



**Uniwersytet w Białymstoku**

**Wydział Biologii**

ul. Ciołkowskiego 1J

15-245 Białystok

nr tel./faksu: 085 738-84-14

Białystok, 11.06.2021 r.

dr hab. Katarzyna Jadwiszczak, prof. UwB

Katedra Zoologii i Genetyki

Zakład Biologii Molekularnej

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Walasa**

**pt. „Wzorce genetyczne i ekologiczne w naturalnych populacjach**

**kasztanowca zwyczajnego (*Aesculus hippocastanum* L.)”**

Recenzję przygotowałam w odpowiedzi na pismo Pana prof. dr. hab. Pawła Chmielarza, Przewodniczącego Komisji Doktorskiej w Instytucie Dendrologii PAN w Kórniku. Stwierdzam, że otrzymany zestaw dokumentów jest kompletny i umożliwia ocenę, czy rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

### **Ocena formalna**

Rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biogeografii i Systematyki Instytutu Dendrologii PAN, pod opieką Promotora dr. hab. Grzegorza Iszkuło oraz Promotora pomocniczego dr. hab. Moniki Dering. Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu nr 2017/27/N/NZ8/02781 pt. „Zmienność i zróżnicowanie genetyczne naturalnych stanowisk kasztanowca zwyczajnego *Aesculus hippocastanum* L.” oraz środków statutowych Instytutu Dendrologii PAN. Na rozprawę składają się trzy oryginalne artykuły opublikowane w anglojęzycznych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Łączny współczynnik wpływu (IF) czasopism, w których ukazały się artykuły wynosi 5,676, a liczba punktów MEiN jest równa 165. Są to prace współautorskie, ale we wszystkich Pan Łukasz Walas jest pierwszym autorem. Powyższy fakt oraz dołączone oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują, że Doktorant pełnił wiodącą rolę w przygotowaniu tych publikacji.

Zasadnicza część rozprawy doktorskiej została poprzedzona polskojęzycznym opracowaniem tematyki zawartej w publikacjach składających się na tę rozprawę. W opracowaniu znalazły się takie rozdziały jak: Wprowadzenie, Lista publikacji (składających się na rozprawę doktorską), Cele i hipotezy,

Dyskusja podzielona na główne nurty badań realizowane w trakcie przygotowywania rozprawy, Streszczenie i Spis literatury. W skład opracowania weszło także anglojęzyczne streszczenie rozprawy (Summary). Całość dokumentacji została przygotowana w sposób niezwykle staranny pod względem edytorskim. Jest ona napisana klarownym językiem i wzbogacona tabelami oraz ilustracjami, które stanowią ważne uzupełnienie przekazywanych treści.

### **Ocena merytoryczna**

Głównym celem przedstawionej rozprawy doktorskiej jest wskazanie czynników determinujących zmienność genetyczną oraz wzorce zróżnicowania genetycznego i ekologicznego w dziewięciu naturalnych populacjach kasztanowca zwyczajnego (*Aesculus hippocastanum*) zlokalizowanych w Grecji, a także analiza kształtowania się zasięgu gatunku pod wpływem zmian klimatu. Kasztanowiec zwyczajny jest reliktem trzeciorzędowym, który przed zlodowaceniami plejstoceniowymi występował powszechnie na terenie Europy i Afryki Północnej. Chociaż obecnie w Europie *A. hippocastanum* stanowi popularny element dekoracyjny wielu parków i ogrodów, to naturalne populacje tego klimatycznego paleoendemita występują jedynie w Grecji, Albanii, północnej Macedonii i Bułgarii. Populacje te są zazwyczaj wzajemnie przestrzennie izolowane i niewielkie liczebnie, co może rzutować na zasoby zmienności genetycznej w naturalnej części zasięgu gatunku. Dodatkowo, utrzymanie się dotychczasowych stanowisk w dłuższej perspektywie czasowej stoi pod znakiem zapytania w dobie zachodzących zmian klimatycznych i inwazji szrotówka kasztanowcowiaczka (*Cameraria ohridella*). Kasztanowiec zwyczajny wykazuje wyraźną specjalizację siedliskową, porastając głównie okolice cieków wodnych. Ponadto bystry nurt potoków górskich odpowiada za przenoszenie ciężkich nasion kasztanowca od drzew maczynych w mniej lub bardziej odległe miejsca, znacząco ułatwiając przepływ genów w obrębie i między populacjami. Zatem nadmierne wykorzystywanie strumieni górskich do celów rolniczych na obszarach Płw. Bałkańskiego, gdzie obserwuje się od lat niedobór opadów atmosferycznych, może przyczynić się do zaniku tego endemicznego gatunku. Kolejnym zagrożeniem dla *A. hippocastanum* jest szrotówek, motyl minujący, który odżywiając się tkankami liści niszczy aparat asymilacyjny drzew, obniżając w ten sposób ich dostosowanie.

