

Warszawa, dn. 25.08.2023

Prof. dr hab. Justyna Nowakowska
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Nauk o Środowisku
Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki
ul. Wóycickiego 1/3
01-938 Warszawa

Ocena pracy doktorskiej **Pani mgr Małgorzaty Pałuckiej**, wykonanej pod kierunkiem profesora dr hab. Jarosława Burczyka w Uniwersytecie Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, pt. **„Zmienność genetyczna sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w oparciu o polimorfizm markerów mikrosatelitarnych”**.

Rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Pałuckiej dotyczy szczegółowej oceny zmienności genetycznej drzew doborowych sosny zwyczajnej w oparciu o analizy haplotypów w oparciu o analizę wybranych 9-ciu chloroplastowych markerów cpSSR, jak i analizę genotypów za pomocą 5-ciu neutralnych selekcyjnie jądrowych markerów mikrosatelitarnych nSSR.

Sosna zwyczajna, której zasięg obejmuje rozległe obszary Europy i Azji, powszechnie występuje na terenie całej Polski, stanowiąc ponad 60% składu gatunkowego polskich lasów. Jest to również jeden z najważniejszych gatunków drzew strefy umiarkowanej i borealnej w Eurazji. Na szeroki zasięg występowania i obecne wzorce zmienności genetycznej *Pinus sylvestris* wpłynęły m.in. czwartorzędowe oscylacje klimatyczne i powiązane z nimi procesy demograficzne. Z naukowego punktu widzenia genetyki populacyjnej i konserwatorskiej, sosna jest bardzo interesującym obiektem badań, gdyż obecność fosylnych szczątków sosnowatych na lądzie jest już datowana w późnym triasie (ok. 200 mln lat temu), a obecny obszar występowania sosny zwyczajnej ukształtował się pod wpływem wędrówek i krzyżowania się dróg migracji polodowcowej, najprawdopodobniej z trzech lub czterech refugium postglacjalnych w Europie. Z punktu widzenia praktyki, zachowanie zasobów genowych gatunków drzew leśnych jest priorytetowym działaniem gospodarki leśnej w Europie i na świecie, zaś współczesne badania genetyki molekularnej w leśnictwie

umożliwiają precyzyjną identyfikację leśnych zasobów genowych w celu określenia ich poziomu zmienności genetycznej na poziomie informacji genetycznej zawartej w DNA jądrowym, mitochondrialnym i chloroplastowym. Przyjmuje się, że bardziej zróżnicowana pula genowa gatunku daje większe prawdopodobieństwo wystąpienia korzystnej kombinacji alleli, gwarantujących przeżywalność i przystosowanie do zmiennych warunków środowiska. Dotychczasowe badania *P. sylvestris* w Polsce skupiały się na poznaniu zmienności i zróżnicowania genetycznego jednej lub maksymalnie kilkunastu populacji (np. Wojnicka-Półtorak i in. 2017, Hebda i in. 2017 oraz Wójkiewicz i in. 2019) jak również analiz, które dotyczyły głównie przepływu genów między pokoleniami w drzewostanach i na plantacjach nasiennych (cf. Burczyk i in. 2000, Działuk i Burczyk 2005, Lewandowski i in. 2017), lub opisywały historyczny i współczesny zasięgu występowania sosny zwyczajnej w oparciu o markery zmienności DNA (Wachowiak i in. 2022). Szeroko przeprowadzoną charakterystykę genetyczną sosny zwyczajnej w Polsce (na podstawie polimorficznych markerów nDNA i mtDNA) znajdziemy jedynie w pracach opublikowanych przez Instytut Badawczy Leśnictwa, które obejmowały łącznie 1384 drzew (w tym 55 drzew matecznych, zwanych dawniej „doborowymi”, pochodzących z 42 populacji sosny zwyczajnej z wyłączonych drzewostanów nasiennych (WDN) i gospodarczych (GDN) (Nowakowska 2007). Jak dotąd, nie prowadzono wielu kompleksowych badań poziomu zmienności i zróżnicowania genetycznego wyłącznie dla drzew matecznych sosny w oparciu o markery polimorfizmu DNA (tj. mikrosatelitarne jądrowe i organelowe loci SSR). Prezentowana dysertacja po raz pierwszy zatem porusza ww. aspekty badawcze genetyki populacyjnej *P. sylvestris* w szerokim zakresie (tj. 2888) badanych osobników polskich drzew matecznych zarejestrowanych w Krajowym Rejestrze Leśnego Materiału Podstawowego w latach 2012-2014, co stanowi niewątpliwie ważny element poznawczy w świetle opublikowanych dotychczas wyników badań nt. charakterystyki genetycznej *Pinus sylvestris*.

