

Wrocław, dnia 29 kwietnia 2014 r.

## Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Karola Szawaryna pt. "Filogeneza biedronek z rodzaju *Epilachna* na podstawie analizy markerów molekularnych"

### I. Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa dotyczy filogenezy dużego pantropikalnego rodzaju *Epilachna* z rodziny biedronkowatych Coccinellidae i liczy łącznie 147 stron tekstu podzielonego na 9 rozdziałów. Ostatni z nich zawiera załączniki obejmujące, oprócz tabeli z literaturowymi danymi o roślinach żywicielskich Epilachnini oraz omówienia i matrycy cech morfologicznych, kilka roboczych kladogramów wynikowych. Pozostała część ilustracyjna stanowi integralną część tekstu. W sumie jest to 45 tablic zawierających 208 detali morfologicznych w postaci półschematycznych rysunków i zdjęć SEM, kolorowych zdjęć okazów muzealnych i z natury, wykresów, kladogramów i mapek. Zestawienie cytowanego piśmiennictwa (rozdział VIII) obejmuje 95 pozycji. Rozprawa mgr. Szawaryna ma bardzo spójną, przejrzystą i logiczną konstrukcję, a równocześnie zawiera wszystkie podstawowe elementy rozprawy naukowej, takie jak wprowadzenie, cele badań, prezentacja materiału i użytych metod, analiza, wyniki, dyskusja, podsumowanie i końcowe wnioski. Zawartość pracy odpowiada jej określonej w tytule charakterowi. Nie licząc zdarzających się tu i ówdzie literówek, rozprawa napisana jest bardzo poprawnym, ścisłym językiem i od tej strony nie budzi zastrzeżeń.

### II. Ocena merytoryczna

Część wstępna rozprawy zawiera wszystko co potrzeba do umieszczenia wyników badań Doktoranta we właściwym tle i zrozumienia ich znaczenia, czyli charakterystykę badanej grupy w ujęciu historycznym, uwzględniającym najważniejsze wyniki dotychczasowych analiz filogenetycznych, podsumowanie wiedzy o rozmieszczeniu, związkach żywicielskich, zachowaniu i innych aspektach biologii Epilachnini. Zawiera również zwięzłą charakterystykę morfologii wszystkich stadiów rozwojowych na podstawie dostępnych, stosunkowo skąpych źródeł. Na podkreślenie zasługuje zamieszczenie dokładnie i czytelnie opracowanych kladogramów wynikowych z trzech najważniejszych prac o filogenezie całej rodziny Coccinellidae z lat 2009-2011, gdzie użyto tych samych markerów molekularnych co w badaniach Doktoranta. Pozwala to w najlepszy możliwy sposób ocenić obecne poglądy na pokrewieństwa Epilachnini. Dokładniej przedstawiono problemy natury nomenklatoryczno-systematycznej wynikające z niemal 200-letniej historii badań nad rodzajem *Epilachna*, istotnie rzutujące na obecną systematykę tej grupy biedronek. Autor słusznie rozgranicza fauny różnych regionów zoogeograficznych omawiając historię badań Epilachnini. Badania te często toczyły się niezależnie od siebie i prowadziły do różnych ujęć i podziałów taksonomicznych, co jest zresztą chyba najważniejszą przyczyną dzisiejszych problemów z tą grupą biedronek.

Zbadany materiał zestawiono w osobnym rozdziale w formie syntetycznej tabeli. Zalety takiego rozwiązania znacznie obniża sposób uporządkowania tej tabeli wg numerów roboczych taksonów użytych do izolacji DNA. W ten sposób pod względem taksonomii i rozmieszczenia wykaz to prawdziwy groch z kapustą, co skutecznie utrudnia szybkie zorientowanie się jakie gatunki zostały uwzględnione w analizie. Ewentualnie taki wykaz systematyczny powinien się pojawić gdzieś osobno, np. jako kolejny załącznik. Również jako załącznik widziałbym wykaz instytucji, z których pochodziły okazy wykorzystane do badań morfologicznych. W tekście rozprawy nie jest on właściwie do niczego potrzebny, nie towarzyszą mu nawet żadne podziękowania.

W ważnym rozdziale Metody Autor skupia się głównie na przedstawieniu metod i procedur molekularnych. Czyni to w sposób bardziej szczegółowy niż widzimy to w analogicznych rozdziałach publikacji naukowych, m.in. z szeregiem tabel zawierających zestawienia warunków amplifikacji i

sekwencjonowania poszczególnych fragmentów genów. Jest to w pełni uzasadnione i wręcz pożądane w rozprawie doktorskiej, której jednym z celów jest przecież wykazanie znajomości metod badawczych przez doktoranta. W rozdziale tym nie zabrakło opisu metod preparatyki morfologicznej. Tu również podano statystykę uwzględnionych taksonów, w tym reprezentowane grupy gatunkowe, oraz metody i parametry analizy kladystycznej dostosowane do analiz molekularnych.

