaracje procentowego udziału współautorów w badaniach, rolę doktorantki w przedstawionych pracach można ocenić jako wiodącą i dalece satysfakcjonującą oczekiwania stawiane wobec kandydatów do stopnia doktora.

Wymogi formalne dotyczące rozpraw doktorskich zawarte w Ustawie (Art. 13 ust. 4) przewidują, że rozprawę doktorską może także stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy. W przypadku ocenianej rozprawy wspomniane kryterium jest w pełni spełnione. Wobec powyższego, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia w moim przekonaniu wymogi formalne zawarte w ww. Ustawie.

2. Ocena merytoryczna

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy zagadnienia ewolucji cech związanych z rozrodem płciowym na przykładzie organizmu modelowego *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* jest gatunkiem nicienia, u którego dominującą formą są osobniki hermafrodytyczne, a dominującym systemem kojarzenia jest samozapłodnienie. Główna hipoteza rozprawy głosi, że populacje *C. elegans*, które (w efekcie mutacji) charakteryzują się obligatoryjną allogamią (rozdzielnością płciową), będą charakteryzowały się obniżonym poziomem tzw. syndromu samozapłodnienia zarówno pod względem dostosowania (fitnessu) jak i behawioru reprodukcyjnego. W celu zweryfikowania tej hipotezy przeprowadzono eksperyment oparty na hodowli *in vitro* wyselekcjonowanego szczepu nicienia, który poddano transformacji, w wyniku której osobniki hermafrodytyczne tracą zdolność produkcji plemników i stają się funkcjonalnymi samicami. Hodowlę izogenicznej rozdzielności płciowej populacji ancestralnej przeprowadzono w czasie 97 pokoleń, przyjmując, że jest to okres wystarczający do pojawienia się nowych korzystnych mutacji stanowiących podstawę dla procesu doboru naturalnego. Dodatkowym celem pracy było określenie roli konwersji genów jako mechanizmu przywracania zdolności do samozapłodnienia w populacji.

Rozprawa została oparta na dużym, trwającym blisko 100 pokoleń eksperymencie. Wprawdzie podobne eksperymenty wykorzystujące *C. elegans* były prowadzone już wcześniej, jednak dotychczasowe badania skupiały się na mieszaninie populacji, która charakteryzowała się dość wysokim poziomem inicjalnej zmienności genetycznej. W takich warunkach proces doboru zachodzi zwykle bardzo efektywnie, w krótkim czasie prowadząc do istotnych zmian świadczących o adaptacji. W przypadku ocenianej rozprawy nowym aspektem było zainicjowanie hodowli przy skrajnie niskim poziomie zmienności genetycznej. Takie podejście stwarza okazję do naśladowania ewolucji w populacji po silnym bottlenecku, gdzie proces adaptacji opiera się jedynie na mutacjach *de novo*. Niski poziom zmienności genetycznej populacji ancestralnej implikuje niską efektywność procesu doboru w początkowej fazie eksperymentu (pomimo niskiego inicjalnego poziomu dostosowania populacji), a także stwarza okazję do dywergencji genetycznej linii hodowlanych (pomimo znacznej wielkości populacji). Atutem schematu eksperymentalnego zastosowanego w prezentowanych badaniach jest możliwość oddzielenia efektu nowych mutacji od efektu zmienności inicjalnej, co nie było możliwe we wcześniejszych eksperymentach. Dzięki temu można zakładać, że wyniki eksperymentu przedstawionego w rozprawie dotyczą odmiennego scenariusza ewolucji, niż te podejmowane we wcześniejszych badaniach (szczególnie Palopoli i in. 2015). Tym samym, w mojej ocenie, rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Pomimo blisko 100 pokoleń ewolucji nie wykazano jednoznacznie wzrostu dostosowania na skutek adaptacji, a także nie wykazano istotnych zmian w cechach behawioru

reprodukcyjnego w populacjach obligatoryjnie allogamicznych. Tym samym, główne hipotezy rozprawy nie zostały potwierdzone. Wykazano natomiast, że w czasie trwania eksperymentu populacje zwiększyły dostosowanie w efekcie adaptacji do warunków laboratoryjnych, pomimo zastosowania w eksperymencie szczepu o wysokim bazowym poziomie adaptacji do warunków *in vitro*. Dodatkowo, wykazano, że szansa zapłodnienia wzrasta wraz z czasem kontaktu samców z samicami. Ponadto wykazano, że w populacjach obligatoryjnie allogamicznych może dojść do spontanicznego przywrócenia zdolności do samozapłodnienia na skutek konwersji genów, wykazując przy tym możliwość wystąpienia niezależnych zdarzeń konwersji w różnych liniach hodowlanych.