Formalna ocena dysertacji

Przedstawiona dysertacja liczy 203 strony i jest podzielona na 9 głównych rozdziałów, w klasycznie przyjętym podziale dla tego typu prac. Monografię rozpoczyna siedmiostronicowe wprowadzenie, a kończą dwa streszczenia w języku polskim i angielskim. W obszernym **Wstępie** (liczącym 32 strony), Doktorantka przedstawiła ogólny zarys problematyki badawczej ukierunkowanej na charakterystykę genetyczną badanego gatunku,

z akcentem na opis genomów jądrowego i chloroplastowego DNA oraz na specyfikę markerów mikrosatelitarnych. Ponieważ brak jest publikacji nt. charakterystyki genetycznej przeprowadzonej wyłącznie u drzew matecznych *P. sylvestris*, dalej przedstawiono polskie i zagraniczne badania naukowe dotyczące populacji sosny zwyczajnej z Polski i Europy, podkreślając znaczenie zachowania różnorodności genetycznej tego gatunku w ekosystemach lądowych. Autorka wykazała się dobrą znajomością tematu, cytuje szereg innych prac opisujących zmienność i zróżnicowanie genetyczne polskich i europejskich populacji wybranych gatunków sosen na podstawie takich markerów, jak izoenzymy i SSR, nie pomijając wpływu procesów naturalnej selekcji i adaptacji, które przekładają się na poziom wewnątrz- i międzypopulacyjnej zmienności genetycznej gatunku.

Na koniec wstępu, podano **Cel pracy** i wyszczególniono **18 hipotez badawczych**, które zgrupowano wokół następujących tez:

- 1) Stopień polimorfizmu neutralnych markerów cpSSR i nSSR u drzew matecznych sosny w odniesieniu do drzew nie będących drzewami matecznymi (cele 1 i 2),
- 2) Oszacowanie poziomu zmienności genetycznej i stopnia zróżnicowania genetycznego badanych drzew matecznych za pomocą 9-ciu markerów cpSSR i 5-ciu markerów nSSR w skali arbitralnie utworzonych populacji i wybranych 6 regionów geograficznych Polski (cele 3 i 4),
- 3) Ocena przestrzennej struktury genetycznej w odniesieniu do zastosowanego typu markera oraz współczynnika pokrewieństwa genetycznego względem logarytmu odległości (dystansu) między osobnikami (cel 5),
- 4) Porównanie parametrów genetycznej charakterystyki drzew w zależności od typu zastosowanego markera (tj. cpSSR lub nSSR), oraz odniesienie do przestrzennej struktury genetycznej badanych sosen (cel 6).

Rozdział **Materiał i metody** podzielono na trzy główne podrozdziały. W pierwszym opisano materiał badawczy, na który składały się fragmenty pędów pochodzące z 2574 drzew matecznych sosny zebranych z 17 regionalnych dyrekcji Lasów Państwowych zgodnie z wytycznymi Krajowej Komisji Nasiennictwa Leśnego, i wchodzących w skład drzewostanów reprezentujących cały obszar występowania gatunku na terenie kraju.

