

Prof. dr hab. Wiesław Prus-Głowacki
Uniwersytet im. A. Mickiewicza
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Zakład Genetyki
ul. Umultowska 89
61-614 Poznań

Ocena pracy doktorskiej Pani mgr inż. Elżbiety Chomicz wykonanej pod kierunkiem dr hab. Justyny Nowakowskiej w Instytucie Badawczym Leśnictwa – Sękocin Stary zatytułowanej
„Zmienność genetyczna odnowień naturalnych świerka (*Picea abies* (L) Karst.) w zamierających drzewostanach Beskidu Śląskiego i Żywieckiego”

Zagadnienie zachowania różnorodności genetycznej i integralności pul genowych populacji drzew leśnych ma trudne do przecenienia znaczenie dla utrzymania maksymalnej zdolności adaptacyjnej tych organizmów do określonych warunków siedliskowych i co za tym idzie produkcji biomasy o pożądanym cechach. Priorytetem w hodowli lasu jest więc utrzymanie wysokiej zmienności genetycznej z pokolenia na pokolenie drzewostanów charakteryzujących się wysokimi walorami hodowlanymi i użytkowymi. Doktorantka w swojej dysertacji postawiła sobie zadanie zbadania czy w procesach naturalnych odnowień zachowuje się podobieństwo struktury genetycznej populacji potomnej do populacji rodzicielskiej jak się zakłada zaadoptowanej do określonego środowiska. W celu falsyfikacji założeń badawczych postawiła sobie następujące hipotezy 1. czy zmienność genetyczna szeroko pojmowana, populacji potomnych zbliżona jest do wzorca genetycznego populacji rodzicielskich 2. czy struktura genetyczna odnowienia w drzewostanie „naturalnym” posiada cechy charakterystyczne dla siebie. Mimo, że literatura przedmiotu przynosi dane z podobnego typu badań to szereg zagadnień pozostaje w ciągu dalszym niejasne i dyskusyjne. Istotne zatem jest wyjaśnienie które z procesów genetycznych związanych z demografią populacji grają zasadniczą rolę w kształtowaniu finalnego obrazu puli genowej populacji rodzicielskich i potomnych. Wchodzą tu między innymi w rolę jak się zakłada następujące czynniki: system kojarzenia, procesy selekcji wywołanej czynnikami biotycznymi i abiotycznymi, liczebność populacji, dryf genetyczny, a także procesy losowe i procesy związane z gospodarką leśną prowadzące do fragmentacji populacji a także inne czynniki. Jeżeli założy się, że głównym czynnikiem są procesy selekcyjne – dobór naturalny, działające na pulę genową odnawiającej się populacji ukształtowanej w wyniku kojarzeń w ramach populacji macierzystej, przyjąć musimy, że działa on na różne etapy rozwoju populacji począwszy od procesów reprodukcji (selekcja gametyczna) poprzez produkcję nasion, same nasiona (selekcja zygotyczna) i dalej

na siewki, młode osobniki i osobniki dojrzałe. Jak widać z powyższego tylko sam dobór i jego potencjalny wpływ na strukturę genetyczną populacji jest procesem złożonym i wielokierunkowym determinowanym złożonymi czynnikami działającymi na populację. W tym kontekście uważam, że wybór tematyki dysertacji doktorskiej za ambitny, trafny i ważny z punktu widzenia i zrozumienia podstawowych zagadnień genetyki demograficznej, a także bardzo istotny dla hodowli lasu.

Formalna ocena dysertacji

Oceniając pracę pod względem formalnym stwierdzam, że nie odbiega ona od tego typu opracowań. Dysertacja liczy 111 stron, podzielona jest na sześć rozdziałów. Pracę kończy krótkie streszczenie po polsku i po angielsku. Dwu stronicowy **Wstęp** precyzuje zamiary badawcze Doktorantki i ogólnie naświetla idee podjętej pracy pod kątem jej odniesień do leśnictwa i zachowania różnorodności genetycznej drzewostanów w powiązaniu z ich zamieraniem w Beskidzie Śląskim i Żywieckim. Obszerny **Przegląd literatury** zamieszczony na 22 stronach zawiera opis czynników kształtujących zmienność genetyczną w populacjach drzew leśnych takich jak system kojarzenia, dobór naturalny, dryf genetyczny i przepływ genów. Wymienione czynniki wraz z mutacjami i rekombinacjami są odpowiedzialne za poziom i charakter zmienności. W dalszym ciągu przeglądu literatury Autorka cytuje prace odnoszące się do wpływu migracji polodowcowych na skład genetyczny współczesnych populacji flory w kontekście ostoi lodowcowych, dróg migracji, wyspowego występowania gatunków, gatunków o zasięgu zwartym i populacji ze skraju zasięgu. Porusza także znaczenie wpływu człowieka na pule genowe populacji drzew poprzez deforestację, nadmierną eksploatację drzewostanów, degradację siedlisk jak również zabiegi hodowlane związane z selekcją kierunkową zmierzającą do uzyskania użytecznych dla człowieka form, nie zawsze najlepiej zaadaptowanych do zajmowanych siedlisk.

