



dr hab. Ewa Chudzińska prof. UAM
Zakład Genetyki
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
email: evpell@amu.edu.pl

Imię i nazwisko kandydata: Justyna Żabicka

Tytuł rozprawy doktorskiej: Genetic diversity and the postglacial colonization of closely related species, *Viola epipsila* Ledeb. and *V. palustris* L., in their circumboreal range using non-coding nuclear and chloroplast DNA regions.

Promotor: Prof. dr. hab. Elżbieta Kuta

Promotor pomocniczy: dr hab. Aneta Słomka prof. UJ

Recenzent: dr hab. Ewa Chudzińska prof. UAM

Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań:

Recenzowana rozprawa wpisuje się w ważny nurt badań dotyczących zmienności genetycznej gatunków o cyrkumborealnym zasięgu zasiedlających tereny podmokłe. Systematyczne kurczenie się tych obszarów jest konsekwencją postępujących zmian klimatycznych i redukcji wilgotnych siedlisk w efekcie działalności człowieka. Przekształcanie środowiska prowadzące do obniżania się poziomu wód skutkuje zanikaniem związanych z nimi gatunków, które potrzebują coraz ściślejszej ochrony. Skuteczna ochrona wymaga jednak precyzyjnego określenia, jakie rośliny mają jej podlegać. Praca dostarcza w tym zakresie nowych informacji dotyczących blisko spokrewnionych gatunków z rodzaju *Viola* należących do kompleksu *Viola epipsila-V. palustris*, który od wielu lat stanowi obiekt badań prowadzonych w Zakładzie Cytologii i Embriologii roślin Instytutu Botaniki UJ. Złożona systematyka rodzaju wynikająca między innymi z poliploidyzacji i nagminnej hybrydyzacji występującej między blisko spokrewnionymi gatunkami sprawia, że badany kompleks stanowi grupę o



skomplikowanej taksonomii. W jej skład wchodzi związany z zagrożonymi ekosystemami lecz nie podlegający ochronie gatunkowej oktaploidalny fiołek błotny (*V. palustris* L.) i krytycznie zagrożony w zasięgu europejskim, podlegający w Polsce ścisłej ochronie tetraploidalny fiołek torfowy (*V. epipsila* Ledeb.). Uzyskane przez Doktorantkę wyniki dostarczają nowych danych na temat aktualnego stanu genetycznego zróżnicowania populacji. Jest to szczególnie istotne ze względu na zmiany w liczebności gatunków, które zalicza się do bio wskaźników degradacji podmokłych i torfowiskowych ekosystemów. Ponieważ jedynie niewielki procent badanych osobników z Polski został zidentyfikowany jako *V. epipsila*, a żaden z okazów pochodzących z pozostałych stanowisk nie należał do tego gatunku, potwierdzone zostało ryzyko wyginięcia *V. epipsila* w Europie Środkowej. Praca doktorska zawiera też szczegółowe omówienie i rewizję statusu taksonomicznego gatunków wchodzących w skład kompleksu i, dzięki zastosowaniu wielu podejść metodycznych, dostarcza nowych informacji poszerzających wiedzę o ekogenetyce i możliwych kierunkach kolonizacji postglacjalnej tej interesującej grupy roślin z rodzaju *Viola* L.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów*

*Załączone prace opublikowane zostały w czasopismach wyróżnionych przez Journal Citation Reports

Artykuł 1.

Interspecific Hybridization and Introgression Influence Biodiversity—Based on Genetic Diversity of Central European *Viola epipsila*-*V. palustris* Complex

Żabicka, J; Migdalek, G; Słomka, A; Sliwinska, E; Mackiewicz, L; Keczynski, A; Kuta, E., 2020