Negatywne wyniki weryfikacji hipotez dotyczących ewolucji cech związanych z allogamią mogą, zdaniem autorki, być związane z niedostatecznym czasem realizacji eksperymentu lub niską presją selekcji związanej z allogamią, pomimo ogólnej zdolności do adaptacji opartej na nowych mutacjach, co pokazały wyniki porównań fitnessu populacji ancestralnej i potomnej (allogamicznej i kontrolnej) uzyskanej w toku eksperymentalnej ewolucji. Dodatkowo, w przypadku obserwacji behawioralnych, warunki prowadzenia obserwacji mogły stanowić potencjalny czynnik wpływający negatywnie na czułość eksperymentu.

Możliwość spontanicznego przywrócenia zdolności do samozapłodnienia na skutek konwersji genów, wykryta w eksperymentalnych populacjach, pokazała, że u badanego gatunku indukowana rozdzielnopłciowość jest niestabilna. Właściwość ta może mieć potencjalnie wpływ na interpretację wyników eksperymentu dotyczących oceny dostosowania, szczególnie, gdy konwersja miała miejsce krótko przed zakończeniem eksperymentu. Dlatego, zdaniem autorki, ważne jest monitorowanie populacji pod kątem proporcji płci, wykorzystując przy tym zarówno obserwacje jak i sekwencjonowanie DNA.

Ważnym aspektem podkreślonym wielokrotnie w ocenianej rozprawie była kwestia kryzysu rzetelności w badaniach naukowych, który związany jest z zaniedbywaniem znaczenia replikacji. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów jasno pokazują, że niedostateczna liczba powtórzeń eksperymentów może przyczynić się do wzrostu poziomu ryzyka tzw. fałszywych odkryć. W rozprawie doktorantka wykazała krytyczny stosunek do własnych obserwacji, nie szukając odkryć „na siłę”, demonstrując tym samym dystans cechujący dojrzałych naukowców. Przykładem wspomnianego ostrożnego podejścia jest dyskusja nad istotną korelacją między czasem kontaktu samców i samic a szansą zapłodnienia (str. 49 rozprawy, ostatni akapit), gdzie autorka wskazuje (*implicite*) na możliwość wystąpienia błędu I rodzaju ze względu na prowadzenie testów wielokrotnych, sugerując aby traktować wspomniane obserwacje jako wyniki wstępne wymagające dalszych badań.

Po zapoznaniu się z dysertacją nie mam wątpliwości, że doktorantka posiadała umiejętność prowadzenia badań naukowych. Świadczą o tym precyzja i komunikatywność opisu eksperymentu i interpretacji uzyskanych wyników. Praca jest przy tym zilustrowana wartościowymi rycinami, które idealnie dopełniają informacje zawarte w tekście. Dominujący udział doktorantki w redagowaniu tekstów artykułów jest nie tylko doskonałym świadectwem opanowania sztuki pisania publikacji, ale wskazuje na pogłębioną wiedzę doktorantki w

zakresie prowadzonych badań. Ponadto pragnę podkreślić, że realizacja opisanego w pracy eksperymentu stanowi olbrzymie wyzwanie organizacyjne, któremu autorka w pełni sprostała.

3. Uwagi

Recenzja dysertacji przygotowanej w formie cyklu powiązanych tematycznie opublikowanych artykułów naukowych jest niezwykle przyjemna, ponieważ zasadnicze rozdziały pracy (artykuły naukowe) były wcześniej recenzowane w trakcie procesu redakcyjnego. W rezultacie dysertacja jest dopracowana zarówno pod względem formalnym, metodologicznym jak i pod względem merytorycznym. Niemniej, podczas lektury nasunęły mi się następujące pytania, które wymieniam poniżej.