Użyte w badaniach znaczniki są najpowszechniej używanymi markerami w badaniach molekularnych owadów i wielokrotnie dyskutowano już w literaturze ich wady i zalety. Dwa z nich to fragmenty genów jądrowych 18S i 28S, pozostałe dwa to fragmenty genów mitochondrialnych 16S i COI. Ich niewątpliwą zaletą jest rozpowszechnienie gotowych primerów i opracowanych procedur amplifikacji, co jednak niekoniecznie jest równoznaczne z przydatnością do odtwarzania filogenezy taksonów na określonych szczeblach. Dotychczas publikowane zastrzeżenia dotyczą zwłaszcza użytych genów mitochondrialnych, gdzie COI zdaje się nie nadawać do niczego innego niż rozróżnianie gatunków ze względu na wysoką saturację mutacji, a w oparciu o 16S opublikowano już wystarczająco wiele pełnych kontrowersji filogenezy, by zastanowić się nad przydatnością tego genu do tego typu analiz. Interesujące zatem, że wg oceny Doktoranta w jego analizach najbardziej przydatne okazały się właśnie markery mitochondrialne, przynajmniej jeśli tę przydatność mierzyć stopniem rozwiązania uzyskanych kladogramów i wartościami współczynników wsparcia.

Materiał, na którym oparto badania molekularne, można uznać za reprezentatywny na tyle, na ile pozwalała dostępność odpowiednio utrwalonych okazów. Uzyskano sekwencje z 67 gatunków *Epilachna* stanowiących grupę wewnętrzną. Gatunki te pochodziły z wszystkich najważniejszych centrów występowania rodzaju, tj. z kontynentalnej Afryki, Madagaskaru, Azji i Nowego Świata. Grupę zewnętrzną stanowiło 27 gatunków z 12 rodzajów należących do plemion Epilachnini (21 gat.) i Cynegetini (6 gat.) w obrębie dawnej podrodziny Epilachninae. Spośród wyższych taksonów klasyfikowanych dawniej w Epilachninae zabrakło jedynie (z powodu niedostępności materiału) przedstawicieli dwóch niewielkich monotypowych plemion Epivertini i Eremochilini. Grupę zewnętrzną uzupełniono o pojedynczych przedstawicieli dalej spokrewnionych sześciu dawnych podrodziny biedronek, z czego sekwencje dwóch uzyskano z GenBanku. W sumie analiza przeprowadzona przez Doktoranta jest z pewnością najpełniejszą jaką kiedykolwiek przeprowadzono dla Epilachnini.

Celem badań była weryfikacja hipotezy o monofiletymie megarodzaju *Epilachna* i zdefiniowanie głównych linii ewolucyjnych w jego obrębie. Cele te były realizowane wyłącznie w oparciu o metody molekularne. To zastrzeżenie słusznie jest w tytule rozprawy, należałoby je jednak uwzględnić również w opisie celów. Obliczenia przeprowadzono trzema metodami: maksymalnej parsymonii, największej wiarygodności i bayesowską, które w efekcie dały ogólnie bardzo zbliżone topografie kladogramów przy analizie połączonych matryc. Zaistniałe różnice nie były jednak bez znaczenia, jak w przypadku wariantów z jednym bądź dwoma kladami amerykańskimi, i zmusiły Doktoranta do subiektywnego wyboru jednego z nich jako modelu filogenezy do dalszych analiz i konfrontacji z cechami morfologicznymi. Wybór ten padł na drzewo bayesowskie uzyskane przy maksymalnym podziale genów na partycje i został uzasadniony dwoma argumentami, które jednak uznają za niezbyt przekonujące. Postawienie na drzewo, które implikuje jednorazowe zasiedlenie Nowego Świata zamiast dwukrotnego wydaje się pragmatyczne, ale są przykłady hipotez zakładających wielokrotne inwazje na kontynenty amerykańskie w innych grupach bezkręgowców, a i same Epilachnini są prawdopodobnie wystarczająco starą grupą by mieć szanse na więcej niż jedną taką migrację. Uporczywe utrzymywanie się dwóch odrębnych i nie zawsze siostrzanych kladów amerykańskich na większości wynikowych kladogramów może zatem nie być bez znaczenia. Drugi argument jest dużo bardziej enigmatyczny, bowiem z rozprawy nigdzie nie wynika, że sugerowane możliwości najbardziej rozbudowanej matematycznie analizy bayesowskiej zostały przez Autora w jakiś sposób wykorzystane.

