



dr hab. **Paweł Mackiewicz**, prof. nadzw. UWr

ul. F. Joliot-Curie 14a | 50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 63 03
pamac@smorfland.uni.wroc.pl

Wrocław 12.04.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Chunlian Li pt. "
*Use of molecular tools (multi-gene approach) in building
a cladistic framework of selected families of araphid
diatoms.*"**

Mimo, że wiele grup organizmów jest intensywnie badanych od wielu lat, a nawet stuleci, wiedza na temat bioróżnorodności naszych ekosystemów jest wciąż niepełna. Ten niedobór informacji dotyczy zwłaszcza wielu grup jednokomórkowych eukariontów zwanych protistami, które o wiele trudniej pozyskuje się ze środowiska i bada pod względem morfologicznym ze względu na brak wielu cech diagnostycznych i duże prawdopodobieństwo wykształcenia się cech niezależnie w różnych liniach filogenetycznych.

Jedną ze słabiej przebadanych grup są okrzemki o bardzo małych komórkach z rodziny Fragilariaceae. Rodzaje zaliczane do tej rodziny są szczególnie trudne w identyfikacji. Co ciekawe, zastosowanie dotychczasowych filogenetycznych analiz molekularnych tylko skomplikowało problem, ponieważ po ich zastosowaniu okazało się, że żaden z dotychczas wyróżnianych rodzajów nie jest monofiletyczny. Rodzina ta jest ważna z punktu widzenia praktycznego, ponieważ wiele rodzajów zaliczanych do tej rodziny jest wykorzystywanych do oceny jakości wody i rekonstrukcji środowisk. Niestety ze względu na małe rozmiary tych okrzemek i brak ustalonych cech diagnostycznych, jest ona często pomijana w badaniach środowiskowych.

Dlatego bardzo słusznie ambitnym przedmiotem pracy doktorskiej Pani mgr Chunlian Li stała się rewizja taksonomiczna i określenie historii ewolucyjnej całej rodziny Fragilariaceae.

Przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej są dwa artykuły. Jeden opublikowany w *Journal of Phycology* 52, 1018–103 w 2016 roku pod tytułem "Ultra-structural and molecular characterization of diversity among small araphid diatoms all lacking rimoportulae. I. Five new genera, eight new species." z autorami: Chun L. Li, Matt P. Ashworth, Andrzej Witkowski, Christopher S. Lobban, Izabela Zgłobicka, Krzysztof J. Kurzydłowski oraz Song Qin. Drugi artykuł został przyjęty do druku w czasopiśmie *Phytotaxa* w 2018 roku pod tytułem "The morphology and molecular phylogenetics of some marine diatom taxa within the Fragilariaceae, including twenty undescribed species and their relationship to Nanofrustulum, Opephora and Pseudostaurosira" z autorami: Chun L. Li, Andrzej Witkowski, Matt P. Ashworth, Przemysław Dąbek, Shinya Sato, Izabela Zgłobicka, Małgorzata Witak, Jong Seong Khim, Chun-Jung Kwon.

W obu pracach doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Jak wynika z załączonych oświadczeń udział doktorantki w tych pracach wynosi odpowiednio 68% i 64%. Doktorantka wykonała główną część pracy, jak: zbieranie materiału, projektowanie i przeprowadzanie eksperymentów w tym izolowanie materiały genetycznego i jego namnażanie, wykonywanie analiz morfometrycznych oraz filogenetycznych. Ponadto interpretowała uzyskane dane morfologiczne i molekularne oraz pisała i poprawiała artykuły.

Poza dwoma artykułami, do pracy doktorskiej dołączono także podsumowanie w języku polskim i angielskim, a także również w języku angielskim wstęp dotyczący okrzemek oraz opis celów i hipotez pracy doktorskiej oraz analizowanego materiału i zastosowanych metod.