Metody analiz laboratoryjnych opisano w dwóch podrozdziałach, począwszy od etapu ekstrakcji genomowego DNA i opisu analiz zastosowanych dla 9 loci cpDNA (*Pcp1289*, *Pcp87314*, *Pcp102652*, *Pt15169*, *Pt26081*, *Pt30204*, *Pt36480*, *Pt45002* i *Pt71936*) oraz 5 loci mikrosatelitarnych markerów nDNA (*PtTx3032*, *PtTx4001*, *PtTx8446*, *SPAC 11.4* oraz *SSrCtg4363*), a kończąc na szczegółowym przedstawieniu zastosowanych metod statystycznych, począwszy od przedstawienia m.in. szacowanych parametrów zmienności genetycznej i zróżnicowania genetycznego, analizy nierównowagi sprzężeń i drzewa filogenetycznego dla markerów cpDNA, po badanie struktury przestrzennej za pomocą analizy głównych współrzędnych (PCoA) i statystyki globalnej / Morana w odpowiednich programach obliczeniowych (tj. STRUCTURE i SPAGeDi), stosując podział na 13 klas dystansów pozwalających na wykrycie pokrewieństwa między badanymi osobnikami.

Poza parametrami genetycznymi tradycyjnie analizowanymi w ocenie poziomu zmienności genetycznej populacji (m.in. średnia A i efektywna A_e liczba alleli w locus, heterozygotyczność oczekiwana H_e i obserwowana H_o , bogactwo AR i liczebność alleli prywatnych), oraz parametrami opisującymi poziom zróżnicowania genetycznego po uwzględnieniu alleli null (współczynnik F_{ST} , test F AMOVA, etc.), Doktorantka dokonała też analizy efektywnej wielkości populacji przy założeniu losowego systemu kojarzeń i nierównowadze sprzężeń badanych loci nSSR, przy założeniu tempa mutacji typu kroczącego badanych markerów DNA. W celu testowania nierównowagi sprzężeń u badanych loci, zastosowano algorytm statystyki bayesowskiej Monte Carlo oparty na łańcuchach Markowa (MCMC), a odchylenia od równowagi Hardy-Weinberga przedstawiono za pomocą współczynnika wsobności (F_{IS}). Na końcu, porównano poziom zmienności genetycznej populacji z podziałem na 6 głównych regionów geograficznych Polski.

Wyniki przedstawiono na 54 stronach, opisując w dwóch głównych podrozdziałach obliczenia uzyskane na podstawie analizy markerów: 1) cpSSR i 2) nSSR. W każdym z podrozdziałów, opisano i zilustrowano na pomocą 21 tabel i 31 rycin poziom zmienności genetycznej poszczególnych loci, zmienność genetyczną populacji, allele zerowe i wsobność, zróżnicowanie genetyczne między populacjami, strukturę genetyczną badanych populacji i przestrzenną strukturę genetyczną w odniesieniu do wybranych regionów Polski.

Rozdział **Dyskusja** jest wielowątkowym i obszernym opracowaniem, zajmującym 22 strony, powołującym się na dane uzyskane w dysertacji. Autorka w sposób prawidłowy porównała wyniki badań własnych z wynikami przedstawionymi przez różnych autorów, opisujących strukturę genetyczną populacji *P. sylvestris* oraz innych gatunków sosen (np. *P. mugo* Turra, *P. cembra* L., *P. halepensis*), z uwzględnieniem specyfiki niektórych peryferyjnych populacji, u których zaobserwowano zmiany w strukturze puli genowej populacji. W swych rozważaniach, Doktorantka uwzględniła wpływ procesów demograficznych na strukturę genetyczną populacji w obrębie gatunku, tj. losowy system kojarzenia i swobodny przepływ genów, które obok mutacji i rekombinacji w loci DNA mogą wpływać na poziom i charakter zmienności genetycznej populacji.

