

dr. hab. Monika Szczecińska prof. UWM
Katedra Ekologii i Ochrony Środowiska
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
dyscyplina naukowa: nauki biologiczne
e-mail: monika.szczecinska@uwm.edu.pl

Olsztyn, 15.08.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr. Przemysława Tomczyka,
pod tytułem „Zmienność fenotypowa, różnorodność genetyczna oraz reakcje
epigenetyczne w relacji do poziomu ploidalności u *Festuca amethystina* L. i *F. tatrae*
(Czako) Degen (Poaceae).**

Recenzja została wykonana na wniosek Komisji ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego w dyscyplinie nauki biologiczne z dnia 31 maja zgodnie z wymogami określonymi w art. 20 ust. 5 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 , Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

1. FORMALNY OPIS ROZPRAWY

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem naukowym pana dr hab. Marcina Kiedrzyńskiego, promotora oraz pana dr. Pawła Wąsowicza, promotora pomocniczego, na wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Temat rozprawy doktorskiej doskonale wpisuje się w problematykę badawczą wokół, której koncentrują się prace zespołu kierowanego przez promotora pana dr hab. Marcina Kiedrzyńskiego.

Recenzowana praca doktorska porusza bardzo interesujące zagadnienia z zakresu zmienności genetycznej, fenotypowej i epigenetycznej dwóch blisko ze sobą spokrewnionych gatunków traw z rodzaju *Festuca*: endemicznego i notowanego jedynie na obszarze Karpat Zachodnich gatunku jakim jest *Festuca tatrae* oraz charakteryzującego się szerszym zasięgiem występowania (związanego z łańcuchami górskimi w Europie Środkowej i Południowo-Wschodniej) *F. amethystina*, cechującego się dwoma poziomami ploidii.

Rozprawę pana mgr. Przemysława Tomczyka stanowi spójny tematycznie cykl 3 anglojęzycznych, współautorskich artykułów, opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, w latach: 2018-2022 oraz manuskrypt pracy złożony w redakcji czasopisma *Journal of Biogeography*. Łączny współczynnik wpływu (IF) prac opublikowanych wynosi **10,344** a liczba punktów **MEiN -340**.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską są współautorskie (od 5 do 8 autorów) i Doktorant w dwóch z nich jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, w dwóch zaś autorem drugim. Autorem korespondencyjnym jednej z nich jest Pani dr. Agnieszka Rewicz, natomiast autorem korespondencyjnym przedłożonego do redakcji manuskryptu jest promotor pracy Pan dr. hab. Marcin Kiedrzyński. Wkład doktoranta i pozostałych autorów został opisany merytorycznie w sposób jednoznaczny. Z przedłożonych oświadczeń współautorów wynika, że Pan mgr Przemysław Tomczyk pełnił wiodącą rolę w powstaniu publikacji 2 i 3 i złożonego manuskryptu (odpowiednio 55%, 40%, 40%), biorąc udział we wszystkich etapach badań, w tym w opracowaniu koncepcji badań, prowadzeniu eksperymentu, gromadzeniu i



analizie statystycznej danych, opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów publikacji. W pracy wymienionej jako pierwszej udział doktoranta wynosił 20 % i również polegał na: opracowaniu koncepcji badań, prowadzeniu eksperymentu, analizie statystycznej danych, opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów publikacji. Warto zaznaczyć, że łączna liczba cytowań prac stanowiących rozprawę doktorską (bez autocytowań) wynosi 5. Ponadto rozprawa doktorska obejmuje liczące 38 stron streszczenie, które zawiera informacje o źródle finansowania badań, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie obejmujące omówienie celu naukowego badań, Metodologię badań, Wyniki, Podsumowanie i wnioski. Ważnym elementem niniejszej rozprawy doktorskiej jest przedstawienie hipotez badawczych i szczegółowych celów pracy. Integralną częścią pracy jest obszerny spis literatury wykorzystanej we wprowadzeniu a także rozdział informujący o aktywności naukowej Doktoranta. W tym miejscu pragnę podkreślić, że badania stanowiące podstawę niniejszej dysertacji były sfinansowane w ramach grantu PRELUDIUM kierowanego przez Doktoranta. Ponadto część badań sfinansowano w ramach zadania naukowego MINIATURA, którego kierownikiem był promotor niniejszej rozprawy oraz w ramach zadania badawczego dla młodych naukowców i doktorantów realizowanego ze środków budżetu Uniwersytetu Łódzkiego.

Po przeanalizowaniu załączonej dokumentacji uważam, że rozprawa doktorska Pana mgr. Przemysława Tomczyka spełnia wymogi formalne.

2. OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Przedłożony do recenzji zestaw artykułów jest tematycznie spójny i dotyczy aktualnych zagadnień z zakresu zmienności genetycznej i ekologii roślin. Pozytywnie oceniam uzasadnienie podjęcia badań i sformułowany cel. Zakres stosowanych metod i analiz laboratoryjnych jest dość szeroki, co wskazuje na duże umiejętności Doktoranta i bogaty warsztat eksperymentalny. W pracy wykorzystano bowiem wiele technik, poczynając od hodowli materiału na poletku doświadczalnym, po analizy morfometryczne, izolację DNA, analizy zmienności genetycznej z wykorzystaniem loci mikrosatelitarnych, modelowanie niszek ekologicznych i badanie poziomu metylacji. Zastosowane metody badawcze i analizy zostały właściwie dobrane i umożliwiły realizację głównego celu badawczego. Ponadto przeprowadzone badania wymagały ogromnego nakładu pracy.

Zaplanowane badania posłużyły weryfikacji 4 hipotez naukowych. Celem pierwszej pracy była „analiza różnic morfologicznych między cytotypami: diploidalnym i tetraploidalnym *Festuca amethystina*”. To zadanie badawcze zostało w pełni zrealizowane. Po przeanalizowaniu zmienności 13 cech morfometrycznych dla 73 osobników reprezentujących dwa cytotypy, opisano wewnątrzgatunkową zmienność gatunku i wykazano wyższe średnie wartości analizowanych cech u osobników tetraploidalnych, potwierdzając uzyskane wyniki odpowiednimi testami statystycznymi. Postawiona przez Doktoranta hipoteza mówiąca, „że istnieją znaczące i powtarzalne różnice morfologiczne między cytotypami *F. amethystyana*, które nie zostały uwzględnione w obecnym ujęciu taksonomicznym w podziale na podgatunki została odrzucona”. W badaniach nie znaleziono bowiem takich cech, na podstawie których możliwe byłoby odróżnienie cytotypów diploidalnego i tetraploidalnego.

Druga praca ocenianej rozprawy doktorskiej zawiera wyniki dotyczące oceny przydatności loci mikrosatelitarnych opracowanych przez Seggara-Moragues i Catalana w 2011 r. dla *Festuca gauteri*, w badaniach genetycznych *Festuca tatrae* i *F. amethystina*. Jest



to typowo metodyczna praca, której zadaniem była amplifikacja 10 loci mikrosatelitarnych w populacjach badanych gatunków i sprawdzenie ich polimorfizmu. W efekcie wykazano, że opracowane dla *F. gauteri* loci z powodzeniem mogą być również wykorzystywane w badaniach zmienności genetycznej analizowanych w pracy taksonów. Wszystkie analizowane loci wykazały polimorfizm. Łącznie zidentyfikowano aż 163 allele, na podstawie których przeprowadzono analizy statystyczne i oszacowano parametry opisujące zmienność genetyczną badanych populacji. Zmodyfikowana w niniejszej pracy metodyka amplifikacji loci została następnie wykorzystana w badaniach zmienności genetycznej na szerszą skalę. Wyniki tych analiz opisano i przedyskutowano w przygotowanym i złożonym do redakcji czasopisma *Journal of Biogeography* manuskrypcie. Wyniki tych badań uważam za interesujące, aczkolwiek odnoszę wrażenie, że potencjał uzyskanych danych nie został w pełni wykorzystany. Główna hipoteza głosi, że „postglacjalna dynamika zasięgów badanych gatunków związana była z poziomem ploidalności populacji.” Aby zweryfikować powyższą hipotezę badaniami objęto łącznie 20 europejskich populacji *F. amethystina* i *F. tatrae* (590 osobników), dla których wykorzystując 9 z 10 uprzednio testowanych loci oszacowano: liczbę alleli, bogactwo alleliczne i liczbę prywatnych alleli. Strukturę genetyczną opisano wykorzystując analizę dyskryminacyjną głównych składowych (DAPC). Wykazano, że analizowane gatunki/cytotypy charakteryzowały się podobnym poziomem bogactwa allelicznego i podobną liczbą alleli prywatnych, zaś przeprowadzona analiza dyskryminacyjna ujawniła wyraźną strukturę genetyczną.

