

**dr hab. Igor J. Chybicki**  
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego  
Wydział Nauk Przyrodniczych  
Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Katedra Genetyki  
ul. Powstańców Wielkopolskich 10  
85-090 Bydgoszcz

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani **mgr Agnieszki Ewy Bony**

pt. **„Factors shaping genetic diversity of the shrub birch (*Betula humilis* Schrk.) in populations at the south-western margin of its range”**

wykonanej pod opieką pani promotor dr hab. Katarzyny Jadwiszczak oraz pani promotor  
pomocniczej dr Ewy Oleńskiej

### **1. Kwestie formalne**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została napisana w j. angielskim. Dysertację rozpoczyna streszczenie (oraz jego polskie tłumaczenie), następnie wstęp, gdzie zamieszczono uzasadnienie dla podjętych badań oraz cele i hipotezy badawcze (Rozdz. 1; „Introduction”). Kolejne cztery rozdziały rozprawy (I-IV) stanowią przedruki artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych. Każdy z nich jest przez to niezależną publikacją ze strukturą typową dla oryginalnej pracy badawczej. W rozdziale „Conclusions” zostały przedstawione konkluzje płynące z uzyskanych wyników – w tym miejscu przedstawiono końcowe tezy pracy. Ponadto, integralną częścią pracy jest spis literatury oraz rozdział zawierający oświadczenia dotyczące roli współautorów w badaniach opisanych w rozdziałach I-IV. Całość zajmuje 73 strony.

Z oświadczeń dotyczących udziału doktorantki wynika, że pani magister Bona uczestniczyła we wszystkich etapach badań, w tym w opracowaniu ich koncepcji, zbiorze i analizie materiału, opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów publikacji. Z oświadczeń współautorów poszczególnych prac wynika, że ich rola miała charakter pomocniczy, co wiąże się ze specyfiką podjętych badań i jest częste dla współczesnych dysertacji. Pomimo braku deklaracji procentowego udziału współautorów w badaniach, rolę doktorantki w przedstawionych pracach można ocenić jako wiodącą.

Wymogi formalne dotyczące rozpraw doktorskich zawarte w *Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U. 2016 poz. 882, ze zmianami, Art. 13) zakładają, że rozprawa może mieć formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych. 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**

Zmienność genetyczna jest podstawową różnorodności biologicznej, przez co zajmuje ona centralną pozycję, jako jeden z głównych przedmiotów badań biologicznych. Dzięki licznym badaniom teoretycznym i empirycznym zidentyfikowano szereg czynników warunkujących poziom zmienności i zróżnicowania genetycznego naturalnych populacji. Wśród nich ważną rolę odgrywają tzw. czynniki neutralne, takie jak hybrydyzacja i introgresja oraz system kojarzenia i sposób rozmnażania. W populacjach naturalnych czynniki te w sposób bezpośredni kształtują zmienność genetyczną. Jednakże, częstość hybrydyzacji czy typ rozmnażania wynikają z reguły z działania dodatkowych czynników o charakterze środowiskowym. Poznanie roli, jaką odgrywa środowisko w kształtowaniu zmienności genetycznej pozwala nie tylko w pełni zrozumieć bieżące wzorce ekologiczno-populacyjne, ale również przyczynia się do lepszego zrozumienia długofalowych procesów o charakterze ewolucyjnym, takich jak adaptacja czy specjacja. Wiedza ta ma również niebagatelne znaczenie w działaniach na rzecz ochrony zagrożonych gatunków czy całych zbiorowisk.

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy problemu zmienności genetycznej oraz czynników ją warunkujących w populacjach marginalnych brzozy niskiej (*Betula humilis* Schrk.). Celem badań była weryfikacja 4 głównych hipotez badawczych. Po pierwsze założono, że populacje peryferyjne oraz sub-centralne brzozy niskiej nie różnią się pod względem skuteczności rozmnażania płciowego. Drugim celem było określenie, czy wydajność reprodukcyjna brzozy niskiej jest uzależniona od czynników środowiskowych. Po trzecie założono, że międzygatunkowy przepływ genów powoduje wzrost zmienności genetycznej peryferyjnych populacji brzozy niskiej. Po czwarte zbadano, czy skupiskowy wzrost klonalny obniża częstość kojarzeń między genetycznie zróżnicowanymi osobnikami. W tym miejscu warto zaznaczyć, że przedstawione hipotezy (cele badawcze) dotyczą problemów, które były już niejednokrotnie przedmiotem badań u różnych gatunków roślin i zwierząt. Niemniej, specyfika gatunku jakim jest brzoza niska stwarza idealne warunki do podjęcia badań nad typem rozmnażania i hybrydyzacją jednocześnie oraz ich rolą w reprodukcji marginalnych populacji zagrożonego wymarciem gatunku. Dzięki temu dysertacja bez wątpienia spełnia kryterium dla rozpraw doktorskich, jakim jest podjęcie rozwiązania oryginalnego problemu badawczego.