Jeśli chodzi o tytuł rozprawy, to uważam, że niepotrzebnie w nawiasie podano szczegółowe podejście multi-gene approach, ponieważ zastosowano również inne metody. Ponieważ głównym przedmiotem badań były okrzemki z rodziny Fragilariaceae, można było uwzględnić tą nazwę w tytule podkreślając, że skupiono się na tej grupie.

Podsumowania są napisane przejrzysto i zawierają najważniejsze idee pracy. We Wstępie doktorantka przystępnie i w wystarczający sposób scharakteryzowała grupę okrzemek pod względem morfologicznym i ekologicznym. Uwzględniono ich rolę w ekosystemie oraz znaczenie w bioimonitoringu, produkcji biopaliw i rekonstrukcji paleośrodowisk. Opisano także pochodzenie okrzemek i systemy klasyfikacyjne tradycyjne i oparte o dane molekularne. Wyeksponowano problem sztuczności klasyfikacji i parafiletizmu wydzielonych grup okrzemek, co uzasadnia

również sens pracy doktorskiej. Osobny rozdział poświęcono problemowi okrzemek bezrafowych rodziny Fragilariaceae, podkreślając zmiany w przynależności rodzajów do tej rodziny oraz jej parafiletizm.

Mam jednak kilka uwag. Doktorantka podała, że plastydy okrzemek zostały nabyte w ramach endosymbiozy drugorzędowej, jednak obecnie coraz więcej dowodów wskazuje, że była to endosymbioza trzeciorzędowa lub jeszcze wyższego rzędu. Ponadto, strzałki na rysunkach powinny być skierowane od opisu do obiektu, a nie odwrotnie. Sądzę, że termin "every time the diatoms undergo mitosis" jest niewłaściwy, bo okrzemki nie dzielą się przecież cały czas tylko od czasu do czasu. Używanie terminu chloroplast, który pojawia się we wstępie oraz w artykułach, jest niewłaściwe, ponieważ ten termin jest dedykowany do plastydów przedstawicieli supergrupy Archaeplastida (obejmującej krasnorosty, galukofity i rośliny zielone). Zamiast tego powinien być używany tutaj termin plastyd.

Cele pracy, postawione hipotezy i ich uzasadnienie są poprawnie sformułowane i wszystkie zostały właściwie zrealizowane. Opisy w rozdziale Materiały i Metody, są jasne i poprawne. Należy podkreślić, że materiał pobrano z bardzo zróżnicowanych środowisk. Nie mam zastrzeżeń do rzetelnie przeprowadzonych analiz. Jednak w opisie analiz filogenetycznych nie podano jawnie jakie partycje zastosowano mimo, że wcześniej podano, że jest to istotne. Czy były to partycje dla: regionów sparowanych i niesparowanych w SSU rDNA, trzech pozycji w kodonie osobno dla dwóch genów plastydowych czy odpowiednie pozycje w kodonach z obu genów zostały połączone? Czy sprawdzono, że model GTR+G+I zastosowany w analizach opisanych w obu artykułach jest najlepiej pasującym modelem podstawień?

W pierwszym artykule skupiono się na rewizji taksonomicznej bezrafowych okrzemek o małych rozmiarach komórek zebranych ze strefy litoralnej z różnych miejsc na świecie. Dzięki tym analizom opisano pięć nowych rodzajów dla nauki: *Castoridens*, *Cratericulifera*, *Hendeyella*, *Psammotaenia* i *Serratifera* obejmujących osiem gatunków również nowych dla nauki. Opis nowych taksonów oparto na 10 hodowlach klonów uwzględniając kształt plastydów, sposób formowania kolonii, morfologii pokrywy (valve) oraz badaniach ultrastrukturalnych z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej i elektronowej. Wykorzystano także markery molekularne (kodowany jądrowo SSU rDNA oraz kodowane plastydowo *rbcl* i *psbC*) do określenia powiązań filogenetycznych. Uważam, że jednak można by zweryfikować

opublikowane analizy filogenetyczne oparte na programie RAxML i metodę największej wiarygodności również w programem MrBayes metodą bayesowską.