Trzecia opublikowana praca dotyczyła analizy poziomu metylacji DNA *F. amethystina* i *F. tatrae* w warunkach stresu wodnego i temperaturowego. Przeprowadzone przez autorów analizy umożliwiły weryfikację postawionej hipotezy mówiącej o tym, „że osobniki badanych gatunków różnią się w epigenetycznej reakcji na stres pogodowy w zależności od poziomu ploidalności i pochodzenia geograficznego. Powyższa hipoteza została pozytywnie zweryfikowana, a uzyskane wyniki potwierdziły: wzrost poziomu globalnej metylacji DNA w warunkach stresu i wykazały, że najmniejszym poziomem metylacji charakteryzowała się *F. tatrae*, oraz że rośliny pochodzące z podobnych siedlisk wykazywały podobny poziom metylacji DNA.

Po analizie tej części rozprawy stwierdzam, że uzyskane przez doktoranta wyniki są oryginalne, interesujące i stanowią wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne.

3. UWAGI

Recenzja dysertacji przygotowanej w formie cyklu powiązanych tematycznie opublikowanych artykułów naukowych jest niezwykle przyjemna, ponieważ zasadnicze rozdziały pracy (artykuły naukowe) były wcześniej recenzowane w trakcie procesu redakcyjnego przez ekspertów z dziedziny jakiej dotyczą badania, tak więc nie ma potrzeby ich szczegółowego analizowania pod kątem poprawności wykonanych badań i sposobu ich prezentacji.

Niemniej jednak, podczas lektury polskojęzycznego streszczenia nasunęły mi się następujące pytania i uwagi, które przedstawiam poniżej.

1. W streszczeniu pracy, w którym doktorant tłumaczy zasadność podjętych badań, niestety nie znalazłam żadnych informacji o podziale *Festuca amethystina* na podgatunki oraz o pochodzeniu tetraploidów tego gatunku. W artykule poświęconym testowaniu loci mikrosatelitarnych, autorzy wspomnieli, że cytotyp tetraploidalny tego gatunku powstał prawdopodobnie w wyniku jednoczesnych procesów hybrydyzacji i

poliploidyzacji między diploidami *F. amethystina* i *F. tatrae* (Šmarda et al., 2008). Uważam, że w kontekście podjętych badań i postawionych hipotez naukowych jest to dość istotne zagadnienie, które należałoby poruszyć we wprowadzeniu. Znacznie ułatwiłoby to czytającemu zrozumienie podjętych badań.

2. Po zapoznaniu się z postawionymi przez doktoranta hipotezami naukowymi mam pewne uwagi i sugestie. Odnosząc się do hipotezy 2, uważam że, w tym przypadku nie można mówić o opracowaniu efektywnych narzędzi do analiz genetycznych. Autorzy jedynie testowali efektywność opracowanych w 2011 roku przez Segarra-Moraguesa i Catalana 10 loci mikrosatelitarnych i sprawdzali ich użyteczność w badaniach genetycznych gatunków *F. tatrae* i *F. amethystina*. Natomiast hipoteza 3 niniejszej rozprawy głosi że, postglacjalna dynamika zasięgów badanych gatunków związana była z poziomem ploidalności populacji. Proszę mi wyjaśnić jak to się odnosi do *F. tatrae*, która jest diploidem? Podobną uwagę mam do ostatniej sformułowanej hipotezy mówiącej o tym, że osobniki badanych gatunków różnią się w epigenetycznej reakcji na stres pogodowy w zależności od poziomu ploidalności.
3. W manuskrypcie pracy wysłanej do Journal of Biogeography autorzy przeprowadzili analizy zmienności genetycznej łącznie dla 590 osobników *F. tatrae* i *F. amethystina* reprezentujących odpowiednio 8 i 16 populacji. Jestem ciekawa dlaczego w analizach wyników autorzy ograniczyli się w zasadzie do trzech parametrów opisujących poziom wewnątrzpopulacyjnej zmienności genetycznej (liczba zamplifikowanych alleli, liczba alleli prywatnych i bogactwo alleliczne) a pominęli informacje o heterozygotyczności obserwowanej (H_o) i oczekiwanej (H_e), wartości współczynnika wsobności, wskaźniku polimorfizmu (PIC) czy prawdopodobieństwie identyczności genotypów dwóch losowo wybranych osobników. Być może należałoby rozważyć oszacowanie również wartości tych parametrów i uwzględnienie ich w wynikach. Uważam, że dane te były by również interesujące w kontekście postawionej hipotezy i znacznie wzbogaciły by wyniki.
4. Moje kolejne pytanie odnosi się do analiz zmienności międzypopulacyjnej, której wyniki są przedstawione i dyskutowane w manuskrypcie pracy. Dlaczego analizy zmienności międzypopulacyjnej przeprowadzono oddzielnie dla gatunków i cytotypów. Mając na uwadze pokrewieństwo analizowanych gatunków, w tym przede wszystkim obecność tetraploidów *F. amethystina*, analizy uwzględniające wszystkie populacje mogły by dostarczyć wielu ciekawych wyników. Szczegółowe analizy odnoszące się do jakości i częstości alleli u wszystkich badanych osobników jak również bayesowskie metody grupowania (np. Structure) mogły by pomóc w odpowiedzi na pytanie czy badane gatunki/ cytotypy posiadają wspólną pulę genową?
5. Po lekturze polskojęzycznego streszczenia pracy znalazłam pewne nieścisłości. Czwarte zadanie badawcze o brzmieniu „Analiza filogeograficzna a zmiany potencjalnych zasięgów cytotypów *F. amethystina* i *F. tatrae* polegało m.in. na analizie prawdopodobnych scenariuszy postglacjalnej historii gatunków w oparciu o dane genetyczne i modelowanie zasięgów. Zarówno w metodyce badań jak również w rozdziale wyniki Doktorant nie odniósł się do zagadnień związanych z modelowaniem



