Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 75 21
e-mail: dziekles@up.poznan.pl

WYDZIAŁ LEŚNY
I TECHNOLOGII
DREWNA

Poznań, 13 maja, 2024 r.

Dr hab. Monika Dering
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Leśny i Technologii Drewna
Katedra Hodowli Lasu
monika.dering@up.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Sylwii Eryki Milarskiej pt.:
„Genetyczna charakterystyka wybranych alpejskich i arktyczno-alpejskich gatunków z rodzaju *Cerastium* L. (Caryophyllaceae)"

Podstawa prawna

Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie do pełnienia funkcji recenzentki w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego *doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne* Pani mgr Sylwii Eryce Milarskiej. Zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (tj. Dz.U. 2017 poz. 1789, dalej jako: u.s.n.), oraz z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.), recenzent ocenia, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej doktoranta w dyscyplinie, a także umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podstawa faktyczna recenzji

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Sylwii Eryki Milarskiej napisana pod kierunkiem promotora dr. hab. Piotra Androsiuka została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych,

składającego się z dwóch oryginalnych publikacji. Prace stanowiące podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej ukazały się w indeksowanych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, które są wykazane na liście czasopism MEiN wraz z przypisaną im punktacją. Są to: (1): Journal of Applied Genetics o IF_{2022} – 2.4 i 140 pkt. MEiN oraz (2) Scientific Reports o IF_{2022} – 4.6, również 140 pkt. MEiN. W obu artykułach Doktorantka jest pierwszą Autorką, co sugeruje jej wiodący udział w badanych i powstawaniu manuskryptów artykułów, natomiast Promotor pełni funkcję autora korespondencyjnego. Obie prace są wieloautorskie, ale z analizy oświadczeń współautorów (załączone do dysertacji w Rozdziale 10) wynika, że Doktorantka samodzielnie wykonała konkretne zadania badawcze pozwalające na wyodrębnienie jej indywidualnego wkładu w realizowanych badaniach stanowiących podstawę dysertacji.

Dysertacja liczy 86 stron, z czego 36 to kopie artykułów będących podstawą pracy doktorskiej. Część merytoryczna dysertacji opisująca dokonania Doktorantki, czyli opublikowane artykuły, ma klasyczny układ w którym wyróżniony został Wstęp (Rozdział 2), Hipotezy i zadania badawcze (Rozdział 3), Materiały i metody (Rozdział 4), mówienie Wyników badań z podziałem na poszczególne publikacje (Rozdział 5) oraz Podsumowanie i wnioski (Rozdział 6); część merytoryczny kończy pięć stron spisu literatury (52 pozycje).

Wartość naukowa pracy

Przedstawiona do recenzji dysertacja jest wielowątkową pracą naukową prezentującą wyniki badań z zakresu kilku obszarów genetyki, m.in. genetyki populacyjnej, konserwatorskiej, filogenetyki i genetyki molekularnej. W swoich badaniach Doktorantka sięgając po narzędzia i metody obliczeniowe z tych dziedzin badawczych podjęła się wyjaśnienia (1) pozycji filogenetycznej trzech arktyczno-alpejskich gatunków z rodzaju *Cerastium* należących do kompleksu *C. alpinum-C. arcticum* i czasu dywergencji w oparciu o całogenomowe sekwencji DNA chloroplastowego, które wygenerowała w trakcie swojego doktoratu (Publikacja 1) oraz (2) analizy struktury genetycznej izolowanych populacji *C. alpinum* z Masywu Babiej Góry na tle trzech wybranych populacji referencyjnych w celu dokonania oceny ich zasobów genowych w kontekście ryzyka wyginięcia tych populacji i podjęcia działań w celu zapewnienia ich trwałości (Publikacja 2).