Następny podrozdział przeglądu literatury poświęcony jest opisowi zmienności genetycznej świerka i opis ten obejmuje aktualny zasięg gatunku, wpływ zlodowaceń i migracji polodowcowych na wykształcenie jego zmienności geograficznej oraz ukształtowanie zmienności między i wewnątrz populacyjnej. Ostatni fragment tego podrozdziału dotyczy rozważań na temat markerów molekularnych – izozymowych i markerów DNA chloroplastowego, mitochondrialnego i jądrowego używanych w badaniach struktury genetycznej populacji świerka, wskazując na ich zalety i wady. W ostatnim podrozdziale

przeglądu literatury Doktorantka opisuje zjawisko zamierania drzewostanów świerkowych w Beskidzie Śląskim i Beskidzie Żywieckim omawiając prawdopodobne czynniki abiotyczne i biotyczne wywołujące to niepokojące zjawisko, mogące mieć wpływ na zubożenie lokalnych pul genowych i obniżenie zdolności adaptacyjnych drzewostanów. W tym kontekście badania, czy naturalne odnowienia wykazują obniżenie zmienności genetycznej w porównaniu z populacjami macierzystymi zaadaptowanymi do lokalnych warunków i czy odbiegają względnie nie odbiegają od nich strukturą genetyczną ma kapitalne znaczenie dla potencjalnej ochrony już istniejących odnowień i mogą dać wskazania dla działań związanych z hodowlą lasu na tych terenach.

Cel pracy przedstawiony został jasno, w kilku zdaniach, z wyodrębnieniem hipotez badawczych. Rozdział **Materiał i metody** podzielono na cztery podrozdziały. W pierwszym opisano wybrane do badań cztery drzewostany z podaniem dokładnej ich lokalizacji, zajmowanej powierzchni i wysokości nad poziom morza, charakteru zwarcia, przybliżonego wieku drzew, przeciętnej ich wysokości i pierśnicy a także stanu odnowienia. Trzy z nich pochodziły z Beskidu Śląskiego i Żywieckiego a jedna z Rezerwatu „Wyżnia Mała Łąka, Wantule” z Tatr która to populacja jest borem świerkowym o charakterze pierwotnym. Materiał do badań pobierano losowo z drzew bez objawów chorobowych z osobników oddalonych o 30-40 metrów. Pędy z osobników populacji potomnych pobierano w analogiczny sposób. Materiał roślinny pozyskano z 50 osobników obejmujących każdą populację drzew macierzystych (razem 200 osobników) i po 50 osobników z odnowień (200 prób), razem 400 drzew. Tutaj zabrakło mi informacji o wieku populacji potomnych. Czy osobniki były w jednym wieku? Sprawa jest o tyle istotna bo rzutować może na interpretację danych. Przy osobnikach różnowiekowych, odnowienie następowało etapami i na strukturę genetyczną tych subpopulacji nakładać się będzie struktura poszczególnych zasiedleń, a to zapewne wpływać będzie na bogactwo genetyczne wykrywane u potomstwa.

Metody biochemiczne opisane są skrótowo w trzech podrozdziałach i obejmują opis izolacji DNA, amplifikację mikrosatelitarnego DNA oraz analizę jego polimorfizmu. Analizowano zmienność trzech loci SpAG2, SpACiH8, SpAGDI.

