

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Justyny Żabickiej pt. „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”

wykonana na zlecenie

Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

W ostatnich kilkunastu latach obserwujemy bardzo szybko postępujące zmiany klimatyczne w porównaniu z naturalnymi cyklami klimatycznymi, które miały miejsce w historii Ziemi. Głównym czynnikiem przyspieszającym te zmiany jest emisja gazów cieplarnianych, jak np. dwutlenku węgla (CO₂), metanu (CH₄) i podtlenku azotu (N₂O). Gazy te zatrzymują ciepło w atmosferze, co powoduje wzrost temperatury na Ziemi. Wśród czynników przyczyniających się do emisji gazów cieplarnianych wymienia się dwie grupy: antropogeniczne, jak deforestacja, postępująca urbanizacja, intensywny przemysł, szczególnie ciężki, produkcja rolnicza czy transport oraz procesy naturalne, jak: wulkanizm i zmiany słoneczne. Ta druga grupa jednak wydaje się być zdominowana przez wpływ człowieka.

Zmiany klimatyczne mają istotny wpływ na funkcjonowanie ekosystemów na całym świecie, w tym na zmiany jakie zachodzą w naturalnych populacjach roślin i zwierząt. Wzrost temperatury, zmiany opadów, ekstremalne zjawiska pogodowe i inne skutki zmian klimatycznych wpływają na te populacje na różne sposoby. W miarę wzrostu temperatury na świecie obserwuje się przesunięcie stref klimatycznych w kierunku biegunów i ku wyższym wysokościami. Dla różnych gatunków roślin, przystosowanych do konkretnych warunków klimatycznych, stanowi to wyzwanie, gdyż będą one miały trudności w przetrwaniu w nowych warunkach. Zmiany w długości i intensywności pór roku mogą wpływać na możliwości reprodukcyjne roślin. Zmniejszenie ilości opadów, zmienność w opadach i coraz częściej występująca susza fizjologiczna może sprawić, że niektóre gatunki będą miały trudności nie tylko w przetrwaniu, ale niekorzystnie wpływa to na ich płodność, przez co zaburza równowagę genetyczną w populacjach i między nimi na rzecz bardziej konkurencyjnych gatunków, zwiększając w nowych warunkach ich dominację. Nie wolno

także zapominać o tym, że rośliny są częścią złożonych ekosystemów, w których zachodzą liczne interakcje z innymi organizmami, takimi jak zwierzęta zapylające, drapieżniki i patogeny. Zmiany klimatyczne wpływają na te interakcje, co może mieć dalekosiężne skutki dla populacji wielu gatunków roślin.

Wreszcie, zmiany klimatyczne mogą sprzyjać rozprzestrzenianiu się gatunków obcych, w tym inwazyjnym, które mogą wypierać rodzime gatunki roślin. W rezultacie, w niektórych obszarach możemy obserwować spadek różnorodności biologicznej, co ma potencjalnie negatywne konsekwencje dla funkcjonowania ekosystemów i dla ludzi, którzy są zależni od usług ekosystemowych, takich jak dostarczanie pożywienia, wody i innych surowców. Ochrona różnorodności biologicznej, w kontekście ograniczenia zmian klimatycznych oraz adaptacji roślin do już zachodzących zmian jest zatem jednym z najbardziej pilnych i priorytetowych tematów nie tylko społecznych ale także naukowych.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Justyny Żabickiej jest wartościowym, oryginalnym opracowaniem naukowym, wpisującym się w tematykę zmian zachodzących w kompleksie *Viola epipsila* – *V. palustris* w zasięgu cirkumborealnym. Należy zgodzić się z doktorantką, że kompleks ten jest cyt. „skomplikowany taksonomicznie, gdyż gatunki są blisko spokrewnione, mogą krzyżować się między sobą, tworząc mieszańce co utrudnia identyfikację”. W analizach cytogenetycznych, dodatkowym utrudnieniem są różne poziomy poliploidalności gatunków wchodzących w skład kompleksu.

Treść dysertacji w pełni odpowiada tematowi określoneemu w tytule. Opracowanie zawiera wyniki szeroko zakrojonych badań, które obok walorów poznawczych stać się mogą cennym źródłem informacji dla botaników i ekologów oraz innych osób oceniających skutki zmian klimatycznych. Autorka rozprawy podjęła się realizacji badań zmierzających do uzyskania wiedzy pozwalającej ocenić wpływ globalnych zmian klimatycznych na bioróżnorodność, przeprowadzając wiele pracochłonnych analiz z udziałem bardzo obszernego materiału roślinnego, pochodzącego z szerokiego okołoborealnego zasięgu.

