



**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Karola Szawaryna
pt. „Filogeneza biedronek z rodzaju *Epilachna* na podstawie analizy markerów
molekularnych”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgra Karola Szawaryna została przygotowana pod kierunkiem Pani dr hab. Wioletty Tomaszewskiej w Pracowni Systematyki i Zoogeografii Muzeum i Instytutu Zoologii PAN w Warszawie.

Przedmiotem badań Doktoranta i głównym celem rozprawy była analiza pokrewieństw filogenetycznych w ramach plemienia Epilachini i zaproponowanie na tej podstawie systematyki badanych biedronek opartej na monofiletycznych taksonach. Doktorant dla rekonstrukcji powiązań filogenetycznych zastosował markery DNA. Powodem takiego podejścia metodycznego były dotychczasowe trudności z właściwą interpretacją cech fenotypowych wykorzystywanych w systematyce tego liczącego kilkaset gatunków taksonu. Wbrew temu co sugeruje tytuł, istotnym elementem monografii są także szczegółowe analizy morfologii, dzięki którym zdiagnozowano nowe taksony „molekularne”, dokonano redeskrpcji oraz przedstawiono przebieg ewolucji najistotniejszych cech morfologicznych stosowanych dotąd do definiowania taksonów w ramach Epilachini. Jest to eleganckie i głęboko uzasadnione merytorycznie połączenie tradycyjnej, w dobrym znaczeniu, wiedzy o morfologii badanej grupy z nowoczesnymi narzędziami taksonomii molekularnej. Dzięki takiemu połączeniu metodologii mgr Szawaryn uzyskał wiarygodną hipotezę, która w znacznej mierze sfalsyfikowała dotychczasową koncepcję taksonomiczną plemienia.

Praca pod względem formalnym ma właściwą strukturę i jest napisana jasno, dobrym językiem oraz znakomicie ilustrowana przejrzystymi i starannymi rycinami; szczególnie zdjęcia SEM są na bardzo wysokim poziomie technicznym. Jest także uważnie przygotowana, o czym świadczy minimalna liczba drobnych potknięć edytorskich, z których najistotniejsze dotyczy pomyłki w numeracji kładów (str. 96). Ponieważ zapewne praca w całości lub fragmentach będzie opublikowana po angielsku



nie będę szczegółowo wskazywał na pewne niekonsekwencje i kontrowersje terminologiczne, ale określenie „oszczęcony” (=pokryty szczecinami) budzi mój lingwistyczny sprzeciw. No i jest ten DNA, nie to DNA (str. 42). Jest jednak jeden błąd terminologiczny niezależny od języka, który Doktorant konsekwentnie powtarza w całej pracy. Wszystkie drzewa filogenetyczne nazywane są w pracy „kladogramami”, tymczasem jest tam tylko jeden kladogram wygenerowany przez MP. Wszystkie pozostałe to filogramy, drzewa, w których długość gałęzi jest proporcjonalna do liczby zmian ewolucyjnych (=substytucji). Autor zdaje się nie dostrzegać tej zasadniczej różnicy między oboma typami grafów, wspominając np. o długich gałęziach w pewnych kladogramach.

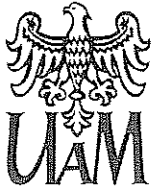
Praca doktorska rozpoczyna się wstępem, który ma charakter tryptyku. Zaczyna się przeglądem historii badań nad rodziną Coccinellidae i jej filogenezą, w drugiej części przedstawione są informacje o systematyce, morfologii, występowaniu i elementach biologii i ontogenezy Epilachnini, na koniec czytelnik zapoznany zostaje z problemami dotyczącymi nomenklatury, historią badań, systematyką i występowaniem rodzaju *Epilachna*. Zamysł stopniowego przejścia od informacji o rodzinie, przez plemię do rodzaju jest jedną z możliwych koncepcji struktury wstępu, jednak mimo zręcznej narracji jest to konstrukcja nieco chaotyczna. Informacje historyczno-taksonomiczne i nomenklatoryczne pojawiają się w trzech miejscach, zoogeograficzne w dwóch, a dane dotyczące biologii, być może prezentujące faktyczny, wycinkowy stan wiedzy, mają charakter przyczynkarski i nie są dalej rozwijane w tekście. Brak jest natomiast we Wstępie podstawowej informacji, np. w formie tabeli, przedstawiającej przyjmowaną w pracy systematykę Epilachnini, która stanowiłaby punkt odniesienia do analizy rezultatów. Spis rodzajów pojawia się dopiero w Dyskusji, zdecydowanie z późno. Niemniej mimo tych zastrzeżeń uważam, że przedstawienie przez Doktoranta złożoności i niejednoznaczności dotychczasowych analiz systematycznych opartych na danych morfologicznych stanowi dobre uzasadnienie dla podjęcia przez niego analiz opartych na potencjalnie bardziej obiektywnym kryterium filogenezy molekularnej.