W pracy na podstawie szczegółowej analizy morfologicznej roślin pochodzących z polskich populacji udało się wyznaczyć jedną stabilną cechę dającą możliwość rozróżnienia badanych taksonów. Dane dotyczące wielkości genomu ($4x = 2,52$ pg, $6x = 3,42$ pg, $8x = 4,26$ pg) posłużyły do oceny stopnia ploidalności. Pozwoliło to określić, w których regionach występują populacje mieszane, z obydwoma gatunkami – *V. epipsila* i *V. palustris*; jaki jest udział mieszańców F1 i jak liczne są populacje introgresantów. Wykorzystanie markerów molekularnych umożliwiło opisanie zróżnicowania genetycznego populacji i sprawdzenie



kierunku krzyżowań. W badanych populacjach stwierdzono niski poziom zmienności wynikający prawdopodobnie z dużego udziału samozapylania i rozmnażania wegetatywnego. Haplotypy zidentyfikowane na podstawie cpDNA wskazują, że mieszańce powstały na drodze krzyżowania, w którym *V. epipsila* był rośliną mateczną a *V. palustris* dawcą pyłku.

Diversity-Basel: sumaryczny Impact Factor wynosi 2,4 (pięcioletni IF = 2,5), liczba punktów MNiSW - 70, liczba cytowań według danych z Web of Science z 18.09.2023 r. - 8

Artykuł 2.

Genetic Variation versus Morphological Variability in European Peatland Violets (*Viola epipsila-V. palustris* Group)

Żabicka, J; Kirschey, T; Migdalek, G; Słomka, A; Kuta, E., 2023

Głównym celem Autorów w drugim z artykułów wchodzących w skład dysertacji była rekonstrukcja pochodzenia *V. pubifolia* i weryfikacja jego statusu taksonomicznego w oparciu o dane morfologiczne, cytologiczne i molekularne. Punktem wyjścia było określenie pokrewieństwa genetycznego z przypuszczalnymi gatunkami rodzicielskimi – *V. palustris* i *V. epipsila*. Na podstawie analizy markerów ISSR, sekwencjonowania NGS i zbadania jądrowego genu GPI udokumentowano wspólne pochodzenie *V. pubifolia* i *V. palustris* wynikające z hybrydyzacji, a następnie poliploidyzacji. Stwierdzono brak podstaw do wyodrębnienia *V. pubifolia* jako odrębnego gatunku, ponieważ jego cechy morfologiczne a także zmienność genetyczna mieszczą się w zakresie zmienności *V. palustris*. Różnice w parametrach opisujących zróżnicowanie genetyczne i heterozygotyczność między europejskimi populacjami *V. epipsila*, *V. palustris* i *V. pubifolia* sugerują zdaniem Autorów zróżnicowaną tolerancję gatunków na zmieniające się warunki środowiskowe i potwierdzają konieczność ochrony *V. epipsila*.

Biology-Basel: sumaryczny Impact Factor wynosi 4,2 (pięcioletni IF = 4,4), liczba punktów MNiSW - 100, brak cytowań według danych z Web of Science z 18.09.2023 r.

Manuskrypt w języku angielskim stanowiący tekst przygotowany do publikacji (Elaboration).

Genetic diversity and phylogeography of circumboreal peatland violets (*Viola epipsila-V. palustris* complex, Violaceae) as inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA regions



Żabicka, J.; Migdalek, G; Marcussen, T; Sliwiska, E; Słomka, A; Mackiewicz, L; Kuta, E.

Zgodnie z deklaracją Autorki celem pracy było wykorzystanie danych na temat zróżnicowania genetycznego kompleksu *Viola epipsila-V. palustris* do określenia udziału międzygatunkowej hybrydyzacji w przepływie genów w całym zasięgu wraz z odtworzeniem historii rekolonizacji polodowcowej na podstawie ich obecnego rozmieszczenia. Wyniki analiz ISSR i ocena wielkości genomu pozwoliły w ramach kompleksu wyróżnić nst. taksony: *Viola epipsila*, *V. palustris*, *V. suecica*, *V. pluviale* i mieszańca F1: *V. epipsila* x *V. palustris*. Brak jednoznacznie różnicujących cech morfologicznych i łatwość krzyżowań między taksonami pozostawia kwestię ich rangi systematycznej otwartą. Wykryto znaczące różnice w poziomie zmienności między taksonami, z których najwyższą zmiennością charakteryzował się *V. suecica* a najniższą postglacjalne relikty – *V. epipsila* i *V. palustris*. Na podstawie analizy haplotypów sformułowano wnioski dotyczące możliwych dróg rekolonizacji terenów polodowcowych przez taksony należące do kompleksu *V. epipsila-V. palustris*.

