

4) Badanie reakcji epigenetycznej osobników DNA *F. amethystina* i *F. tatrae* na stresowe warunki pogodowe w warunkach eksperymentu ogrodowego.

- Warunki stresowe (pogodowe) podwyższyły poziom globalnej metylacji DNA w roślinach rosnących w eksperymencie ogrodowym.
- Endemiczna i diploidalna kostrzewa tatrzańska *F. tatrae* – wykazywała najniższy poziom ogólnej metylacji DNA w warunkach ogrodowych.
- Wykazano, że metylacja DNA i nasłonecznienie na 24 godziny przed pobraniem prób były w relacji wykładniczej.
- Rośliny pochodzące z tych samych regionów klimatycznych i siedlisk wykazywały podobny poziom globalnej metylacji DNA.
- Duża plastyczność reakcji epigenetycznej poliploidów może być powodem sukcesu poliploidów prowadzącego do rozszerzenia ich niszy ekologicznej w stosunku do diploidalnych przodków.

5. Streszczenie w języku polskim

Rozprawa doktorska dotyczy zróżnicowania fenotypowego, genetycznego i epigenetycznego w obrębie kompleksu diploid-poliploid. Obiektem badań był kompleks dwóch gatunków traw: *Festuca amethystina* L. (2x i 4x) oraz *Festuca tatrae* Czako (Degen) (2x). Są to gatunki blisko spokrewnione, ale znacznie różniące się przede wszystkim zasięgami występowania. Zasięg *F. amethystina* obejmuje główne łańcuchy górskie Europy środkowej. Gatunek występuje z reguły na podłożu wapiennym, rośnie w murawach wysokogórskich i reliktowych lasach sosnowych. Ma również stanowiska niżowe, występujące głównie w subkontynentalnych dąbrowach i uważane za reliktowe. Są prawdopodobnie efektem rozpowszechnienia się siedlisk odpowiednich dla omawianego gatunku na obszary nizinne, podczas okresów glacialnych. *F. tatrae* z kolei jest zachodniokarpackim endemitem, występującym wyłącznie na stanowiskach górskich, na murawach górskich i reliktowych lasach sosnowych. Za interesujące i wartościowe uznano zbadanie zróżnicowania biologicznego wewnątrz- i między tymi gatunkami.

W ramach pracy zostały wzięte pod uwagę następujące aspekty:

- 1) Cechy morfologiczne – ich zróżnicowanie pomiędzy cytotypami *F. amethystina*.
- 2) Opis markerów mikrosatelitarnych, użytych do badań różnorodności genetycznej populacji (z wykorzystaniem loci opisanych dla innego kompleksu poliploidalnego *Festuca*).
- 3) Różnorodność genetyczna wewnątrz- i międzypopulacyjna w zależności od rozprzestrzenia geograficznego i poziomu ploidalności osobników w populacjach.
- 4) Poziomy ogólnej metylacji DNA obydwu ww. gatunków, zbadane podczas warunków korzystnych do rozwoju oraz podczas warunków stresowych (stres temperaturowy i stres suszy).

Przeprowadzone w ramach doktoratu badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- 1) Potwierdzenie po raz pierwszy, że zasada większej bujności poliploidów sprawdza się również w przypadku *F. amethystina*. Między diploidami i tetraploidami *F. amethystina* występują statystycznie istotne różnice morfologiczne (biorąc pod uwagę cechy organów wegetatywnych, generatywnych oraz cechy przekroju poprzecznego liścia), jednak nie są wystarczająco duże do łatwego rozróżnienia cytotypów na podstawie samych pomiarów morfologicznych. Wyniki przemawiają za zasadą znaną w taksonomii *Festuca*, że jednym z głównych kryteriów klasyfikacji w obrębie tego rodzaju powinien być poziom ploidalności. W przypadku *F. amethystina* klasyfikowanie osobników na podstawie poziomu ploidalności sprawdzało się znacznie lepiej niż na podstawie podgatunków.
- 2) Zestaw dziesięciu markerów SSR opracowany pierwotnie dla *F. gautieri* okazał się użyteczny również dla *F. amethystina* i *F. tatrae*; uzyskane produkty PCR były polimorficzne i zostały wykorzystane do analiz parametrów genetycznych populacji, w obrębie cytotypów i gatunków oraz pomiędzy nimi. Przeprowadzona analiza PCoA wykazała dobrze oddzielone grupy genetyczne odpowiadające badanym populacjom (i jednocześnie gatunkom/cytotypom). Analiza AMOVA ujawniła, że ponad 60% całkowitej wariacji genetycznej tłumaczy się zróżnicowaniem w obrębie populacji, natomiast jedną trzecią pomiędzy populacjami. Drzewo filogenetyczne zbudowane na podstawie polimorfizmu jądrowego markera ITS wykazało niewielką odległość genetyczną między *F. gautieri* a badanymi w pracy gatunkami. Wykazano również bliskie pokrewieństwo *F. amethystina* oraz *F. tatrae*.
- 3) Badania nad różnorodnością genetyczną i genetyczną strukturą wewnątrz- i międzypopulacyjną oraz potencjalnymi siedliskami badanych taksonów w maksimum ostatniego zlodowacenia wskazały, że populacje analizowanych taksonów wyraźnie różniły się od siebie, a poziom izolacji między nimi był wysoki. Poziom ploidalności nie wpływał znacząco na badane wskaźniki. Bogactwo alleliczne i wskaźnik G_{ST} wskazują na prawdopodobną lokalizację refugium podczas ostatniego zlodowacenia oraz na bardzo ograniczoną migrację. Gatunki/cytotypy diploidalne, przystosowane do niskich temperatur, w czasie zlodowacenia były ograniczone do refugium, zwłaszcza w górach, podczas gdy cytotypy poliploidalne były rozprzestrzenione szerzej.
- 4) Dane odnośnie do metylacji wskazują, że warunki stresowe (pogodowe) zwiększały globalną metylację DNA w roślinach rosnących w eksperymencie ogrodowym. *F. tatrae* – endemiczna i diploidalna kostrzewa – wykazywała najmniejszą metylację DNA. Metylacja DNA i nasłonecznienie na 24 godziny przed pobraniem próbki były w stosunku do siebie w relacji wykładniczej. Rośliny pochodzące z tych samych siedlisk wykazywały podobny poziom metylacji DNA (w porównaniu do roślin z innych siedlisk).