Leżący w obszarze naukowych zainteresowań doktorantki kompleks *V. epipsila* – *V. palustris* jest szczególnie cennym i interesującym obiektem badawczym w kontekście zachodzących zmian klimatycznych, ponieważ gatunki te, poza tym, że są ważnym składnikiem ekosystemu bagienno-torfowiskowego, mogą stanowić tzw. gatunki

wskaźnikowe niekorzystnych zmian tego ekosystemu, a w szczególności zanikania ich naturalnego miejsca występowania jakim są torfowiska i tereny bagienne. Ochrona torfowisk ma znaczenie nie tylko dla lokalnych ekosystemów, ale także dla globalnego klimatu i zachowania różnorodności biologicznej. Zanikanie torfowisk podmokłych jest poważnym problemem ekologicznym o globalnym znaczeniu. Znaczenie torfowisk polega na ich zdolności do gromadzenia ogromnych ilości węgla oraz na pełnieniu roli naturalnych oczyszczalni wód opadowych. Zanikanie torfowisk ma miejsce na skutek różnych czynników, w tym zmian klimatycznych, które mogą wpłynąć na bilans wodny torfowisk. Długie okresy suszy lub nadmierne opady mogą zakłócić naturalne procesy zachodzące w torfowiskach. Zanikanie torfowisk ma poważne konsekwencje dla środowiska i klimatu, ponieważ prowadzi do uwolnienia zgromadzonego w nich węgla, co z kolei przyspiesza zmiany klimatyczne. Ponadto, utrata tych ekosystemów wpływa na różnorodność biologiczną i może prowadzić do utraty gatunków z nimi związanych. Aby przeciwdziałać zanikaniu torfowisk, istotne jest podejmowanie działań, takich jak m.in. prowadzenie badań naukowych oraz monitorowanie stanu torfowisk w celu zrozumienia zachodzących na nich procesów i opracowania skuteczniejszych strategii ochrony.

Podstawę rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Żabickiej stanowi zestaw trzech wieloautorskich, oryginalnych publikacji naukowych (dwóch opublikowanych oraz jednej przygotowanej do druku). Są to:

1. Żabicka J., Migdałek G., Słomka A., Śliwiska E., Mackiewicz L., Keczyński A., Kuta E. 2020. Interspecific hybridization and introgression influence biodiversity - based on genetic diversity of Central European *Viola epipsila* – *V. palustris* complex. *Diversity* 12, 321 (IF=2,4);
2. Żabicka J., Kirschev T., Migdałek G., Słomka A., Kuta E. 2023. Genetic variation versus morphological variability in European peatland violets (*Viola epipsila* – *V. palustris* group). *Biology* (IF=4,2);
3. Żabicka J., Migdałek G., Marcussen T., Śliwiska E., Słomka A., Mackiewicz L., Kuta E. Genetic diversity and phylogeography of circumboreal peatland violets (*Viola epipsila*-*V. palustris* complex, *Violaceae*) as inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA regions (przygotowana do publikacji).

Dwie prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. We wszystkich pracach doktorantka jest pierwszym autorem, a jednocześnie w dwóch opublikowanych pracach autorem korespondencyjnym. Deklarowany przez doktorantkę udział w badaniach i przygotowaniu wszystkich publikacji wynosi 70-75%, a pozostałych poszczególnych współautorów mieścić się w zakresie od 5% do 12 %. Dołączone oświadczenia wszystkich autorów publikacji stanowiących podstawę dysertacji doktorskiej potwierdzają fakt, iż doktorantka jest autorką koncepcji i metodyki badań, zebrała i przygotowała materiał roślinny oraz wykonała analizy wybranych cech morfologicznych badanych gatunków i formy mieszańcowej. W celu przeprowadzenia prawidłowej analizy i interpretacji wyników badań wykonała dość skomplikowane i różnorodne analizy statystyczne i część analiz bioinformatycznych. Była też główną osobą przygotowującą manuskrypty publikacji.

Należy zatem stwierdzić, że nie zachodzą żadne przesłanki natury formalnej i prawnej by nie uznać przedstawionego zestawu oryginalnych publikacji, jako autorskie i oryginalne opracowanie problemu badawczego kwalifikujące się na dysertację doktorską Pani mgr Justyny Żabickiej.