zasięgów. Dlaczego ta część wyników została pominięta, tym bardziej, że w podsumowaniu i wnioskach Doktorant nawiązuje do tych danych.

6. W rozdziale 4.5 Podsumowanie i wnioski, Doktorant pisze, że populacje tetraploidalne charakteryzował większy zasięg geograficzny i większa dynamika zmiany zasięgu geograficznego na przestrzeni czasu. Chciałabym poznać opinię doktoranta odnośnie ewentualnej roli zmienności genetycznej w sukcesie ewolucyjnym poliploidów ?
7. Poziom zróżnicowania genetycznego populacji oceniono szacując wartość współczynnika GST. Proszę o wyjaśnienie dlaczego wykorzystano ten parametr, nie zaś współczynniki FST i RST (Wright 1952).
8. Proszę o wyjaśnienie co Doktorant miał na myśli pisząc m.in. na str. 23 polskojęzycznego wprowadzenia, że „przepływ genów między większością badanych populacji był niski lub wręcz nieobecny. Na podstawie analizy jakich parametrów doszedł Pan do takiego wniosku proszę o wyjaśnienie ?
9. Badania genetyczne przeprowadzono dla 20 populacji. Niestety ani w streszczeniu, ani w przygotowanym manuskrypcie nie podano jaka była liczebność poszczególnych populacji. Proszę o uzupełnienie tej informacji. Jest ona dość pomocna w interpretacji parametrów opisujących zmienność genetyczną na poziomie populacji.
10. W tabeli S2, stanowiącej załącznik do manuskryptu pracy wysłanej do redakcji Journal of Biogeography podając wielkość zamplifikowanych alleli sugeruję podać przedziały wielkości, które uwzględniły by wielkości wszystkich zamplifikowanych w danym locus alleli.
11. W mojej opinii stwierdzenie „stres pogodowy”, które pojawiło się w polskojęzycznym streszczeniu pracy jest dość niefortunne. Sugerowałabym zastąpienie tego sformułowania np. stresem spowodowanym przez niekorzystne warunki pogodowe lub porostu przez stres temperaturowy i stres wodny.
12. Niestety w polskojęzycznym streszczeniu Doktorant nie uniknął niedociągnięć edytorskich (m. in. literówki, błędy edytorskie), nie rzutuje to jednak na jakość prezentowanych wyników.

4. PODSUMOWANIE

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej pana mgr. Przemysława Tomczyka, pragnę podkreślić, że bez wątplenia stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne, a także potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Pan mgr. Przemysław Tomczyk zastosował różnorodne metody badań, które dostarczyły wartościowych danych, a



uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą i wnoszą istotny wkład w poznanie poziomu zmienności fenotypowej, genetycznej i epigenetycznej *F. amethystina* i *F. tatrae*. Sformułowane w recenzji uwagi i pytania nie pomniejszają wartości zaprezentowanych wyników, a jedynie mają służyć dyskusji.

WNIOSEK KOŃCOWY

W mojej opinii recenzowana rozprawa doktorska pt. „Zmienność fenotypowa, różnorodność genetyczna oraz reakcje epigenetyczne w relacji do poziomu ploidalności u *Festuca amethystina* L. i *F. tatrae* (Czako) Degen (Poaceae).” spełnia wszystkie wymagania określone w artykule 20 ust. 5 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003, Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Przemysława Tomczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn 14.08.2023

Z poważaniem

Monika Szczyńska