Kolejne raporty IPCC (*Intergovermental Panel on Climate Change*) wyraźnie podkreślają, że zbiorowiska tundrowe oraz subalpejskie i alpejskie są jednymi

wrib.up.poznan.pl/pl

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 75 21
e-mail: dziekles@up.poznan.pl

z najbardziej zagrożonych zbiorowisk z powodu zachodzących zmianan środowiskowych wywołanych nadmiernymi emisjami antropogenicznymi. Wobec ocieplania się klimatu i zwiększonej depozycji azotu na obszarach północnych i wysokogórskich, gatunki arktyczno-alpejskie są narażone na redukcję i fragmentację swoich zasięgów, oraz zwiększoną konkurencję ze strony innych gatunków wkraczających na obszary/siedliska do tej pory zajmowane przez tą specyficzną grupę roślin. Flora arktyczno-alpejska kształtowała się na przestrzeni kilku epok geologicznych w wyniku działania różnych procesów biogeograficznych, choć czwartorzędowe przemiany klimatyczne były kluczowe dla obecnego ich składu oraz zasięgów poszczególnych gatunków. Gatunki obszarów alpejskich stanowią około 4% znanych gatunków roślin wyższych, co bezsprzecznie dowodzi ich ogromnego znaczenia. Odnajduje to potwierdzenie w ogromnej liczbie badań poświęcanych tej grupie roślin. Uważam zatem, że podjęta w dysertacji przez Doktorantkę tematyka jest jak najbardziej aktualna.

Analiza poziomu zmienności genetycznej i zróżnicowania międzypopulacyjnego polskich populacji *C. alpinum*, gatunku krytycznie zagrożonego, to kolejny atut prezentowanych w dysertacji badań. Uzyskane przez Doktorantkę i cały zespół wyniki nie tylko dostarczają wiedzy o przebiegu neutralnych procesów ewolucyjnych w populacjach badanego gatunku, ale potencjalnie mogą być wykorzystane w projektowaniu działań ochroniarskich mających na celu zapobiegniecie jego wyginięciu z obszaru Polski. Ten aspekt pracy wpisuje się w trend badawczy będący odpowiedzią na apel środowiska naukowego zajmującego się ochroną bioróżnorodności o włączenie w działania ochroniarskie analizy zmienności genetycznej, w tym prowadzenie monitoringu genetycznego czy uwzględnianie podstawowych parametrów struktury genetycznej by skuteczniej przeciwdziałać wymieraniu populacji i gatunków. Podjęcie takiego tematu świadczy o znajomości przez Doktorantkę panujących trendów badawczych w obszarze genetyki konserwatorskiej.

Osiągnieciem pracy jest również ostateczne rozwiązanie kwestii filogenetycznych. Poza wyjaśnieniem pozycji systematycznej, Doktorantka była wstanie jednoznacznie rozróżnić wszystkie badane gatunki wchodzące w skład kompleksu *C. alpinum-C. arcticum.* Praca również dostarczyła prawdopodobnych ram czasowych dywergencji i dywersyfikacji w rodzaju, co pozwala na wnikliwszą analizę przebiegu filogenezy.

Niezaprzeczalnym walorem pracy są wygenerowane zasoby genomiczne

cpDNA dla tych trzech gatunków. Zdeponowane dane wzbogacają istniejący stan baz danych na temat zmienności genetycznej organizmów żywych i mogą być dostępne dla społeczności naukowej. W ten sposób dysertacja wypełnia funkcję utylitarną nauki.