Wartość merytoryczna rozprawy

Zgodnie z tytułem tematyka badawcza dysertacji koncentruje się wokół poznania struktury genetycznej i dróg postglacjalnej kolonizacji blisko spokrewnionych taksonów wchodzących w skład kompleksu *V. epipsila-V. palustris*. Interesujący problem badawczy, którego rozwiązania podjęła się Doktorantka ze względu na złożoną pozycję taksonomiczną obiektu badań i słabo poznane zróżnicowanie genetyczne analizowanych populacji stanowił ambitny cel. Uważam, że zastosowane w badaniach podejście metodyczne było optymalne, a Autorka wykorzystwała szeroki wachlarz nowoczesnych technik i opracowań statystycznych, co pozwoliło zrealizować założenia pracy. Mgr Justyna Żabicka w obszernym wprowadzeniu w oparciu o istniejącą wiedzę w klarowny sposób przedstawiła informacje o badanych gatunkach, wyjaśniła zawiłości taksonomiczne, uzasadniła dobór metod badawczych i podsumowała główne wyniki prac. Mimo prawidłowej analizy danych uważam, że zastosowany układ rozprawy utrudnia ocenę efektów weryfikacji poszczególnych hipotez badawczych, których kolejność przedstawiona w streszczeniu nie pokrywa się z kolejnością zagadnień badanych w załączonych materiałach (Artykuł 1., 2., Manuskrypt). Choć w podsumowaniu badań Doktorantka podkreśla, że wszystkie hipotezy zostały potwierdzone



„The results clearly indicated that the assumptions of the research hypotheses were verified/confirmed”, to odniesienie wyników do konkretnych hipotez nie jest proste. Pomimo drobnych zastrzeżeń do sposobu interpretacji uważam, że wysnute wnioski są spójne, co wskazuje, że mgr Justyna Żabicka potrafi krytycznie analizować wyniki badań. W trakcie lektury dysertacji nasunęło mi się kilka pytań, poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich. 1. Poszczególne elementy rozprawy nie definiują jednoznacznie jakie gatunki/taksony? wchodzi w skład badanego kompleksu i dlaczego w tytule skupiono się tylko na dwóch, skoro zarówno w Artykule 2. i w manuskrypcie omówiono ich w sumie pięć. 2. W pracy została postawiona hipoteza zakładająca przydatność markerów cpDNA do analiz taksonomicznych i filogenetycznych blisko spokrewnionych gatunków z kompleksu *Viola epipsila-V. palustris*. 3. Dlaczego stawiając hipotezy badawcze zaplanowano jedynie potwierdzenie przydatności cpDNA, choć w pracy zastosowane zostało znacznie szersze niż cpDNA spektrum markerów molekularnych? 4. Poproszę o wyjaśnienie, z czego wynika, że raz *Viola epipsila-V. palustris* określany jest jako kompleks gatunków a innym razem jako grupa gatunków. Na czym polega różnica? 5. Czy zdaniem Doktorantki rodzaj *Viola* ze względu na skomplikowaną taksonomię i niejasności związane z kryterium gatunku jest dobrym modelem do badania zmienności genetycznej w obliczu zmian klimatycznych?