Oprócz załączonych prac, rozprawa zawiera część opisową, na którą składają się: streszczenie w języku polskim (brakuje tu tytułu rozprawy doktorskiej w języku polskim) i angielskim, dwunastostronicowe wprowadzenie oraz wnioski końcowe przedstawione w formie opisowej. Łącznie z wykazem piśmiennictwa, stanowiącym 42 pozycje, dysertacja poza publikacjami stanowiącymi zestaw, liczy 30 stron maszynopisu.

We wprowadzeniu doktorantka w pierwszej kolejności odnosi się do czynników wpływających na zmienność genetyczną w populacjach roślin oraz charakteryzuje rodzaj *Viola L.* jako model badawczy zmienności genetycznej wywoływanej zmianami klimatycznymi. W dalszej części wprowadzenia opisuje cele główne dysertacji, podaje hipotezy badawcze oraz zadania i metody badawcze z uwzględnieniem materiału roślinnego. Doktorantka w części opisowej posiłkuje się sześcioma rysunkami.

Podkreślenia wymaga fakt, iż, jak pisze sama doktorantka, podjęte przez nią badania są kontynuacją wieloletniej historii badań nad rodzajem *Viola L.* prowadzonych w Katedrze Cytologii i Embriologii Roślin UJ pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Elżbiety Kuta. Ma to w mojej opinii duże znaczenie, gdyż to w tej jednostce doktorantka doskonaliła warsztat badawczy i tu powstawał plan badawczy.

Na szczególną uwagę zasługuje dobór materiału badawczego (roślinnego), jego ilość i zasięg terytorialny jego pochodzenia. Materiał roślinny pochodził z licznych stanowisk zlokalizowanych w różnych krajach na trzech kontynentach: Europy, Ameryki Północnej i Azji. Doktorantka w poszczególnych etapach (publikacjach) stopniowo poszerzała swoje badania o coraz bardziej zróżnicowany materiał badawczy. W pierwszej pracy opublikowanej w czasopiśmie „*Diversity*” przedstawiono wyniki badań w oparciu o materiał roślinny pochodzący z trzech krajów europejskich, tj. Polski, Niemiec i Litwy. W kolejnej pracy, opublikowanej w czasopiśmie „*Biology*” przedstawiono już wyniki badań z wykorzystaniem materiału pochodzącego z czterech krajów Europy (dołączono jedno stanowisko z Norwegii). Natomiast ostatnia (przygotowana do publikacji) praca zawiera wyniki badań wykonane na materiale pochodzącym ze 113 stanowisk zlokalizowanych w 19 krajach na trzech kontynentach. Ma to ogromne znaczenie w badaniach nad oceną zróżnicowania genetycznego w obrębie populacji i pomiędzy populacjami, a także w ocenie zmienności poszczególnych cech jakościowych i ilościowych. Zebranie, potwierdzenie tożsamości gatunkowej i utrzymanie tak liczego materiału roślinnego do przeprowadzenia analiz morfologicznych, cytologicznych i molekularnych, wymagało od doktorantki nie tylko jasno sprecyzowanej wizji badawczej ale także ogromnej ilości czasu i pracy.

Kolejną, wartą podkreślenia kwestią jest odpowiedni dobór metod i narzędzi analitycznych, tj. analiz morfologicznych, cytologicznych (rozmiar genomu metodą cytometrii przepływowowej) oraz molekularnych (markery ISSR i cp DNA). We wszystkich pracach, poszczególne analizy zostały w mojej opinii zaplanowane poprawnie z zastosowaniem logiki badawczej i wykonane zgodnie z poprawnym protokołem.

We wszystkich pracach składających się na ocenianą dysertację zastosowano nowoczesne, zaawansowane metody statystyczne i bioinformatyczne oraz spełniający obecne standardy, czytelny graficzny sposób prezentacji wyników badań. Ma to niezwykle znaczenie przy tak obszernym materiale badawczym i rozbudowanej koncepcji przeprowadzenia badań. Jak wynika z oświadczeń złożonych przez doktorantkę i pozostałych współautorów, analizy statystyczne wyników badań zostały przeprowadzone osobiście przez doktorantkę. Podobnie rzecz się miała z analizami bioinformatycznymi, w przypadku których doktorantka korzystała z pomocy jednego ze współautorów. W mojej opinii, opracowanie statystyczne wyników badań, jak też analizy bioinformatyczne w tego typu pracach, z udziałem tak obszernego materiału roślinnego, z wykorzystaniem metod i nadzwyczaj

licznych narzędzi analitycznych, które zostały tu zastosowane, ma fundamentalne znaczenie bo pozwala nie tylko na poprawne wnioskowanie i weryfikację hipotez badawczych, ale świadczy również o dojrzałości badacza pozwalającej na odpowiednie zaplanowanie poszczególnych etapów badań. Doktorantka, w mojej opinii wykazała się nie tylko wiedzą botaniczną, ale także genetyczną i statystyczną, zatem w pełni sprostała trudnym wyzwaniom badawczym.