Nowo opisane taksony okazały się monofiletyczne w tych analizach. W pracy przemianowano także *Dimeregramma dubium* na *Hendeyella dubia*. Analizy filogenetyczne wykazały, że rodzina Fragilariaceae jest parafyletyczną, a jej członkowie rozdzielają się do pięciu kładów. Parafyletyczne okazały się również rodzaje *Nanofrustulum* i *Opephora*. Natomiast monofiletyczną okazała się grupa okrzemek o małych rozmiarach obejmująca *Nanofrustulum*, *Opephora*, *Staurosirella*, *Staurosira*, *Pseudostaurosira*, *Plagiotriata* i *Fragilariforma*. Jednak ze względu na brak morfologicznych cech syanpomorficznych nie zaproponowano wydzielenia ich w nową rodzinę, ale podkreślono konieczność dalszych badań pod tym względem.

W drugim artykule przeanalizowano również okrzemki o małych rozmiarach uwzględniając przedstawicieli rodziny Fragilariaceae. Jest to najbardziej kompleksowa praca pod tym względem, ponieważ przeanalizowano w niej 103 okrzemek pod względem morfologii, sekwencji DNA, bioróżnorodności i biogeografii. Sto z nich zostało zebranych z różnych stanowisk rozprzestrzenionych w różnych obszarach świata, we wszystkich strefach klimatycznych zarówno na półkuli północnej i południowej. Okazy przebadano w mikroskopie świetlnym i skaningowym mikroskopie elektronowym. W analizach molekularnych zastosowano trzy markery: kodowany jądrowo SSU rDNA oraz kodowane plastydowo *rbcL* i *psbC*.

Jednakże, w opisie zastosowania programu MrBayes podano, że wartość parametru the standard deviation of split frequency osiągnęła wartość 0.0156, natomiast w opisie metod zamieszczonych przed artykułami podano, że wartości te były poniżej 0.01. Jest tutaj pewna sprzeczność. Nie jest dla mnie jasne dlaczego transformacja logarytmiczna zastosowana na danych przed analizą analizy głównych składowych (PCA) pozwoliła na uwzględnienie więcej zmiennych. Czy dokonywano tej transformacji, aby uzyskać rozkłady normalne tych zmiennych? Dobrze byłoby podać jaką funkcję w pakiecie R użyto do wykonania analizy PCA, ponieważ jest ich kilka i mogą one dawać inne wyniki? W Tabeli 3 przedstawiającej wyniki testów topologii Shimodaira-Hasegawa dobrze byłoby podać wartości p dla tego testu. Byłoby to bardziej informatywne niż podane inne parametry.

W ramach tych analiz opisano nowy rodzaj *Gedaniella* obejmujący pięć nowych gatunków dla nauki i trzy nowe kombinacje taksonomiczne. Opisano również 11 nowych gatunków i jedną kombinację taksonomiczną w obrębie rodzaju *Serratifera* oraz pięć nowych taksonów dla rodzajów: *Cratericulifera*, *Nanofrustulum*,

Plagiotriata, *Pseudostaurosira* i *Stauroforma*. Szczegółowo opisano gatunki: *Nanofrustulum shiloi*, *Opephora pacifica* i *Pseudostaurosira elliptica*. W oparciu o dane morfologiczne i molekularne zrewidowano rodzaj *Opephora*, który jest najczęściej rejestrowaną okrzemką bezrafową w morskim litoralu. W wyniku tych analiz okazało się, że dotychczasowy rodzaj *Opephora* jest parafiletyczny i powinien być on ograniczony do dwóch taksonów odpowiadających *Opephora pacifica* i *Opephora marina*, natomiast pozostałe 12 powinny zostać przeniesione do nowego rodzaju *Serratifera*.

Zwrócić należy uwagę na ogrom pracy, który został włożony w skrupulatnym opisie i charakterystyce poszczególnych taksonów uwzględniając zdjęcia spod mikroskopów. Bardzo pożądane są wyniki PCA, ponieważ porównują one taksony ze względu na wiele zmiennych jednocześnie i pozwalają wydobyć generalne różnice między badanymi obiektami. W związku z tym pojawiło mi się pytanie: czy dystrybucja gatunków w analizie PCA odpowiada ich grupowaniu na drzewach filogenetycznych?