Mocną stroną rozprawy jest metodyka. Przy analizie dużego taksonu, a takim są Epilachnini, umiejętne próbkowanie odgrywa zasadniczą rolę. Autor w sposób przemyślany wybrał 67 gatunków reprezentujących wszystkie wyróżniane grupy gatunków w rodzaju *Epilachna* (11% opisanych gatunków) oraz 27 gatunków z pozostałych rodzajów dawnej podrodziny Epilachninae. Jako bardziej odległe grupy zewnętrzne zastosowano 6 gatunków reprezentujących sześć pozostałych podrodziny dawnej rodziny Coccinellidae. W ten sposób uzyskano reprezentację całej różnorodności taksonomicznej Epilachnini i potencjalnych grup siostrzanych. Równie odpowiednio dobrano cztery markery filogenetyczne, które objęły zarówno mitochondrialny jak i jądrowy DNA oraz potencjalną zmienność od poziomu gatunku (COI) do dywergencji w ramach rodziny i wyżej (18S rDNA). Nie budzą także wątpliwości zastosowane metody analityczne, MP, ML i wnioskowanie bayesowskie, jak i oprogramowanie filogenetyczne.

Pewna niekonsekwencja dotyczy analizy ML za pomocą RAxML. Jak Doktorant słusznie zauważył RAxML dla danych nukleotydowych opiera się wyłącznie na modelu GTR. Skoro optymalne modele wyznaczone dla poszczególnych markerów były różnorodne (tab. 13), to może właściwiej byłoby zastosować program do ML, który precyzyjnie stosowałby odpowiednie modele (np. Garli). Rozsądnym posunięciem było sprawdzenia saturacji dla poszczególnych miejsc kodonowych w COI. Chciałbym jednak wiedzieć dlaczego, mimo zapowiedzi przeprowadzenia testu wysycenia wyłącznie dla markera kodującego białko, Autor określił poziom saturacji dla wszystkich zastosowanych genów? Mam z tą analizą jeszcze jeden problem. Nie dostrzegłem, na jakiej podstawie określono poziom wysycenia trs/trv, jakie miary statystyczne upoważniły Autora do stwierdzenia, że jakaś partycja uległa nieznacznemu wysyceniu, wysyceniu lub nie była wysyciona?

W prezentacji rezultatów analiz filogenetycznych napotykamy na pewne sformułowania, które są niespójne. Poszczególne geny były analizowane tylko za pomocą ML (RAxML), matryce kombinowane trzema metodami. Powodem ma być to, że RAxML pozwala na analizę z uwzględnieniem różnych modeli dla poszczególnych partycji oraz to, że możliwe jest uruchomienie programu na zewnętrznym serwerze, co



znacznie oszczędza czas. Zwracam uwagę Autorowi, że MrBayes (albo BEAST) również umożliwia analizę partycjonowaną, w dodatku z modelem precyzyjnie dopasowanym do poszczególnych partycji (RAxML tylko GTR, jak Autor sam pisał). Na marginesie modeli – sugerowałbym dla COI przeprowadzić analizę dla całego markera z zastosowaniem modelu kodonowego zamiast podziału na trzy partycje z modelem dla każdego miejsca kodującego. Tutaj na placu boju zostaje wyłącznie Garli i MrBayes. Argument z zewnętrznym serwerem też jest chybiony, gdyż są zewnętrzne serwery pozwalające uruchomić analizę bayesowską, a w samej Warszawie można w tym celu skorzystać z platformy obsługi nauki PLATON U3 (kontakt przez NASK lub UW).

Rezultaty pochodzące z markerów jądrowych i mitochondrialnych są dosyć rozbieżne, czemu Doktorant poświęca trochę zbyt mało uwagi; nie sądzę, by to był problem artefaktu LBA, gdyż na drzewie filogenetycznym nie ma w pobliżu innej długiej gałęzi jako atraktora. Proszę zauważyć, że duże problemy dotyczą grupy zewnętrznej w analizie markerów jądrowych, gdzie szczególnie *Coccinella* (w 18S i 28S rDNA) oraz *Exochomus* (28S rDNA) mają bardzo długie gałęzie i „skaczą” po całym drzewie. Nie widziałem matryc danych, ale wygląda to na ewidentny błąd przyrównania. Czy Autor oparł się wyłącznie na automatycznym przyrównaniu czy też dokonał ręcznych poprawek błędów, które w przypadku zmiennych fragmentów genu są zawsze obecne w automatycznym przyrównaniu?