Kompozycja rozprawy jest logiczna. W pierwszej publikacji, na przykładzie populacji zlokalizowanej na terenie zanikającego bagna wykazano, że marginalne populacje brzozy niskiej mogą charakteryzować się blisko 100% udziałem pomnażania wegetatywnego. Dzięki zastosowaniu markerów mikrosatelitarnych wykazano, że w populacji obecne są jedynie trzy genotypy, odpowiadające trzem genotom. Wynik ten prowadzi do wniosku, że marginalne populacje brzozy niskiej mogą charakteryzować bardzo małą różnorodnością genetyczną. Dalsze badania porównawcze (publikacja 2) dotyczące zmienności genetycznej oraz systemów reprodukcji ujawniły, że choć populacje marginalne i sub-centralne nie różnią się pod względem różnorodności genetycznej, siła kiełkowania nasion jest większa w populacjach bliżej centrum zasięgu gatunku. Tym samym wydajność rozmnażania płciowego może być mniejsza w populacjach marginalnych. Jako jedną z możliwych przyczyn zaobserwowanej rozbieżności między wysoką zmiennością genetyczną a relatywnie niską zdolnością rozmnażania płciowego wskazano hybrydyzację z pospolitymi gatunkami brzozy. Hipoteza ta była weryfikowana w badaniach opisanych w trzeciej publikacji. Co ciekawe, wbrew oczekiwaniom, badania pokazały, że marginalne populacje brzozy niskiej nie wykazują śladów intensywnej hybrydyzacji. Odnaleziono jedynie 3 potencjalne mieszańce, co stanowiło niespełna 2% wszystkich przebadanych osobników sklasyfikowanych jako *B. humilis*.

Mieszkańce były obecne jedynie w lokalizacjach charakteryzujących się niskim stanem wód gruntowych, co, zdaniem autorów, wskazuje na możliwy wpływ siedliska na częstość hybrydyzacji i introgresji. Wobec braku dowodów na wpływ kojarzenia międzygatunkowego na poziom zmienności genetycznej, w ostatniej publikacji podjęto badania nad ewentualnym związkiem między poziomem i strukturą przestrzenną klonalności oraz strukturą pokrewieństwa a zdolnością do reprodukcji płciowej w populacjach brzozy niskiej. Wykazano między innymi, że brzoza niska wykazuje intensywne pomnażanie klonalne, w przewodzie typu kępowego. Ponadto, blisko sąsiadujące genety mogą wykazywać wysokie pokrewieństwo, co sugeruje, że w (przynajmniej niektórych) populacjach dyspersja nasion i pyłku jest ograniczona do niewielkich odległości. Nie stwierdzono natomiast związku między poziomem klonalności a siłą kiełkowania nasion. Wobec czego pomnażanie wegetatywne nie okazało się być czynnikiem limitującym dla rozmnażania płciowego, a tym samym dla poziomu zmienności genetycznej.

W badaniach wykorzystano standardowe narzędzia genetyki ekologii molekularnej, włączając markery mikrosatelitarne oraz AFLP. Niemniej, warto podkreślić jest wykorzystanie tych metod z dbałością o rzetelność, między innymi poprzez ocenę błędów genotypowania w oparciu re-genotypowanie. Zadbano również o dobór odpowiednich metod statystycznych, w tym o stosowanie korekt poziomu istotności na testy wielokrotne. Również wielkości prób oraz schematy ich poboru były odpowiednio dostosowane do celów badań. Tym samym, dysertacja pokazuje, że doktorantka świetnie opanowała warsztat badawczy.