Brak danych na temat poziomu zmienności genetycznej oraz nasilanie się współczesnych zagrożeń na obszarze występowania naturalnych populacji kasztanowca zwyczajnego skłoniły Pana Łukasza Walasa do podjęcia badań, których zakres definiują trzy cele szczegółowe:

- 1) Analiza struktury demograficznej naturalnych populacji kasztanowca zwyczajnego i stopnia ich porażenia przez szrotówka kasztanowcowiaczka.
- 2) Określenie wpływu zmian klimatu na zasięg gatunku.
- 3) Określenie zmienności genetycznej i zróżnicowania genetycznego w naturalnych populacjach kasztanowca zwyczajnego oraz identyfikacja czynników kształtujących zmienność i zróżnicowanie genetyczne.

Dla każdego celu szczegółowego Doktorant wysunął co najmniej dwie hipotezy, które zostały przetestowane dzięki zastosowaniu metod i narzędzi z zakresu genetyki molekularnej, genetyki populacji, analizy struktury demograficznej populacji, biometrii liści, analizy powierzchni liści porażonej przez

szrotówka oraz analizy czynników klimatycznych pozwalającej na modelowanie przeszłych i przyszłych zmian zasięgu *A. hippocastanum*. Wszystkie cele zostały zrealizowane, a różnorodność przeprowadzonych badań wskazuje na wszechstronne zdolności Doktoranta i jego dociekliwość w zgłębianiu problemów badawczych. Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Walasa oceniam bardzo wysoko, a za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- 1) Wykazanie, że struktura demograficzna badanych populacji kasztanowca ma kształt odwróconej litery J, co jest charakterystyczne dla stabilnych zespołów leśnych.
- 2) Stwierdzenie, że stopień porażenia populacji kasztanowca przez szrotówka jest zróżnicowany i negatywnie skorelowany z usytuowaniem populacji n.p.m.
- 3) Wykazanie, że występowanie kasztanowca zwyczajnego jest determinowane ilością opadów w ciągu najzimniejszych i najcieplejszych okresów w ciągu roku, średnią temperaturą kwartału o największej ilości opadów, a także położeniem populacji n.p.m.
- 4) Stwierdzenie, że parametry opisujące zmienność loci jądrowego mikrosatelitarnego DNA w greckich populacjach *A. hippocastanum* osiągają umiarkowane wartości, zbliżone do tych obserwowanych u innych endemitów z rejonu M. Śródziemnego.
- 5) Wykazanie, że wymiana genów pomiędzy populacjami kształtuje się obecnie na dużo niższym poziomie niż w czasach historycznych. Za redukcję poziomu przepływu genów odpowiada najprawdopodobniej topografia badanego obszaru oraz izolacja populacji przez dystans. Wpływu wydają się nie mieć odmienne warunki siedliskowe zaobserwowane na niektórych stanowiskach kasztanowca.
- 6) Wykazanie, że teoretyczny zasięg *A. hippocastanum* w czasie maksimum ostatniego zlodowacenia, jak również w środkowym holocenie, był znacznie większy niż obecnie. Przewidywana zmiana klimatu raczej nie spowoduje ekspansji gatunku na północ kontynentu europejskiego, natomiast wzrost średniej temperatury rocznej o 2°C w ciągu najbliższych 40 lat stanowi realne zagrożenie dla utrzymania się naturalnych populacji kasztanowca.
- 7) Opracowanie zestawu 13 specyficznych dla *A. hippocastanum* loci jądrowego mikrosatelitarnego DNA, które ulegają amplifikacji także u innych gatunków z rodzaju *Aesculus*.
- 8) Wskazanie populacji kasztanowca zwyczajnego o największym priorytecie ochrony ze względu na wysoki poziom zmienności genetycznej.