Tu nasuwa się pytanie, czy Doktorantka ma może jeszcze inne (historyczne) uzasadnienie (poza dużą liczbą analizowanych osobników), dlaczego sosny zgrupowane na terenie rdLP Białystok charakteryzują się statystycznie istotnym większym poziomem heterozygotyczności (H_o i H_e), wartością parametru F_{ST} , oraz różnorodnością D i dystansem genetycznym D^2_{sh} ?

Dyskusję kończą 5-cio stronicowe **Możliwości wykorzystania uzyskanych wyników badań w praktyce**, które wpisują się w główne działania na rzecz ochrony zasobów genowych polskich gatunków lasotwórczych w Leśnym Banku Genów w Kostrzycy (gdzie pracuje Autorka pracy) i które są warte rozpowszechnienia wśród specjalistów od genetyki konserwatorskiej, hodowli i ekologii lasu, ale również i botaniki sądowej.

Całość dysertacji, Autorka zamknęła w **Podsumowaniu i wnioskach**, które zwięźle ujęła w odniesieniu do 6-ciu głównych celów badawczych pracy, precyzyjnie nawiązując do postawionych we wstępie łącznie 18-tu hipotez, na które udzieliła wyczerpujących odpowiedzi. Po wnioskach, w osobnym rozdziale **Aneks** podano link do strony internetowej, gdzie zamieszczono tabelę ze szczegółowymi informacjami każdego z badanych drzew oraz mapy rozmieszczenia na powierzchni różnych rdLP.

Cytowana **Literatura** jest bardzo bogata, zawiera aż 338 pozycji krajowych i zagranicznych, w większości opublikowanych w ostatnich latach.

Pod względem merytorycznym pracę oceniam wysoko, gdyż zastosowano w niej prawidłowy warsztat badawczy w celu osiągnięcia założonego celu, czyli zbadania ogólnej zmienności genetycznej sosny zwyczajnej, jak również oszacowania podobieństw i różnic w rozkładzie zmienności genetycznej obliczonej za pomocą chloroplastowych oraz jądrowych markerów mikrosatelitarnych w arbitralnie utworzonych grupach (populacjach) drzew matecznych. Jak stwierdza sama Doktorantka, na str. 120, cyt. „Dokonane przez autorkę niniejszej pracy pogrupowanie osobników sosny zwyczajnej na „populacje” oraz „regiony” służyło uzyskaniu nieco innej perspektywy w prowadzeniu analiz genetycznych i interpretacji badań”, co zostało wzięte pod uwagę w końcowej interpretacji uzyskanych wyników.

Ogólna charakterystyka genetyczna badanych loci 9-ciu cpSSR i 5-ciu nSSR potwierdziła obserwacje innych autorów odnośnie homogenicznego poziomu zmienności markerów mikrosatelitarnych w polskich i środkowoeuropejskich populacjach sosny zwyczajnej, co jest charakterystyczne dla gatunku występującego z sposób ciągły na dużych obszarach, o dużej dyspersji pyłku i losowym sposobie krzyżowania.

Odnośnie poziomu zmienności genetycznej badanych drzew matecznych przypisanych do 6-ciu populacji na tle 17 regionów regionalnych dyrekcji LP, nie dziwi fakt niskich wartości parametrów heterozygotyczności zaobserwowany dla „populacji” złożonych z rozproszonych drzew, w porównaniu do badań wykonanych dla „naturalnych” populacji sosny w Polsce i Europie. U tych ostatnich, działają dodatkowe siły selekcji i doboru naturalnego, wraz z intensywniejszym przepływem genów w obrębie osobników z bliskiego sąsiedztwa. Obliczona wartość $N_{eL.D.}$ efektywnej wielkości populacji wskazała jednak dobrą kondycję badanych grup drzew ($N_{eL.D.} > 50$), którym nie grozi chów wsobny wynikający z samozapylecia. Oszacowana wartość parametru F_{ST} potwierdziła ogólnie obserwowany trend występujący między populacjami drzew iglastych, u których zmienność międzypopulacyjna jest o wiele mniejsza, niż zmienność wewnątrz populacji. Dodatkowo, niski poziom zmienności międzypopulacyjnej wyrażony parametrem F_{ST} nie był w żaden sposób powiązany z odległością między badanymi populacjami czy regionami.