Wartość merytoryczna pracy

Przedstawiona mi do oceny dysertacja stanowi logiczną całość, co świadczy o przemyślanej koncepcji. Na pięciu stronach Wstępu Doktorantka zaprezentowała obecny stan wiedzy na temat badanych gatunków (głównie struktury genetycznej populacji i relacji filogenetycznych w rodzaju), status ich zagrożenia i prawdopodobne przyczyny, scharakteryzowała markery genetyczne wykorzystane w pracy oraz użyteczność całogenomowych sekwencji DNA chloroplastowego w badaniach. Następnie, Doktorantka przedstawiła krótkie uzasadnienie dla konieczności prowadzenia badań i zaprezentowała główne cele pracy, którymi były (1) analiza zmienności genetycznej *C. alpinum* z obszaru Babiej Góry i (2) uzyskanie danych umożliwiających identyfikację oraz analizę powiązań filogenetycznych pomiędzy gatunkami kompleksu *C. alpinum* – *C. arcticum*. W pracy, Doktorantka sformułowała dwie hipotezy badawcze, które w toku badań testowała. Moje pierwsze krytyczne uwagi, i właściwie jedyne poważne, dotyczą właśnie poprawności formułowania hipotez. Na poprawnie sformułowaną hipotezę powinno móc się udzielić się jednoznacznej odpowiedzi *TAK* lub *NIE*. Oznacza to, że hipoteza musi być prosta, jednowątkowa i nie zawierać błędów logicznych. I tak, Hipoteza 1, zakłada 1) wystąpienie epizodu redukcji efektywnej wielkości populacji w historii demograficznej *C. alpinum*, 2) niski poziom zmienności genetycznej populacji wynikający z przejścia przez bottleneck oraz ślady erozji genetycznej. Jak udzielić odpowiedzi *TAK/NIE* na tak sformułowaną w pracy hipotezę, gdyby wyniki wskazywałby na brak bottleneck, ale populacje miałyby niski poziom zmienności genetycznej? Nie jest to możliwe, a zatem hipoteza jest niepoprawnie sformułowana. Jednocześnie takie brzmienie hipotezy wskazuje, że „ubiera" ona uzyskane wyniki, a więc została sformułowana na koniec badań, a nie na etapie ich planowania. Ponadto, czy niski poziom zmienności genetycznej nie jest sygnałem/śladem erozji genetycznej w wyniku zakładanego kryzysu demograficznego (bottleneck)? **W tym miejscu pytam** Doktorantkę, jakich śladów erozji genetycznej poszukiwała? Jakimi parametrami (oprócz niskich wskaźników zmiennościowych) chciała się posłużyć, by

wrib.up.poznan.pl/pl

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 75 21
e-mail: dziekles@up.poznan.pl

weryfikować hipotezę o erozji genetycznej? Przyznaję, że nie znajduje odprowadzi ani w dysertacji, ani w Publikacji 1. Niepoprawnie sformułowana jest również Hipoteza 2, która podobnie do H1 zakłada jedoczesne testowanie kilku założeń, tj. 1) pewnej typowości genomu chloroplastowego trzech gatunków w porównaniu do gatunków okrytozalążkowych; 2) jednoczesnej jego specyficzności gatunkowej użytecznej w diagnostyce gatunku (co czyni tę hipotezę sprzeczną wewnętrznie) oraz wreszcie 3) skuteczności w wyjaśnieniu pozycji filogenetycznej. Każde z tych założeń powinno być ujęte w odrębnej hipotezie, a hipoteza filogenetyczna powinna stawiać jakieś założenie o relacjach badanych gatunków w innymi w rodzaju, a nie skuteczności narzędzia, ponieważ jest to odwrócenie problemu. Ponadto, w opisie publikacji czy w podsumowaniu brak jest bezpośredniego odniesienia do postawionych hipotez, a więc wskazania, które zostały zweryfikowane pozytywnie, a które negatywnie. W publikacjach składających się na dysertację Doktorantka uniknęła tych błędów poprawnie formując cele badawcze. Nadmienię tylko że formułowanie hipotez badawczych jest trudnym zadaniem, z którym nie radzą sobie nawet doświadczeni badacze i nie podważa wartości naukowej opublikowanych prac.

Lektura publikacji wchodzących w skład dysertacji nasunęła mi pewne szczegółowe pytania, na które chciałabym uzyskać odpowiedź od Doktorantki.