Analizy statystyczne prowadzono stosując powszechnie stosowane programy dla uzyskania szeregu parametrów genetyczno-populacyjnych takich jak frekwencja poszczególnych wariantów mikrosatelitarnego DNA – alleli (N_a i N_e), indeks Shannona (I) jako miarę różnorodności genetycznej, heterozygotyczność obserwowaną (H_o) i oczekiwaną (H_e), miarę różnorodności genetycznej (h), oraz współczynnik zróżnicowania między populacyjnego (F_{ST}), współczynnik wsobności (F_{IS}) oraz współczynnik przepływu genów między

populacjami rodzicielskimi i potomnymi (N_m) jak również badano ich podobieństwa genetyczne (D_N).

Wyniki przedstawiono na 24 stronach stosując ten sam schemat ich zaprezentowania dla badanych populacji, każdej z osobna, kontrastując grupę osobników rodzicielskich z grupą osobników potomnych z naturalnego odnowienia. Określano frekwencję alleli w poszczególnych loci oraz średnią ich liczbę na locus, indeks różnorodności genetycznej Shannona, współczynniki heterozygotyczności, podobieństwa genetyczne i współczynnik wsobności, współczynnik przepływu genów. Wyniki zestawiono w formie tabel i histogramów. Jednak dla przejrzystości uzyskanych wyników i możliwości równoczesnego porównania danych dla wszystkich ośmiu badanych obiektów brakuje mi przedstawienia parametrów genetycznych w jednej tabeli, a to znakomicie ułatwiło by percepcję i interpretację wyników nie tylko dla poszczególnych populacji. Także dendrogramy obrazujące podobieństwa genetyczne badanych populacji byłyby tu pomocne.

Rozdział **Podsumowanie wyników i dyskusja** jest wielowątkowym i obszernym na 21 stronach opracowaniem, odnoszącym się do uzyskanych w dysertacji danych. Wyniki wskazują na trendy wyrównywania struktury genetycznej populacji rodzicielskich z populacjami potomnymi z zachowaniem pewnej ich specyficzności. Zmienność genetyczna i heterozygotyczność porównywanych grup osobników jest zbliżona, chociaż zaobserwować można bardziej częste występowanie alleli prywatnych - unikatowych w populacjach potomnych. W każdej grupie drzew stwierdzono nieznaczny niedobór heterozygotyczności. Ze względu na to, że dyskusja jest obszerna i porusza wiele zagadnień czasem ogólnych i bardzo luźno powiązanych z tematem pracy występują tu niekiedy powtórzenia treści.

Wnioski przedstawione zostały w formie pięciu punktów. Bardzo obszerna cytowana literatura zawiera 270 pozycji w większości z ostatnich lat. Pracę kończą streszczenia w języku polskim i angielskim. Sformułowane wnioski nawiązują do postawionych hipotez i wynikają z uzyskanych danych.

Jeżeli chodzi o stronę edytorską praca napisana jest ładnym językiem, a jej strona ilustracyjna (tabele i wykresy) jest bez zarzutu. Generalnie pracę oceniam pozytywnie.

Z obowiązku recenzenta jednak do niektórych tez poruszonych w dyskusji chciałbym się odnieść bardziej szczegółowo. Kwestia dotyczy dyskusyjnego poglądu na „neutralność” loci mikrosatelitarnych których zmienność nie ma charakteru zmienności adaptacyjnej. Jeżeli przyjmiemy taką hipotezę, to za strukturę genetyczną populacji potomnych odpowiadałby w głównej mierze losowe kojarzenie i dryf genetyczny oraz czynniki stochastyczne nie mające podłoża genetycznego, a jak wiemy dryf genetyczny stosunkowo słabo wpływa na

ukształtowanie puli genowej w krótkim czasie (odnowienia) i działa w specyficznych warunkach. Być może należałoby założyć, że zasadniczym czynnikiem kształtującym pulę genową populacji potomnych jest selekcja stabilizująca działająca na kiełkujące nasiona i siewki w kierunku najlepszej adaptacji genotypów (fenotypów) potomnych do warunków siedliskowych. Wskazywały by na to podobieństwa populacji potomnych do macierzystych, jak zakładamy najlepiej dostosowanych do określonego siedliska. Bogactwo puli genowej potomstwa powodowane zapłodnieniami krzyżowymi byłoby zredukowane (głównie homozygoty) przez dobór. Włączenie do badań dodatkowej klasy wieku (zarodki, siewki) być może rozjaśniło poprzez analizę trendów kierunków zmian w częstości alleli i zmiany poziomu heterozygotyczności. Sprawa jest dyskusyjna i prosiłbym Doktorantkę o wyrażenie swojej opinii na ten temat zwłaszcza, że Autorka nie wskazuje jednoznacznie na mechanizmy mogące kształtować pule genowe badanych populacji.