W trakcie czytania rozprawy nasunęło mi się też kilka pytań, uwag krytycznych i wątpliwości, które są wymienione poniżej:

- 1) Interesuje mnie przyczyna, dla której hipoteza 5 została sformułowana w sposób następujący: „Naturalne populacje charakteryzują się niską zmiennością i wysokim zróżnicowaniem genetycznym”. Dane literaturowe, które zresztą Doktorant cytuje, np. dla rodzaju *Pseudomisopates* (Jiménez-Mejías i in. 2015; Journal of Biogeography), czy artykuł przeglądowy Médaila i Baumela (2018; Biological Conservation) dotycząy ogólnie roślinnych endemitów z basenu Morza Śródziemnego, sugerują co najmniej umiarkowany poziom zmienności genetycznej w populacjach istniejących na obszarach dawnych refugium lodowcowych. Także

praca Petita i in. (2003; Science), opierająca się na analizie markerów chloroplastowego DNA w populacjach 22 pospolitych gatunków drzew i krzewów występujących w Europie, pokazała, że chociaż dawne izolaty glacialne są uboższe pod względem zasobów zmienności genetycznej w porównaniu do obszarów admiksji linii filogenetycznych, to stanowią źródło tej zmienności („hot spots”).

2) W opisie „Materiałów i metod” w pracy z Plant Biosystems znajduje się informacja o sposobie zbierania danych w siedmiu populacjach *A. hippocastanum*. Zostały, mianowicie, wyznaczone poletka na obszarach o największym zagęszczeniu osobników, gdyż ze względu na ukształtowanie terenu nie było możliwości dotarcia do wszystkich drzew. Powierzchnie poletek podane w Tabeli 2 były dużo mniejsze niż 1 ha, natomiast zagęszczenie osobników podano w przeliczeniu na 1 hektar. Czy te wielkości zagęszczenia są ekstrapolowane? W dodatku liczba badanych osobników w kolumnie drugiej tej tabeli nie zgadza się z liczbą osobników przedstawionych w poszczególnych klasach wysokości kasztanowców (kolumny 4 – 6). Jakież więc dane zawiera Tabela 2?

3) Niejasne jest dla mnie zdanie w publikacji z Plant Biosystems zaczynające się od słów: „In Ondria, mines were not reported...” (str. 1055). Pierwsza część zdania zdaje się dotyczyć wyników obecnej pracy, natomiast druga o braku haplotypu A u osobników szrotówka, pochodzi z pracy Valada i in. (2009). Oczywiście, dane w tej populacji były zbierane przez obie grupy Autorów w różnym czasie. Czy jest możliwe, żeby szrotówek ciągle występował na tym obszarze?

4) W pracy z Plant Biosystems znalazła się informacja o plejstocенских populacjach *A. hippocastanum* na Płw. Iberyjskim i Apenińskim oraz na terenie południowej Francji (str. 1054). Z kolei, w publikacji z PLOS One możemy przeczytać, że zmiana klimatu w plejstocenie spowodowała ograniczenie występowania gatunku do górskich obszarów na Płw. Bałkańskim (str. 2). Proszę o wyjaśnienie, w jakich lokalizacjach występował kasztanowiec w czasie plejstocenu.

5) Uważam, że użycie w pracy z PLOS One terminu „spatial genetic structure” jest mylące. Po tytule zawierającym ten termin oczekiwałabym analizy pokrewieństwa osobników pokazującej wpływ wymiany genów na przestrzenne rozmieszczenie genotypów w populacjach. Szczegółowo wyjaśniają to Vekemans i Hardy (2004; Molecular Ecology). Za przestrzenną strukturę genetyczną odpowiadają kojarzenia krewniacze. Do analiz SGS niezbędne jest pobieranie prób do izolacji DNA w mniej więcej regularnych odstępach lub na wytyczonych transektach. Nie wykluczam, że taka analiza byłaby możliwa w populacjach kasztanowca. Jednak wnioskowanie o pokrewieństwie osobników nie zostało przeprowadzone. W związku z tym Autorzy badali de facto strukturę genetyczną/zróźnicowanie genetyczne populacji, a nie przestrzenną strukturę genetyczną.

6) W ostatnim zdaniu w pierwszym akapicie „Materiałów i metod” w pracy z PLOS One jest błąd, gdyż średnie wartości dyspersji nasion kasztanowca japońskiego (12,2 – 44,7 m) nie mogą być wyższe niż wartość maksymalna (14,5 m) tej dyspersji.

7) Czy wynik opisujący pozytywną zależność pomiędzy nieciągłością genetyczną populacji a topografią badanego obszaru ( $r = 0,59$ ,  $P = 0,0225$ ), w ramach testowania izolacji ekologicznej („isolation by ecology”) w artykule z PLOS One (str. 10), jest istotny statystycznie? Jeżeli tak, dlaczego zależność pomiędzy

zróznicowaniem genetycznym a nieciągłością siedlisk odpowiednich dla kasztanowca jest nieistotny, chociaż dla tego wyniku  $P$  wyniosło 0,01?