1. Wobec marginalnego poziomu zmienności genetycznej populacji wyjściowej (pokolenie 0 w eksperymencie), hipotetyczny proces ewolucji cech płciowych z założenia opierał się wyłącznie na nowych mutacjach. Ciekaw jestem, czy doktorantka zastanawiała się, jakie jest teoretyczne spektrum warunków (tj. tempo mutacji, siła doboru), dla których można by spodziewać się znaczących zmiany w populacji (np. w poziomie średniego dostosowania mierzonego w publikacji 1) w czasie 100 pokoleń.
2. Samozapłodnienie ma negatywne konsekwencje, do których zalicza się depresję wsobną, redukcję efektywnej wielkości populacji i ograniczenie przepływu genów. Niemniej, w przypadku wielu organizmów samozapłodnienie może przynosić pewne korzyści. Np. w przypadku roślin samozapłodnienie pozwala uciec przed syndromem niedoboru pyłku, co ma szczególne znaczenie w przypadku osobników izolowanych (pionierów). Czy (i ew. dlaczego) w przypadku badanego gatunku samozapłodnienie daje przewagę nad allogamią?
3. W publikacji 1 (Evol Biol) zanotowano znaczne różnice między powtórzeniami w zakresie oszacowanego fitnessu. W dyskusji podkreślono, że takie zróżnicowanie pokazuje, jak ważna jest rola replikacji w badaniach naukowych – z czym w pełni się zgadzam. Z kolei niewiele uwagi poświęcono biologicznym aspektom wspomnianego zróżnicowania między powtórzeniami. Biorąc pod uwagę izolację rozrodczą linii hodowlanych można zakładać, że w trakcie trwania eksperymentu dochodzi do akumulacji różnych mutacji w tych liniach. Chciałbym poznać opinię doktorantki odnośnie roli dywergencji genetycznej w kształtowaniu wspomnianych różnic.
4. W moim odczuciu krytyczne podejście do wyników eksperymentu, szczególnie w przypadku publikacji 1 (Evol Biol), jest nieco przesadzone. W mojej opinii, zaobserwowanie znacznego zróżnicowania między powtórzeniami i blokami dotyczącego oceny fitnessu jest interesujące i wartościowe jako takie, ponieważ w sposób klarowny demonstruje stochastyczną naturę badanego procesu ewolucji. Być może należałoby rozważyć oszacowanie prawdopodobieństwa wystąpienia istotnej adaptacji populacji w założonym czasie. W tym kontekście interesująca mogłaby być próba syntezy wyników dotyczących możliwości wystąpienia adaptacji i wystąpienia spontanicznego przywrócenia samozapłodnienia jako dwóch przeciwstawnych czynników ewolucyjnych. Jestem ciekaw opinii doktorantki na ten temat.

Drobne uwagi redakcyjne:

1. We wstępie na stronie 11 w pierwszym akapicie autorka pisze o obniżonej wariancji genetycznej gamet. Moim zdaniem, zasadniej byłoby pisać o obniżonej zmienności genetycznej gamet. W tym samym zdaniu przecinek przed „because” jest zbędny.
2. Na stronie 11, zdanie rozpoczynające się od „This loss can be the consequence...” powinno raczej brzmieć „Such a loss can be...”.
3. W ostatnim zdaniu na stronie 11 brakuje przecinka po „physiological”.
4. Na stronie 13, zdanie rozpoczynające się od „Such an approach allows the study...” powinno przyjąć brzmienie „Such an approach allows for studying adaptation based on the standing genetic variation”.
5. Na stronie 15, w zdaniu “A loss-of-function point mutation...” przecinek po (Figure S 1) jest zbędny.
6. Rycina 1 na stronie 16 w mojej opinii niewiele wnosi do wstępu.
7. W abstrakcie publikacji 1 (Evol Biol) „in” w zdaniu „Evolutionary history of predominantly selfing reproduction in has led...” jest zbędne.
8. Na stronie 41 (publikacja 2; PeerJ) brakuje kropki po zdaniu „For example, compared to closely related outcrossing species...”
9. W publikacji 2 (PeerJ) rycina 3 f i g prezentuje wyniki dotyczące zależności między cechami behawioru reprodukcyjnego a obecnością potomstwa. Zgodnie z ogólną konwencją, zmienna zależna (obecność potomstwa) powinna być przedstawiona na osi Y.

Wniosek końcowy

Dysertacja bez wątpienia stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne, a także potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W mojej opinii recenzowana rozprawa doktorska spełnia w pełni wymogi stawiane w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. 2016 poz. 882, Art. 13). Wobec powyższego wnoszę o dopuszczenie pani mgr Weroniki Antoł do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny badań, pracowitość eksperymentu stanowiącego podstawę do przygotowania rozprawy oraz skuteczność w pozyskiwaniu środków na badania wnoszę o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Bydgoszcz 7.07.2023

Igor J. Chybicki