W mojej opinii wieloaspektowe podejście do zagadnienia wraz z wykorzystaniem metod opartych na analizach markerów molekularnych w połączeniu z badaniami morfologicznymi, cytologicznymi czy wreszcie embriologicznymi i opracowanie wyników przy pomocy zaawansowanych narzędzi statystycznych pozwoliło na opisanie mechanizmów decydujących o zróżnicowaniu genetycznym w populacjach *Viola epipsila* Ledeb. i *V. palustris* L., co stanowi o wysokiej ocenie merytorycznej strony rozprawy.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Przedłożona do recenzji dysertacja ma charakter złożony. Zawiera streszczenie (w języku polskim) i Abstract (w języku angielskim). W dalszej części znajduje się Wstęp (General introduction), który stanowi kompendium wiedzy na temat zagadnień będących przedmiotem pracy doktorskiej. Na 11 stronach zakończonych dwustronicowymi konkluzjami zamieszczono uzasadnienie dla podjęcia badań, opisano cele i sformułowano hipotezy



badawcze. Całość uzupełnia spis cytowanej literatury zawierający 42 pozycje. Na kolejne elementy rozprawy składają się kopie dwóch oryginalnych prac naukowych wraz z materiałami uzupełniającymi (Supplementary materials). W załączonej dokumentacji znajduje się ponadto manuskrypt w języku angielskim stanowiący tekst przygotowany do publikacji (Elaboration). Rozprawa napisana jest w sposób świadczący o dobrym opanowaniu przez Autorkę techniki pisania pracy. Język dysertacji jest przystępny, zrozumiały, a przy tym profesjonalny. Drobne błędy edytorskie, których przykłady wymieniam poniżej nie wpływają na pozytywną ocenę poprawności redakcyjnej rozprawy.

Uwagi krytyczne

Uwagi szczegółowe

Zamieszczenie rysunków poza tekstem manuskryptu utrudnia ocenę, czy będą one umieszczone właściwie.

Literatura wymaga ujednoczenia stylu (np. kropki po dacie wydania, kropki po liczbie stron, tabulacja)

Kilka drobnych przykładowych błędów

Str. 11 *genetic variation* nie *genetic variations*

Str. 1 opis Fig.1 nieczytelne nazwy taksonomiczne na załączonych zdjęciach

Str. 14 opis Fig. 2 *Plagiostigma* nie *Plagisotigma*

Str. 21: 13 *haplotypes* nie 13 *halotypes*

Podsumowanie

Postępujące zmiany klimatyczne i wzrastająca antropopresja rodzą obawy co do możliwości adaptacyjnych i ograniczenia puli genowej europejskich populacji gatunków należących do kompleksu *Viola epipsila-V. palustris* zasiedlających podmokłe tereny. Ze względu na wysoką zmienność morfologiczną jednoznaczna identyfikacja taksonomiczna jest bardzo trudna, szczególnie gdy występowanie roślin jest sympatryczne. Prezentowane rezultaty badań przeprowadzonych przez mgr Justynę Żabicką wpisują się w szeroki zakres działań na rzecz ochrony naturalnie występującej zmienności genetycznej populacji roślin, która sprzyja




stabilności ekosystemów. O ich wadze świadczy przyznanie Doktorantce środków na badania w postaci m. in. grantu PRELUDIUM „Badanie zróżnicowania genetycznego oraz polodowcowej kolonizacji dwóch blisko spokrewnionych gatunków *Viola epipsila* i *Viola palustris* w cyrkumborealnym zasięgu” oraz funduszy z europejskiego projektu „LIFE PEAT RESTORE”. Uzyskane wyniki dostarczają nowych informacji na temat wpływu globalnych zmian klimatycznych na zasięgi gatunków i pozwalają z szerszej perspektywy ocenić ich przyczyny i skutki. Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi ważny wkład w zrozumienie procesów zachodzących w naturalnych populacjach gatunków związanych z zagrożonymi ekstynkcją ekosystemami.

Wniosek końcowy

Na podstawie szczegółowej analizy dysertację mgr Justyny Żabickiej oceniam jako właściwą pod względem formalnym i wartościową pod względem merytorycznym. Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Justyny Żabickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. UAM dr hab. Ewa Chudzińska

Poznań, dn. 18 września 2023 r.

Kierownik
Zakładu Genetyki

prof. UAM dr hab. Ewa Chudzińska