Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Kai Roli

Rewizja krytycznych taksonów flory Polski:
Allium ursinum L., Anthyllis vulneraria L. i Senecion nemorensis agg.

wykonanej pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Zbigniewa Szeląga w Zakładzie Taksonomii Roślin, Fitogeografii i Herbarium Instytutu Botaniki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Recenzję wykonano w związku z uchwałą Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego – pismo Dyrektora Wydziału, dr hab. Małgorzaty Kruczack, z dnia 27.06.2014 r.

Podstawa prawna i przedmiot recenzji
Ocenę rozprawy przeprowadziłam na podstawie przekazanej dokumentacji, na którą składa się praca w formie maszynopisu (autoreferat) wraz z kopiami czterech oryginalnych publikacji (2 opublikowane, 1 przyjęta do druku i 1 w recenzji). Pani mgr Kaja Rola jest jedynym autorem trzech publikacji, natomiast jedna z prac została przygotowana w zespole autorów, z Panią mgr Rolą jako pierwszym autorem. Jednocześnie mgr Rola deklaruje, że pomoc współautorów ograniczała się do wykonania analizy molekularnej.

Ocena rozprawy

Tematyka i cele rozprawy
Obserwowana zmienność morfologiczna blisko spokrewnionych taksonów roślin stwarza w wielu przypadkach problemy związane z ich identyfikacją, będąc jednocześnie inspiracją do podejmowania badań w tym zakresie. Różne jest ponadto podejście badaczy dyskutujących najbardziej użyteczne cechy diagnostyczne oraz poziomę systematyczną analizowanych taksonów.
Praca Pani mgr Kai Rolí, mieszkająca się w nurcie zainteresowań taksonomii roślin, jest odpowiedzią na pytania pozostawione dotąd bez odpowiedzi. Wnikiwy przegląd literatury naukowej z zakresu morfologii, taksonomii, zmienności genetycznej taksonów krytycznych i kompleksów gatunków pozwolił Doktorantce na zidentyfikowanie luk w dotychczasowej wiedzy i sformułowanie celu własnych badań.

Na przedmiot swoich badań Doktorantka wybrała Anthyllis vulneraria L., Senecio nemorensis agg. oraz Allium ursinum L. – taksony zaliczane do krytycznych składników flory Polski, a głównym celem badań uczyniła scharakteryzowanie zróżnicowania morfologicznego i rozmieszczenia w Polsce wybranych kompleksów gatunków oraz zróżnicowania genetycznego wewnątrz i między populacjami Allium ursinum.

Jasno sformułowane cele szczegółowe wynikały z analizy stanu wiedzy w zakresie morfologii, taksonomii i fitogeografii taksonów wytypowanych do badań i obejmowały: (i) określenie zmienności morfologicznej badanych kompleksów gatunków; (ii) ocenę taksonomicznej użyteczności cech morfologicznych/mikromorfologicznych do identyfikacji taksonów w obrębie badanych kompleksów gatunków; (iii) charakterystykę form morfologicznie pośrednich i dyskusję ich statusu; (iv) zilustrowanie rozmieszczenia poszczególnych taksonów w Polsce na tle krajów sąsiednich oraz ustalenie granic ich zasięgów geograficznych i wysokościowych; (v) analizę wymagań siedliskowych poszczególnych taksonów; (vi) opracowanie klucza do oznaczania oraz opisów morfologicznych poszczególnych taksonów.

**Struktura i formalna strona rozprawy**

Na rozprawę doktorską Pani mgr Rolí składa się praca w formie maszynopisu (autoreferat uwzględniający zarówno wyniki już opublikowane jak i nowe, dotąd nie opublikowane) oraz cztery artykuły naukowe stanowiące integralną część dokumentacji. Całość uzupełniona CV zamieszczone w części końcowej przesłanej dokumentacji.

Autoreferat obejmuje część tekstową, zamieszczoną na 46 stronach wydruku komputerowego (str. 6-52 przekazanej dokumentacji), w tym 7 rycin i 1 tabelę. Ta część pracy podzielona jest na sześć zasadniczych rozdziałów: (1) Wstęp i cel pracy; (2) Materiał i metody; (3) Wyniki; (4) Dyskusja; (5) Wnioski; (6) Literatura. Cytowana literatura zawiera kilkaset pozycji w kilku językach: angielskim, niemieckim, polskim i innych oraz źródła internetowe. Dodatkowe, obszerne piśmiennictwo zawierają poszczególne publikacje tematyczne. Dobór literatury, obejmujący zarówno pozycje kluczowe jak i najnowsze z zakresu podejmowanej problematyki badawczej, jest wyczerpujący, a poszczególne pozycje właściwie wykorzystane i przywołane w tekście. Uzyskane wyniki badań są starannie udokumentowane i zilustrowane w tabelach, na
wykresach i rycinach; zwraca uwagę ich wysoki poziom edytorski i estetyczny. Pod względem językowym i redakcyjnym praca nie budzi zastrzeżeń. Maszynopis został przygotowany bardzo starannie, nieomal beznadziejnie (!)