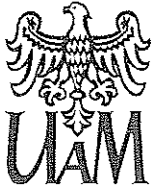
W moim przekonaniu wymienione wyżej usterki i wątpliwości metodyczne nie mają istotnego wpływu na uzyskany końcowy rezultat. Tym rezultatem jest hipoteza filogenetyczna oparta na matrycy kombinowanej dla 4 markerów. Jest ona w znacznym stopniu spójna pomiędzy poszczególnymi algorytmami filogenetycznymi i we wszystkich przypadkach ma silne wsparcie dla większości zrekonstruowanych węzłów. Doktorant, jako hipotezę finalną, wybrał do dalszych rozważań drzewo bayesowskie. Uważam, że słusznie, choć argumenty za jej wybraniem są kontrowersyjne. Zdaniem Autora jest to analiza „najbardziej rozbudowana matematycznie”. Nie koniecznie, jest ona oparta na prostym wzorze prawdopodobieństwa końcowego Bayesa i sposób dochodzenia do optymalnego drzewa bardziej przypomina rzucanie kostką niż skomplikowane obliczenia



matematyczne. Wynik analizy bayesowskiej jest szacunkiem, drzewo ML jest wyliczone i to ta metoda jest bardziej rygorystyczna matematycznie. Niemniej rezultaty obu analiz są zwykle niemal identyczne i tak jest również w przypadku zaprezentowanym przez Doktoranta. W tym konkretnym przypadku również wybrałbym rezultat BI ze względu na lepiej dopasowane modele do poszczególnych partycji.

Na podstawie finalnego drzewa filogenetycznego mgr Szawaryn wykonał mapowanie cech morfologicznych, które są kluczowe w dotychczasowej klasyfikacji plemienia Epilachini. Są to bardzo interesujące, najbardziej wartościowe rezultaty pracy doktorskiej mgr Szawaryna. Mówiąc krótko rezultaty te podważyły niemal całkowicie dotychczasową strukturę taksonomiczną Epilachini opartą na cechach morfologicznych. Praktycznie wszystkie mapowania wskazują, że analizowane cechy są w znacznym stopniu homoplastyczne (rewersje lub konwergencje) i klasyfikacja na nich oparta jest błędna. Przedstawiona nowa koncepcja struktury taksonomicznej Epilachini jest przekonująca w świetle uzyskanych rezultatów molekularnej rekonstrukcji filogenetycznej, a konsekwencje taksonomiczne – zdefiniowanie 7 nowych rodzajów i „degradacja” kilku dotychczasowych rodzajów (tego ostatniego Autor formalnie nie przeprowadził), są dobrze uzasadnione. Ukoronowaniem tych rezultatów są deskrypcje rodzajów (tymczasowo określanych kolejnymi numerami kładów), które są przygotowane według najlepszych standardów opisu taksonomicznego stosowanego w tej grupie owadów.

Podsumowując uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa mgra Szawaryna stanowi oryginalne dzieło naukowe, a uzyskane wyniki są dobrze uzasadnione rezultatami odpowiednio zastosowanych narzędzi filogenetycznych i metod klasycznej systematyki morfologicznej. Stosunkowo duża liczba uwag dotyczących analizy filogenetycznej wynika raczej ze złożoności metodycznej opracowania i nie ma charakteru krytyki deprecjonującej pracę Doktoranta. Są raczej komentarzami, uzupełnieniami lub polemiką, które nie dotyczą aspektów pracy mogących istotnie ważyć na końcowych rezultatach. Uważam, że rezultaty te są wiarygodne i oryginalne, w znaczący sposób stanowiące *novum* naukowe. Autor wykazał zarówno wystarczające



kompetencje w stosowaniu nowoczesnych narzędzi taksonomii molekularnej jak i profesjonalizm w znajomości morfologii, zoogeografii i systematyki badanej grupy biedronek.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska mgra Karola Szawaryna pt.: „Filogeneza biedronek z rodzaju *Epilachna* na podstawie analizy markerów molekularnych” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w świetle art. 13, rozdz. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 i niniejszym wnoszę o dopuszczenie mgra Szawaryna do jej publicznej obrony.

Poznań, 9 maja 2014

Prof. dr hab. Jacek Dabert