Doktorantka zastosowała w sumie kilkanaście różnych narzędzi informatycznych. Zastosowane metody statystyczne oraz narzędzia – programy komputerowe nie budzą zastrzeżeń i w każdym przypadku są dobrze opisane ze wskazaniem wersji oprogramowania i wcześniejszego ich wykorzystania do tego typu badań.

W każdej z prac przeprowadzona została ciekawa dyskusja wyników własnych w konfrontacji z literaturą naukową. Cytowane piśmiennictwo we wszystkich elementach dysertacji liczy sumarycznie 347 pozycji literatury naukowej (część z nich w oczywisty sposób się powtarza) o zasięgu światowym i jest trafnie dobrane.

Do najbardziej znaczących osiągnięć doktorantki zaliczam:

1. Wykazanie ze znacznym prawdopodobieństwem, że na skutek zmian klimatycznych naturalne siedliska *Viola epipsila* i *V. palustris*, zwłaszcza *V. epipsila*, jakim są torfowiska, zanikają, o czym może świadczyć drastycznie zmniejszająca się liczebność tych gatunków, zmieniające się zróżnicowanie genetyczne oraz struktura populacji. Dodatkowo, pojawiające się mieszańce międzygatunkowe z blisko spokrewnionym gatunkiem *V. palustris* o różnym stopniu introgresji wypierają *V. epipsila*, co także jest wskaźnikiem zachodzących zmian torfowisk.
2. Odkrycie prawdopodobnego nowego statusu gatunku *Viola pubifolia* i stwierdzenie na podstawie cech morfologicznych roślin tego gatunku, że mieszczą się one w zakresie zmienności *V. palustris*. Ponadto stwierdzenie, na bazie markerów ISSR, GPI i RAD-Seq, że pod względem genetycznym *V. pubifolia* odpowiada *V. palustris* z podkreśleniem faktu, iż zróżnicowanie genetyczne *V. palustris* okazało się być tylko nieznacznie większe niż u *V. pubifolia* i wszystkie badane egzemplarze roślin *V. pubifolia* zgrupowały się razem z *V. palustris*.
3. Stwierdzenie na podstawie wyników badań własnych, że w zmieniającym się środowisku poziom zróżnicowania genetycznego populacji może być ważną

wskazówką do przewidywania zagrożeń dla przetrwania gatunków zasiedlających tereny podmokłe i torfowiska. Niski poziom zróżnicowania genetycznego i heterozygotyczności wybranych populacji *V. epipsila* z Europy Środkowej i Północnej potwierdzona badaniem RAD-Seq może wyjaśniać niską tolerancję na zmieniające się środowisko i wskazywać ryzyko wyginięcia tego gatunku.

4. Wskazanie kierunków i szlaków migracji gatunków kompleksu *V. epipsila-V. palustris* i odkrycie, że Skandynawia to obszar, na którym spotykały się szlaki migracyjne z różnych kierunków, czego efektem jest duże zróżnicowanie genetyczne i unikalne haplotypy.
5. Wskazanie szeregu zaleceń w zakresie wykorzystania tego typu badań do oszacowania stanu terenów podmokłych i torfowisk, jako wrażliwych na szybko postępujące zmiany klimatyczne. Dodatkowo, wskazanie możliwości ochrony i restytucji cennych zasobów genowych gatunków kompleksu *V. epipsila- V. palustris*.

Po zapoznaniu się z treścią wniosków, a następnie z doskonale przeprowadzoną dyskusją w każdej z części dysertacji i na koniec przedstawionymi perspektywami, można być przekonanym, że autorka doskonale pojmowała istotę prowadzonych przez siebie badań i ma świadomość znaczenia uzyskanych wyników. Ponadto, niewątpliwą wartością dodaną jest opublikowanie wyników badań w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, ale także fakt zdeponowania odkrytych sekwencji cpDNA w Banku Genów.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska autorstwa Pani mgr Justyny Żabickiej, jest kompletnym, wartościowym, merytorycznie bardzo dobrze przygotowanym opracowaniem, które spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Art. 13 ust. 1 i 4 Ustawy .o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz.U. z 2016 r. poz. 882).

W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Justyny Żabickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Jerzy Andrzej Przyborowski, prof. UWM



Olsztyn, dn. 8 listopada 2023r.