Następnym zagadnieniem które chciałbym poruszyć to wymagana liczba loci mikrosatelitarnych użytych do badań, pozwalająca oddać rzeczywisty obraz zróżnicowania genetycznego populacji. Autorka jest zdania, że nawet niewielka ich liczba jest zdolna do uzyskania „właściwej informacji genetycznej”. Myślę, że jest to duże uproszczenie. Prosiłbym Doktorantkę o rozwinięcie tej myśli i wyrażenie swojej opinii w tej kwestii.

Pod względem merytorycznym pracę oceniam wysoko. Autorka stosując metody biologii molekularnej zbadała zmienność genetyczną pod kątem demografii populacji świerka porównując skład genetyczny populacji macierzystych i potomnych. Wykazała, że bogactwo genetyczne populacji potomnych pochodzących z naturalnego odnowienia wyrażone liczbą alleli i ich zróżnicowania, zróżnicowania genotypowego, poziomem heterozygotyczności, jest porównywalne do tych danych w populacjach macierzystych. Odkrycie to może mieć duże znaczenie dla ochrony pul genowych *in situ* oraz dla hodowców lasu, zwłaszcza w kontekście zamierania drzewostanów. Co więcej populacje potomne w dużym stopniu nawiązują pod względem podobieństw genetycznych do populacji macierzystych co stwarza nadzieję, na zachowanie „regionalnej” puli genowej – składu genetycznego w stanie pozwalającym na optymalną adaptację drzewostanu do określonych warunków siedliskowych.

Mam niewiele uwag merytorycznych i edytorskich jednak przy lekturze pracy natknąłem się na kilka niejasności i lapsusów - dla przykładu:

- str 10 dół niejasne jest zdanie „z ewolucyjnego punktu widzenia drzewa posiadają kilka intrygujących i wyraźnie paradoksalnych cech. W szczególności charakteryzują się zwykle wysokim poziomem zmienności genetycznej, ale niskim tempem substytucji nukleotydowych i niskim tempem specjacji; ponadto łączą wysokie lokalne zróżnicowanie w zakresie cech adaptacyjnych z szerokim przepływem genów i generalnie utrzymują integralność gatunku wobec obfitego przepływu genów pomiędzy gatunkami”

- str 24 razi wyrażenie „okres czasu”
- str 34 proszę o wyjaśnienie co oznacza wyrażenie „wiek uprawy” dla populacji potomnej
- przy opisach histogramów użyto niezgrabnego wyrażenia „frekwencja występowania”
- str 70 niejasne jest dla mnie zdanie „Pojęcie heterozygotyczności odnosi się do zmienności neutralnej , jednakże często obserwuje się pozytywną korelację między poziomem zmienności populacji a jej dostosowaniem.....”

Przytoczone, wybrane z tekstu pracy uwagi nie obniżają jednak wartości dysertacji.

Wniosek końcowy

Jak już zaznaczyłem dysertację Pani mgr inż. Elżbiety Chomicz oceniam pozytywnie. Autorka wykazała się czytaniem i szeroką wiedzą w reprezentowanej dziedzinie czego wyrazem są treści zawarte w rozdziałach „Przegląd literatury”, a szczególnie interesująca dyskusja zawierająca Jej podejście do różnych zagadnień genetyczno populacyjnych powiązanych z populacjami drzew leśnych i Jej własne przemyślenia. Zastosowała w badaniach nowoczesne metody molekularne. Praca rzuca dodatkowe światło na naszą wiedzę dotyczącą dynamiki przemian genetycznych związanych z demografią populacji drzew Prócz danych wartościowych dla wiedzy ogólnobiologicznej, wyniki jej pracy wykorzystane być mogą w hodowli lasu i praktyce ochroniarskiej Cenną zaletą Doktorantki jest umiejętność krytycznego spojrzenia na uzyskane dane i wyniki. Doktorantka jest dojrzałym badaczem.

W świetle powyższego uważam, że praca doktorska Pani Elżbiety Chomicz odpowiada wymaganiom stawianym dysertacjom doktorskim i stawiam wniosek do Wysokiej Rady

Naukowej Instytutu Badawczego Leśnictwa o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego



Prof. dr hab. Wiesław Prus-Głowacki

Poznań, 6.II. 2013