Publikacja 1:

(1) Jakie były motywy wybrania markerów iBPS do badań struktury genetycznej? Czy był to przemyślany wybór czy wynik dostępności tylko do tego narzędzia? Nie są to powszechnie stosowane markery (jak nadal markery SSRs i co raz powszechniejsze SNP), w większości wykorzystywane są w badanach prowadzonych nad roślinami uprawnymi czy kultywarach. Ten, moim zdaniem, wąski jednak krąg badań uniemożliwia bezpośrednie odniesienie uzyskanych wyników do innych prac o podobnej tematyce, np. genetyki konserwatorskiej małych i izolowanych naturalnych populacji innych gatunków. Każdy system markerowy charakteryzuje określony poziom polimorfizmu i rozdzielczość otrzymywanych danych. Ponadto specyfika tych markerów nie pozwala na szacowanie poziomu wsobności w populacji i odchylenia od równowagi H-W, a zatem wnioskowania o przebiegu procesów populacyjnych kształtujących poziom zmienności genetycznej.

(2) Czy podczas genotypowania nie odnotowano powtarzających się genotypów sugerujących klonalne rozmnażanie *C. alpinum* na Babiej Górze? Jest to gatunek, który posiada mieszany system reprodukcyjny, a ponadto może rozmnażać się klonalnie, co jest powszechną cechą historii życia u gatunków z obszarów wysokogórskich i borealnych?

(3) Dlaczego wykorzystała do określenie optymalnej liczby K tylko metodę deltaK Evanno i in. (2005), podczas gdy rekomendacje dla szukania K sugerują wykorzystanie różnych sposobów, ze względu na ograniczenia różnych podejść. Czy znana jest Doktorantce metoda z pracy Peuchemeille i in. 2016 zaimplementowana w internetowej wersji StructureSelector, która byłaby odpowiednia do posiadanych danych, tj. nierównych wielkości prób (populacji)?

(4) Czy wysokie zróżnicowanie między populacjami szwedzkimi, norweskimi i polskimi mogą być wynikiem nie tylko IBD, ale adaptacji do specyficznego podłoża (gleby serpentynowe)? Silny czynnik selekcyjny może kształtować również zmienność neutralną.

(5) Jakie konkretne działania ochroniarskie rekomendowałaby Doktorantka dla populacji *C. alpinum* w Polsce? W publikacji nie padają żadne konkretne propozycje, a jedynie ogólnikowe stwierdzenia o możliwości wykorzystania uzyskanych wyników do zaplanowania efektywnej strategii ochrony. Co sądzi Doktorantka o strategii wspomaganego przepływu genów?

Publikacja 2

(1) Wyniki datowania dywergencji sugerują, że rodzaj *Cerastium* oddzielił się mniej więcej pod koniec pliocenu. Biorąc pod uwagę biologię gatunków i wymagania klimatyczne tego rodzaju, co mogło być czynnikiem inicjującym dywergencję i późniejszą dywersyfikacji w rodzaju?

(2) Rozważając prawdopodobnie niedawną dywersyfikację w rodzaju, czy nie wydaje się Doktorantce, że wysokie podobieństwo genomów cpDNA analizowanych gatunków odzwierciedla ten fakt, a nie epizody hybrydyzacji możliwe dzięki słabym barierom reprodukcyjnym?

Wniosek formalny

Podsumowując, praca doktorska mgr Sylwii Eryki Milarskiej dostarcza oryginalnych i bardzo interesujących informacji na temat struktury genetycznej izolowanych stanowisk rogownicy *C. alpinum* w Polsce oraz utwierdza

wrib.up.poznan.pl/pl

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 75 21
e-mail: dziekles@up.poznan.pl

dotychczasową pozycję systematyczną badanych gatunków zweryfikowaną o dane cpDNA.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.) i w związku z tym, wnoszę do Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego **o dopuszczenie Doktorantki** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Monika Dering