Badania sugerują, że poziom metylacji w warunkach stresowych może istotnie zależeć od poziomu ploidalności i pochodzenia osobników; istotną rolę może również odgrywać natężenie warunków stresowych w danym sezonie.

Słowa kluczowe: trawy, poliploidy, stres abiotyczny, epigenetyka, różnorodność genetyczna, zmienność fenotypowa, refugia glacialne

6. Streszczenie w języku angielskim

The doctoral dissertation concerns the phenotypic, genetic and epigenetic differentiation within the diploid-polyploid complex. The object of the study was a complex of two grass species: *Festuca amethystina* L. (2x and 4x) and *Festuca tatrae* Czakó (Degen) (2x). They are closely related species, but differ significantly in their distribution ranges. The range of *F. amethystina* covers the main mountain ranges of Central Europe. The species usually occurs on calcareous substrates, grows in high mountain grasslands and relict pine forests. It also has lowland localities, occurring mainly in subcontinental oak forests and considered to be relict. They are probably the result of the spread of habitats suitable for the species in question to lowland areas during the glacial periods. *F. tatrae*, in turn, is a West Carpathian endemic, occurring only in mountain sites, in mountain grasslands and relict pine forests. It was considered interesting and valuable to study the biodiversity within and between these species.

As part of the work, the following aspects were taken into account:

- 1) Morphological features - their differentiation between *F. amethystina* cytotypes.
- 2) Description of microsatellite markers used to study the genetic diversity of the population (using loci described for another *Festuca* polyploid complex).
- 3) Intra- and inter-population genetic diversity depending on geographical spread and ploidy level of specimens in populations.
- 4) Global DNA methylation levels of both species, tested under favorable conditions for development and under stress conditions (temperature stress and drought stress).

The research carried out as part of the doctorate allowed the formulation of the following conclusions:

- 1) Confirmation for the first time that the principle of higher polyploid abundance also applies to *F. amethystina*. There are statistically significant morphological differences between the diploids and tetraploids of *F. amethystina* (taking into account the characteristics of vegetative and generative organs and the characteristics of the cross-section of the leaf), but they are not large enough to easily distinguish cytotypes based on morphological measurements alone. The results support the principle known in *Festuca*'s taxonomy that one of the main classification criteria within this genus should be the level of ploidy. In the case of *F. amethystina*, the classification of

individuals based on ploidy level performed much better than on the basis of subspecies.

- 2) A set of ten SSR markers originally developed for *F. gautieri* has also proven useful for *F. amethystina* and *F. tatrae*; the obtained PCR products were polymorphic and were used to analyze the genetic parameters of populations, within and between cytotypes and species. The performed PCoA analysis showed well-separated genetic groups corresponding to the studied populations (and at the same time species/cytotypes). The AMOVA analysis revealed that more than 60% of the total genetic variance is explained by variation within populations and one-third between populations. The phylogenetic tree built on the basis of the nuclear polymorphism of the ITS marker showed a small genetic distance between *F. gautieri* and the species studied in the work. *F. amethystina* and *F. tatrae* were also closely related.
- 3) Studies on genetic diversity and genetic structure within and between populations, as well as potential habitats of the studied taxa in the Last Glacial Maximum, showed that the populations of the analyzed taxa clearly differed from each other, and the level of isolation between them was high. The level of ploidy did not significantly affect the studied indicators. Allelic richness and GST indicate the likely location of refugia during the last glacial period and very limited migration. Diploid species/cytotypes, adapted to low temperatures, were restricted to refugia during the glaciation, especially in the mountains, while polyploid cytotypes were more widely distributed.
- 4) The methylation results indicate that stress (weather) conditions increased global DNA methylation in the plants grown in the garden experiment. *F. tatrae* – endemic and diploid fescue – showed the lowest DNA methylation. DNA methylation and insolation 24 hours prior to sample collection were exponentially related to each other. Plants from the same habitats showed similar levels of DNA methylation (compared to plants from other habitats).
Studies suggest that the level of methylation under stress conditions may significantly depend on the level of ploidy and the origin of the individuals; the intensity of stress conditions in a given season may also play an important role.

Key words: grasses, polyploids, abiotic stress, epigenetics, genetic diversity, phenotypic variation, glacial refugia