Lektura czterech publikacji nie pozostawia również wątpliwości co do znajomości literatury w zakresie podjętych przez doktorantkę badań. Na uwagę zasługują długie i wnikliwe rozdziały dyskusji, a także krytycznie odnoszenie się do uzyskanych wyników.

### 3. Uwagi

Recenzja dysertacji przygotowanej w formie cyklu powiązanych tematycznie opublikowanych artykułów naukowych jest niezwykle przyjemna, ponieważ zasadnicze rozdziały pracy (artykuły) przeszły już przez „sito” recenzji w procesie redakcyjnym. W rezultacie dysertacja jest dopracowana zarówno pod względem formalnym, metodologicznym jak i pod względem merytorycznym. Niemniej, lektura poszczególnych rozdziałów wyłoniła kilka drobnych kwestii, które w mojej ocenie wymagają wyjaśnienia lub komentarza autorki.

Publikacja 1: Chrzanowska A. i Jadwiszczak K.A. (2015)

1) W przedostatnim akapicie pracy zamieszczono uwagę, że transplantacja osobników brzozy niskiej z sąsiadujących populacji nie jest rekomendowana, ponieważ istnieją niewielkie szanse na ich zaaklimatyzowanie.

Niemniej, czy z genetycznego punktu widzenia 3 genety (genotypy) to liczba wystarczająca, aby badana populacja zachowała zdolność przetrwania w długiej perspektywie czasu?

Publikacja 2: Chrzanowska A., Jadwiszczak K.A., Kłoswski S., Banaszek A., Sozinov O.V. (2016)

1) Ciekawi mnie powód, dla którego w pracy nie wykorzystano metody oceny wsobności dla markerów dominujących opracowanej w pracy Chybicki i in. 2011, mimo że praca ta jest cytowana w tekście? We wspomnianej pracy wykazano, że metoda Dasmahapatry i in. (tj. metoda wykorzystana w badaniach nad wsobnością

brzozy niskiej) cechuje się gorszymi własnościami statystycznymi, tj. zaniża oceny poziomu wsobności i charakteryzuje się wyższą wariancją.

- 2) Na stronie 170 (wg numeracji z czasopisma) stwierdzono, że wsobność nie jest odpowiedzialna za produkcję pustych nasion u brzozy niskiej, ponieważ poziom wsobności w badanych populacjach był bardzo niski.

Niemniej, jeżeli puste nasiona są efektem depresji wsobnej, wówczas w populacji zachodzi silny dobór kierunkowy eliminujący homozygoty, który prowadzi do redukcji poziomu wsobności. Efekt ten jest szczególnie dobrze znany u drzew nagonasiennych, gdzie częstość samozapylenia jest bardzo wysoka, natomiast efektywne samozapłodnienie oceniane w analizach systemu kojarzenia (w oparciu o genotypy potomstwa) jest bardzo niskie. Z tego powodu mam wątpliwości, czy konkluzja zamieszczona w pracy jest uzasadniona.

- 3) Na stronie 171 zamieszczono uwagę, że analizy regresji wskazują, że dostępność fosforu nie wydaje się być czynnikiem odpowiedzialnym za intensywność kwitnienia u brzozy niskiej.

Niemniej, analizy regresji były prowadzone w oparciu o proste zmienne środowiskowe, podczas gdy hipoteza w pracy Fuijita i in. 2014 (cytowana w dyskusji) opiera się na stosunku N:P. Trudno jest zatem odnieść wyniki uzyskane w pracy bezpośrednio do hipotezy „azotowo-fosforowej”, co sprawia, że kwestia limitacji fosforem/azotem wydaje się być otwarta.

Publikacja 3: Bona A., Petrova G., Jadwiszczak K.A. (2018)

- 1) Na stronie 298 podano, że identyfikacja potencjalnych mieszańców była prowadzona przy założeniu, że liczba klastrow genetycznych wynosi 2 ( $K=2$ ). Założenie jest dość zaskakujące, zważywszy, że w badaniach uwzględniano trzy dobrze zdefiniowane gatunki brzozy (jak wynika z wcześniejszych prac nad tą grupą). Domyślam się, że  $K=2$  jest efektem spostrzeżenia, że drzewiaste gatunki brzozy wykazują zdecydowanie niższy poziom zróżnicowania genetycznego niż którykolwiek z nich zestawiony z brzozą niską. Niemniej, wyjaśnienie tego rodzaju powinno znaleźć się w rozdziale M&M.