Jedyna istotniejsza wątpliwość, jaka nasunęła mi się podczas lektury rozprawy mgr. Szawaryna, dotyczy niezbyt jasnej roli cech morfologicznych w przedstawionej analizie ewolucji rodzaju *Epilachna*. Autor odwołuje się do nich, choć ujętych w wersji wybitnie kadłubowej, skoro matryca obejmuje 13 cech na 100 taksonów szczebla gatunkowego. Przy takiej dysproporcji trudno spodziewać się jakichkolwiek sensownie rozwiązanych kladogramów opartych tylko na morfologii i słusznie Autor takiej próby nie prezentuje. W rezultacie jednak cechy morfologiczne nie wpłynęły w żaden sposób na wyniki analizy

filogenetycznej w tej pracy, były bowiem analizowane *a posteriori*, na bazie kladogramów molekularnych, które były jedynymi uzyskanymi. Autor analizuje po prostu jak poszczególne z wybranych cech morfologicznych "zachowują się" na drzewie molekularnym określając to "filogenetycznym mapowaniem cech" albo wprost "rekonstrukcją stanów ancestralnych cechy" na kladogramach. W tym kontekście i przy takim zakresie udziału morfologii w analizie filogenetycznej, odegrała ona co najwyżej rolę przysłowiowego listka figowego, bez żadnego realnego wpływu na wynik. Czasami nie jest to powiedziane dość jasno, jak np. przy określaniu celów rozprawy. Bardziej przekonywałoby mnie, że struktura pazurka stopy czy wentrytu VI jest homoplastyczna u *Epilachna*, gdyby wyniknęło to wprost z drzewa opartego na rzetelnej matrycy morfologicznej, niż gdy twierdzi się to wyłącznie na podstawie mapowania tych cech na drzewie stricte molekularnym. Nie bardzo widzę po temu podstawy, bo to dwie różne kategorie danych. Chyba żeby analizowane geny odpowiadały akurat za te konkretne cechy morfologiczne, ale tak przecież nie jest.

Wybór tylko 13 z, jak stwierdzono, ponad 100 wstępnie analizowanych cech morfologicznych wydaje się przesadnie restrykcyjny i subiektywny. Wskazuje to raczej na wcześnie przyjęte założenie, że cechy morfologiczne się "nie nadają" i dobór pod kątem uzasadnienia tej tezy. W istocie Autor nie dysponując kladogramami morfologicznymi, ani własnymi ani żadnymi z literatury, był skazany na taki kierunek i przyjęcie drzew molekularnych jako jedyne punktu odniesienia dla wartościowania cech morfologicznych. Do tego zadania podszedł o tyle rzetelnie, że wśród wybranych cech znalazły się te, które w historii były podstawą prób podziału rodzaju *Epilachna* na mniejsze jednostki. Szkoda jednak, że nie podjął próby nieco poważniejszego potraktowania morfologii, kwitując rezygnację z niej ogólnikowymi stwierdzeniami, że "większość z cech okazała się mocno homoplastyczna" albo - w przypadku cech samczych aparatów kopulacyjnych - "niezwykle trudna do jednoznacznego zdefiniowania i wyróżnienia ich stanów".

Także wśród 13 cech morfologicznych subiektywnie wybranych przez Autora, większość po zmapowaniu na drzewie molekularnym okazała się wielokrotnymi homoplazjami. Widać więc, że albo obrazy ewolucji *Epilachini* wskazywane przez cechy genotypu i fenotypu zupełnie się nie pokrywają, albo należy ze spokojem przyjąć, że w tej grupie homoplazje są czymś na porządku dziennym i wcale tak bardzo nie deprecjonują kladogramów morfologicznych, mimo obniżania ich współczynników. U fitofagów, jakimi są *Epilachini*, specjalnie by to nie dziwiło, jak wskazują podobne wyniki analiz filogenetycznych u innych roślinożernych chrząszczy, jak stonki czy ryjkowce. Trudno powiedzieć czy to z powodu tempa ewolucji, czy dominującej koewolucji z roślinami, cechy morfologiczne u tych grup okazują się trudnym narzędziem do rekonstrukcji filogenetycznych. Nie oznacza to jednak, że takich prób nie należy podejmować. W przypadku *Epilachnini*, porównanie obrazu ewolucji cech fenotypowych u tej jedynej dużej roślinożernej grupy i u pozostałych, generalnie drapieżnych biedronek, byłoby szczególnie interesujące naukowo. Sądząc z treści rozprawy, Autor zrezygnował z możliwości dostarczenia solidnych podstaw do takiego porównania, choć w jakimś miejscu podano informację, że badania morfologiczne nadal trwają, więc może nie wszystko stracone...