Analiz przeprowadzono rzetelnie i dla każdego nowego rodzaju podano cechy synapomorficzne. Utworzono także praktyczny binarny klucz do oznaczania podobnych rodzajów i gatunków w obrębie *Gedaniella* i *Serratifera*. Poprawiono także pod względem morfologicznym i molekularnym oryginalne diagnozy rodzajów *Nanofrustulum*, *Pseudostaurosira* i *Opephora*, co będzie bardzo pomocne w ich rutynowym identyfikowaniu. Generalnie doktorantka i współautorzy proponują, że koncepcja opisywania pod jedną nazwą rodzajową wielu zróżnicowanych form jest niewłaściwa i powinno się wydzielić je w osobne rodzaje.

Mam dodatkowe pytanie do doktorantki: Czy w oparciu o porównanie wyników analiz filogenetycznych i morfometrycznych może doktorantka podać, które z cech morfologicznych są podatne na konwergencje, a które są dobrymi cechami świadczącym o wspólnym pochodzeniu taksonów.

Przeprowadzone rewizje taksonomiczne, szczegółowe opisy będą pomocne przy wszelkich analizach ekologicznych i taksonomicznych oraz badaniach określających różnorodność i skład gatunkowy środowisk współczesnych i dawnych. Przedłożona praca doktorska jest najbardziej kompletnym opisem zróżnicowania morfologicznego i powiązań filogenetycznych rodziny Fragilariaceae i innych okrzemek o małych rozmiarach komórki. Doktorantka włożyła dużo trudu w przeprowadzone analizy, a przeprowadzona dyskusja wyników świadczy o dużej

dojrzałości naukowej doktorantki i umiejętności wydobywania najważniejszych informacji z uzyskanych wyników.

Praca jest dobrze zorganizowana pod względem formalnym i należy podkreślić jej poprawne sformatowanie i ładną szatę graficzną, zwłaszcza zdjęcia dobrej jakości. Praca i artykuły są napisane poprawnym językiem i stylem, jednak dostrzegłem pewne błędy przedstawione poniżej wraz z proponowanymi poprawkami: the second structural alignment -> the alignment based on the secondary structure; *sensu stricto* podczas gdy -> *sensu stricto*, podczas gdy; Datebase -> Database; The size of diatom cells are variable -> The size of diatom cells is variable; wasn't -> was not; While morphometric data seems a less advantageous -> However, morphometric data seems a less advantageous; out groups -> outgroup.

Stwierdzone przeze mnie zastrzeżenia nie rzutują jednak na bardzo pozytywną ocenę pracy, a przedstawione powyżej uwagi nie zmniejszają wartości ocenianej rozprawy. Przeprowadzone badania były bardzo zasadne, ponieważ istnieje potrzeba uporządkowania wciąż niejasnych relacji taksonomicznych i filogenetycznych w obrębie słabo przebadanych okrzemek o małych rozmiarach komórek. Należy podkreślić, że analizy zostały przeprowadzone skrupulatnie, a zastosowana metodyka okazała się skuteczna. Reasumując chciałbym stwierdzić, że recenzowana praca z artykułami stanowi istotny wkład w rewizję taksonomiczną tej grupy okrzemek, a uzyskane wyniki będą pomocne w badaniach środowiskowych.

W związku z tym, że doktorantka postawiła sobie trudny cel badawczy i go rozwiązała, a wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach proponuję wyróżnić rozprawę. Warto podkreślić, że badania będące przedmiotem pracy doktorskiej były wykonywane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki.

Uważam, więc, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy o Stopniach Naukowych. Zgłaszam, zatem wniosek do Rady Wydziału Nauk o Ziemi Uniwersytetu Szczecińskiego o uznanie rozprawy Pani mgr Chunlian Li za odpowiadającej wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Paweł Mackiewicz