- 2) Przyjęto arbitralnie, że współczynnik Q (określający prawdopodobieństwo przynależności allelu do danego klastra genetycznego) w zakresie 0,1-0,9 oznacza pochodzenie mieszańcowe danego osobnika. Metoda STRUCTURE pozwala na określenie przedziałów ufności wokół oszacowanych wartości Q, które umożliwiają testowanie hipotezy, czy genotyp danego osobnika ma wartość Q istotnie niższą/wyższą niż wartość progowa. Wykorzystanie tej opcji umożliwiłoby określenie, które z osobników sklasyfikowanych jako „mixed” mają statystycznie istotny charakter mieszańcowy.

- 3) Analiza głównych współrzędnych (PCoA) wykazała, że trzy gatunki brzozy dość dobrze się wyróżniają na podstawie 1 i 3 osi. Co bądź zaskakujące jest, że druga współrzędna wyjaśniająca 5,5% zmienności genetycznej nie wiązała się ze zróżnicowaniem między-gatunkowym. Jaki inny czynnik może być powiązany z drugą osią?

- 4) Wbrew temu, co pokazuje STRUCTURE, analiza PCoA pokazuje wyraźną dyskryminację wszystkich trzech gatunków brzozy. PCoA nie wymaga spełnienia licznych założeń modelu populacji, na którym bazuje STRUCTURE (i metody

pokrewne), co sugeruje, że wyniki uzyskane przy jej użyciu mogą być bardziej wiarygodne. Czy założenia (tj. brak sprzężeń, brak doboru, losowe kojarzenie) były testowane?

Publikacja 4: Bona A., Kulesza U., Jadwiszczak K.A. (2019)

- 1) W pierwszym akapicie wstępu pada stwierdzenie, że wsobne potomstwo charakteryzuje się obniżonym fitnessem ze względu na akumulację szkodliwych alleli. Czy rzeczywiście depresja wsobna jest efektem akumulacji szkodliwych alleli, czy może raczej podwyższonego ryzyka ich ujawnienia w wyniku zwiększonej homozygotyczności?

#### 4. Podsumowanie

Na ocenianą rozprawę doktorską składa się zbiór 4 powiązanych tematycznie publikacji naukowych. Trzy spośród nich znajdują się w wykazie Journal Citation Reports, a ich sumaryczny 5-letni wskaźnik Impact Factor wynosi 5,409. We wszystkich publikacjach doktorantka pełniła rolę wiodącą. Zbiór publikacji jest najlepszym dowodem wysokiej jakości rozprawy doktorskiej, a także świadczy o dużym zaangażowaniu i konsekwentnej pracy naukowej doktorantki. W efekcie tej pracy otrzymano wiele cennych, nowych dla nauki wyników, spośród których do najważniejszych zaliczam:

1. Wykazanie, że neutralna zmienność genetyczna brzozy niskiej jest podobnie wysoka w populacjach marginalnych i sub-centralnych, natomiast
2. wydajność rozmnażania płciowego jest niższa w populacjach marginalnych niż sub-centralnych.
3. Wykazanie, że spontaniczna hybrydyzacja z pospolitymi gatunkami brzozy jest zjawiskiem rzadkim w marginalnych populacjach brzozy niskiej, przez co nie wpływa ona na poziom zmienności genetycznej tego gatunku.
4. Wykazanie, że nie ma związku między poziomem klonalności a wydajnością rozmnażania płciowego u badanego gatunku.

#### Wniosek końcowy

Zamieszczone uwagi nie podważają mojej ogólnej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej. Dysertacja ma istotny i oryginalny wkład w poznanie zmienności genetycznej brzozy niskiej oraz wyznacza kierunki dalszych badań, m.in. nad systemem kojarzenia badanego gatunku oraz zagadnieniem hybrydyzacji w rodzaju *Betula*. W mojej opinii recenzowana rozprawa doktorska spełnia w pełni wymogi stawiane w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595, Art. 13). Wobec powyższego wnoszę o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Ewy Bony do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bydgoszcz 14.07.2019

dr hab. Igor J. Chybicki