Kilka "drobnych" uwag i zastrzeżeń to:

- 1) Na s. 29 sformułowanie ...zaś *Dira* (pod nową nazwą *Adira*)... wymaga doprecyzowania, że chodzi o nazwę zastępczą z jakiegoś powodu - zapewne homonimii. Inaczej dziwnie wygląda, bo Kodeks pozwala na wprowadzanie nowych nazw tylko w określonych przypadkach, a nie "ot tak sobie".
- 2) Na s. 53 po stwierdzeniu o wytypowaniu "kilku cech charakterystycznych dla różnych grup gatunków"... wypadałoby je wymienić choćby przykładowo.
- 3) Czasami nawet w spisie literatury pojawiają się polonizmy, jak np. Turyn jako miejsce wydania publikacji książkowej.
- 4) Zastanawiam się czemu tuberkule, a nie polskie wzgórki, wyrostki, ziarenka, ziarnistości, chropowatości itp.? Sądząc z ilustracji 37E każde z tych określeń byłoby adekwatne.

Godne pochwały jest pamiętanie przez Doktoranta o Kodeksie Nomenklatury Zoologicznej i rezygnacja z formalnego nazwania wyróżnionych nowych rodzajów i wyznaczenia gatunków typowych. Tego nie powinno się robić w rozprawach doktorskich, nie będących publikacjami w rozumieniu

Kodeksu. Dla potrzeb publikacji należy jednak zmodyfikować nieco obecne diagnozy nowych kładów/rodzajów czyniąc z nich bardziej precyzyjne diagnozy różnicujące. Obecnie tylko diagnoza kładu E ma taki charakter. Powinny się również pojawić bardziej rozbudowane opisy, uwzględniające szerzej aspekt zmienności międzygatunkowej. Ze względu na liczbę gatunków wymagać to będzie sporej pracy. Nawiasem mówiąc, nie bardzo wyobrażam sobie skonstruowanie klucza do oznaczania nowych taksonów rodzajowych powstałych po podziale tradycyjnego rodzaju *Epilachna* (klady A-H) w oparciu o zestawy cech podane w dotychczasowych diagnozach.

### III. Podsumowanie

Powyższe uwagi krytyczne po części należy traktować jako przejaw dyskusji naukowej i jako całość nie wpływają one w znaczącym stopniu na ogólną ocenę pracy, która jest zdecydowanie pozytywna. Autor rozprawy metodami naukowymi zrealizował zakładany cel i, w oparciu o analizę wybranych markerów molekularnych, sformułował hipotezę filogenetyczną dotyczącą dużego rodzaju *Epilachna*. Wykazał w szczególności, że: 1) rodzaj ten w obecnym ujęciu nie jest taksonem monofiletycznym i składa się z 8 odrębnych kładów; 2) dotychczasowe próby klasyfikacji wewnątrzrodzajowej oparte na wybranych cechach morfologicznych nijak się mają do uzyskanych wyników analiz molekularnych, w stopniu sugerującym wręcz nieprzydatność morfologii do rekonstrukcji filogenetycznych u tych chrząszczy z powodu zbyt dużego poziomu homoplazji (ale i konieczność testowania znacznie większej liczby markerów molekularnych, niż użyte 4 standardowe). Ponadto Autor wykazał, że: 3) plemię *Epilachnini* stanowi grupę monofiletyczną; 4) odrębność plemienia *Cynegetini* jest wątpliwa powinno ono zostać włączone do *Epilachnini*; 5) szereg rodzajów *Epilachnini* nie stanowi taksonów monofiletycznych i ich status powinien zostać zweryfikowany. Uzyskane wyniki wyznaczają kierunki dalszych badań ewolucyjnych nad *Epilachnini* i bardzo konkretnie wskazują największe luki w dotychczasowej wiedzy o ewolucji tej grupy, jak np. konieczność dokładniejszego opracowania fauny Madagaskaru.

Problemy dotyczące taksonów liczących setki gatunków są obecnie rzadko podejmowane w rozprawach doktorskich, wymagają bowiem odpowiedniego doświadczenia i dogłębnej znajomości badanej grupy, a przede wszystkim czasu, który jest na to przeważnie zbyt krótki w dzisiejszym trybie studiów doktoranckich. Należy zatem docenić odwagę mgr. Szawaryna i jego Promotora, dr hab. Wioletty Tomaszewskiej w podjęciu się tego ambitnego zadania, oraz pogratulować końcowego wyniku. Mimo, że aspekt morfologiczny analizy filogenetycznej wyraźnie przerósł horyzonty czasowe tego doktoratu.

### Konkluzja

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa w zupełności spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w art. 13 ust. 1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie mgr. Karola Szawaryna do dalszego postępowania mającego na celu nadanie mu stopnia doktora nauk biologicznych.



prof. dr hab. Marek Wanat