Brakuje jedynie wymaganego w artykule 13, ust. 6 Ustawy streszczenia angielskiego; zakładam jednak, że Doktorantka przedłożyła ją Komisji w celu upublicznienia.

**Zakres badań i zastosowane metody**

Moje duże uznanie wzbudził rozgłosy zakres badań zarówno w relacji do przedmiotu badań (trzy kompleksy gatunków) jak i użytych metod (o których niżej). W przypadku poszczególnych taksonów wybranych do badań, ich zakres został dostosowany do dotychczasowego stanu wiedzy i aktualnie stosowanej klasyfikacji.

I tak w przypadku:


- **Senecio nemorensis** agg., spośród 9 taksonów rozpowszechnionych w Europie i w części Azji, wybrano 4 gatunki występujące w Polsce: *S. germanicus* Wallr., *S. hircynicus* Herborg, *S. ovatus* (G. Gaertn. et al.) Willd oraz *S. ucrainicus* Hodálová;


Poszczególne części pracy zrealizowano przy użyciu właściwie dobranych metod stosowanych w pracach terenowych i laboratoryjnych oraz analitycznych, dostosowanych każdorazowo do specyfiki przedmiotu badań. Obejmowały one standardowe analizy morfologiczne, a w przypadku *Allium ursinum* także analizy molekularne.

Jedynie dla *Allium ursinum* zebrano w terenie własny materiał do analiz morfologicznych i molekularnych, analizy dla pozostałych trzech kompleksów gatunków wykonano korzystając z materiałów zielnikowych, pochodzących z krajowych herbariów (w większości z zielników krakowskich: KRAM, KRA).

Jakościowe i ilościowe cechy morfologiczne organów wegetatywnych i generatywnych roślin, wybrano na podstawie krytycznej kwerendy literatury (klucze do oznaczania i diagnozy gatunków) oraz własnych obserwacji (nowe cechy). Uwzględniono ponadto cechy mikromorfologiczne: ziaren pyłku, powierzchni szypułek kwiatowych, ultraskulpturę powierzchni nasion *Allium ursinum* oraz charakter owłosienia dodatkowych podsadek koszyczka u badanych przedstawicieli *Senecio*
nenoresis agg., wykorzystując odpowiednią aparaturę (skaningowy mikroskop elektronowy (SEM), mikroskop Motic B3 oraz mikroskop stereoskopowy).

Analizę molekularną przeprowadzono dla 144 osobników *Allium ursinum* (fragmenty liści zebrane w terenie z 9 populacji zlokalizowanych wzdłuż transektu wschód-zachód, w którego przebiegu występują dwa analizowane podgatunki i ich przypuszczalny mieszaniec) z użyciem całkowitego genomowego DNA i przy zastosowaniu trzech markerów ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeats*).

Pragnę zwrócić uwagę na właściwie dobrane i zastosowane metody i techniki statystyki biologicznej, na którą złożyły się liczne analizy danych uzyskanych w badaniach morfometrycznych (m.in. statystyki opisowe, analiza współczynników korelacji liniowej Pearsona lub korelacja rang Spearmana, analiza skupień, jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA), test Kruskala-Wallisa, analiza składowych głównych (PCA), analiza współrzędnych głównych (PCoA), analiza korespondencji na cechach jakościowych, analiza dyskryminacyjna (DA) oraz molekularnych (zmienność genetyczna w każdej populacji: liczba i częstość prążków; struktura genetyczna populacji na podstawie częstości aleli p i q w locus, proporcji loci polimorficznych (P), wskaźnika różnorodności Shanonna (I) i heterozygotyczności oczekiwanej (H0); podobieństwo genetyczne pomiędzy parami populacji na podstawie wskaźnika dystansu genetycznego Nei’a oraz PhiPT wraz z analizą skupień metodą Warda; stopień zmienności genetycznej wewnętrz- i międzypopulacyjnej oszacowany przy pomocy analizy wariancji molekularnej (AMOVA); test Mantela; analiza współrzędnych głównych (PCoA) użyta w celu zbadania ogólnej struktury genetycznej badanych populacji i relacji pomiędzy osobnikami/populacjami/taksonami w oparciu o dystanse genetyczne Nei’a; dla zobrazowania zróżnicowania genetycznego poszczególnych osobników analiza NeighbourNet w oparciu o macierz odległości genetycznych Nei i Li; analiza struktury genetycznej w oparciu o Bayesowską metodę grupowania STRUCTURE). Wymieniam celowo zastosowane metody statystyczne, aby podkreślić zarówno zaawansowaną wiedzę Doktorantki w tym zakresie, jak i jej umiejętność właściwej interpretacji uzyskanych wyników.