Mam niewiele uwag, na które natknęłam się przy uważnej lekturze pracy, zawierającej niekiedy drobne przejęzyczenia, dla przykładu:

- na stronie 23 błędnie podano termin „tRNS”, zamiast „tRNA” w powołaniu na pracę Sokołowskiej i in. 2022.

- czasami termin „homoplazji” przybiera postać „homeoplazji” (jak na str. 28),

- w całej pracy zachowałamby oryginalne nazwy badanych loci, np. „SsrPt_ctg4363” (cf. Chagné i in. 2004, gdzie „Pt” odwołuje się do gatunku *Pinus taeda*, w którym po raz pierwszy zidentyfikowano ten locus) zamiast podanej w pracy nazwy „SSrctg4363”, jak również prawidłowo „SPAC 11.4” (wg Soranzo i in. 1998) zamiast „SPAC114” (tak pisanej nazwy począwszy od rozdziału Wyników), co może generować konfuzję u odbiorców pracy. Drobną uwagę, locus Spac7.14 (wymieniony na str. 129) ma oryginalny zapis SPAG 7.14 (cf. Soranzo i in. 1998),

- niekiedy w wynikach, zamieszczono całe akapity opisu zastosowanej metody badawczej, np. na str. 72 i 73.

Tym niemniej, na uwagę zasługuje duża staranność w cytowaniu autorów licznych prac przytoczonych w pracy, których publikacje zostały zamieszczone ze szczególną starannością, bez pominięcia żadnej z nich. Przytoczone uwagi edytorskie i stylistyczne nie obniżają wartości naukowej dysertacji, mogą mieć jedynie znaczenie w trakcie publikacji przedstawionych wyników badań w czasopismach naukowych.

Wniosek końcowy:

Po uważnym przestudiowaniu przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Pani mgr Małgorzata Pałucka przedstawiła bardzo ciekawą koncepcję powiązania molekularnej charakterystyki puli genowej dużej liczby drzew matecznych (2574 przebadanych za pomocą loci cpSSR, oraz 605 drzew – za pomocą loci nSSR), co może być bardzo przydatne dla praktyki leśnej i konserwatorskiej. Moja pozytywna opinia dotyczy także poprawnego uzasadnienia hipotez badawczych, wynikających z rzetelnie przestudiowanej literatury przedmiotu, oraz z konsekwentnie prowadzonych badań własnych w oparciu o nowoczesne narzędzia biologii molekularnej: 14 neutralnych selekcyjnie markerów mikrosatelitarnych (9 markerów chloroplastowych i 5 markerów jądrowych). Cała praca została logicznie i poprawnie przedstawiona. Wstęp, Przegląd literatury, Materiał i Metody, Wyniki oraz Dyskusję poparto ponad trzystu pozycjami

literatury, w większości angielskojęzycznej. Na szczególną uwagę zasługuje wnikliwa analiza szeregu parametrów, badanych osobno dla loci cpSSR i nSSR stosując m.in. analizy dyskryminacyjne składowych głównych (DAPC) i statystykę globalną / Morana, co jest istotne w badaniach przestrzennej struktury genetycznej populacji drzew leśnych.

Przesłana mi do recenzji rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. z 27 września 2017 r., poz. 1789) oraz art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669 ze zm.), zatem przedstawiam przed Wysoką Radą Naukową Uniwersytetu im. Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy wniosek o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Pałuckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Justyna Nowakowska

Warszawa, dnia 25 sierpnia 2023 roku