8) Nie do końca zgadzam się z alarmującym tonem sugestii o potencjalnym spadku poziomu zmienności genetycznej w grupie siewek, zwłaszcza w populacji Karitsa I (PLOS One, str. 13). Liczebność siewek w tej populacji jest niemal dwukrotnie niższa niż osobników dorosłych, co może rzutować na wielkość parametrów opisujących zmienność genetyczną. Takie zresztą tłumaczenie pojawiło się w tej pracy w odniesieniu do różnic na korzyść dwukrotnie bardziej liczniejszego pokolenia młodocianego w populacji Karitsa II.

9) Teoretyczny kierunek przepływu genów pomiędzy współczesnymi populacjami, wyliczony przy pomocy programów MIGRATE-N and CIRCUITSCAPE (PLOS One, ryciny S2 i S10), wydaje się być różny. Sądząc po szerokości łuków łączących poszczególne populacje na rycinie S2, najintensywniejszy przepływ genów ma miejsce między Vaeni i stanowiskami usytuowanymi na północny zachód od tej populacji. Natomiast rycina S10 sugeruje kierunek wymiany zachód-wschód. Czy, oprócz uwarunkowań ściśle programowo-komputerowych, jest możliwe jakieś inne wyjaśnienie tej rozbieżności?

10) Publikacja z Dendrobiology powstała w oparciu o wyniki uzyskane w siedmiu populacjach. Są to te same stanowiska, które opisano w pracy z PLOS One. Jednak w populacjach Ondria, Dasos Nanitsa i Vaeni liczba analizowanych osobników jest wyższa w pracy z Dendrobiology niż w artykule z PLOS One. Czy ta różnica wynika z tego, że przy pomocy markerów specyficznych dla *A. hippocastanum* uzyskano większą liczbę genotypów niż przy zastosowaniu loci niespecyficznych?

11) Jako wyjaśnienie niższego poziomu zmienności loci mikrosatelitarnego DNA specyficznych dla kasztanowca zwyczajnego w porównaniu z tymi opisanymi dla *A. turbinata* podano, że wszystkie loci pochodzące od gatunku pokrewnego charakteryzują się występowaniem tandemowo powtarzającego się motywu dwunukleotydowego. Natomiast wśród 12 polimorficznych loci specyficznych gatunkowo, tylko osiem ma motyw dwunukleotydowy. I to jest słuszne wyjaśnienie. Rzeczywiście, dane literaturowe pokazują, że tempo mutacji mikrosatelitów o motywie dwunukleotydowym jest wyższe w porównaniu do loci zawierających trzy lub cztery nukleotydy w motywie, np. u człowieka (Chakraborty i in. 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA), czy muszki owocowej (Schug i in. 1998; Mol. Biol. Evol.). Innym wyjaśnieniem może być także wpływ typu powtórzeń dwunukleotydowych na tempo mutacji mikrosatelitarnego DNA. Na przykład, u *Arabidopsis thaliana* wykazano, że mikrosatelity zawierające powtórzenia AT mutują dużo szybciej niż te z powtórzeniami CT i CA (Marriage i in. 2009; Heredity).

12) Generalna uwaga dotycząca tabel i rysunków w publikacjach – część z nich nie zawiera wszystkich danych koniecznych do tego, żeby tabele i rysunki były samoobjaśniające się. Na przykład, na rycinie 1 w pracy z Plant Biosystems nie ma ani nazw populacji, ani jakichkolwiek symboli, które pozwoliłyby czytelnikowi na identyfikację badanych stanowisk. W podpisie do tej ryciny też nie ma takich informacji. W tej samej publikacji brakuje wyjaśnienia w Tabeli 2, że zagęszczenie osobników było analizowane w trzech klasach wysokości drzew.

## **Wnioski końcowe**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana Łukasza Walasa stanowi spójny tematycznie zestaw publikacji, prezentujący bardzo interesujące i różnorodne wyniki badań przeprowadzonych w naturalnych populacjach kasztanowca zwyczajnego w Grecji. Poczynione przeze mnie wyżej uwagi nie umniejszają wartości naukowej tej pracy. Doktorant udowodnił, że posiada wszechstronne umiejętności analityczne i szeroki warsztat naukowy, potrafi krytycznie weryfikować wyniki oraz merytorycznie je przedyskutować. Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Dendrologii PAN w Kórniku o dopuszczenie mgr. Łukasza Walasa do dalszych etapów przewodu doktorskiego, rekomenduję jednocześnie wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Handwritten signature in blue ink, reading "Katarzyna Jachowicz".