**Uzyskane wyniki i główne walory rozprawy doktorskiej**

Większość uzyskanych wyników Pani mgr Kaja Rola zamieściła w ‘tematycznych’ publikacjach, dedykowanych poszczególnym analizowanym taksonom. Dwie prace: (1) „A morphometric study on *Anthyllis vulneraria* (Fabaceae) from Poland and its taxonomic implications” oraz (2) „Taxonomy and distribution of *Allium ursinum* (Liliaceae) in Poland and adjacent countries” zostały opublikowane w 2012 roku w czasopiśmie *Biology* (15 pkt., wg. listy MNiSW, IF = 0.696), pracę pt. „Morphometry and distribution of *Seneio nemoresis* agg. species (Asteraceae) in Poland”

W wyniku badań wchodzących w skład pracy poświęconej kompleksowi gatunków *Anthillis vulneraria* występujących w Polsce, na podstawie wyselekcjonowanego materiału roślinnego (828 okazów zielnikowych) i wytypowanych do analizy 22 cech diagnostycznych mgr Kaja Roła potwierdziła statystycznie odrębność badanych pięciu podgatunków oraz obecność morfotypów o cechach pośrednich. Opierając się na wynikach przetestowanych w analizach statystycznych zidentyfikowała i/lub potwierdziła w relacji do wyników uzyskanych w badaniach innych autorów, najbardziej przydatne cechy diagnostyczne w identyfikacji taksonów *Anthillis vulneraria* opisanych w randze podgatunków i wskazała te o niskiej wartości. Dodatkowo cechy takie jak: długość podsadek i kolor kielicha oceniła jako przydatne w identyfikacji taksonów występujących w Polsce. W opinii Autorki w identyfikacji omawianych taksonów może być istotny także typ zajmowanego siedliska.

Analiza morfometryczna kompleksu *Senecio nemorensis* agg. przeprowadzona na podstawie 316 okazów zielnikowych potwierdziła występowanie w Polsce czterech wymienionych wyżej gatunków. W przypadku tych taksonów spośród siedemnastu uwzględnionych cech morfologicznych najistotniejszym okazały się być: szerokość podstawy liści, długość kwiatów językowatych, długość dodatkowych podsadek oraz stosunek długości dodatkowych podsadek do długości podstawowych podsadek. Doktorantka za dodatkową ważną cechę diagnostyczną uznała także typ owłosienia dodatkowych podsadek. Na podstawie analizowanych materiałów zielnikowych i własnych notowań w terenie przedstawiła rozmieszczenie badanych gatunków w Polsce i szerzej w Europie Środkowej.

Zróżnicowanie morfologiczne i rozmieszczenie w Polsce *Allium ursinum* jest przedmiotem kolejnego etapu badań, których wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie *Biologia*. Badania nad tym taksonem, przeprowadzone z wykorzystaniem materiałów zielnikowych (367 okazów) i materiału własnego zebranego podczas badań terenowych, pozwoliły na potwierdzenie występowania w naszym kraju dwóch podgatunków, zilustrowanie ich rozmieszczenia oraz udokumentowanie obecności populacji z udziałem osobników o cechach pośrednich. Autorka poddała analizie przydatność wybranych cech morfologicznych oraz przede wszystkim cech mikromorfologicznych: morfologię epidermy szypułek kwiatowych (obecność brodawek), ultraskulpturę ziaren pyłku i powierzchni nasion.

W autoreferacie odnajdujemy uzupełnienia wyników zamieszczonych w artykułach m.in. dotyczące rozmieszczenia badanych taksonów (np. mapa rozmieszczenia *Allium ursinum* w Europie, która ilustruje poza rozmieszczeniem podgatunków, przebieg strefy w której występują populacje z osobnikami o cechach pośrednich).

Doktorantka dyskutuje uzyskane wyniki zarówno w dedykowanych rozdziałach przedstawionych publikacji jak i w autoreferacie w wyodrębnionych „rozdziałach tematycznych”, odnoszących się do zagadnień postglacialnej migracji gatunków, pozycji taksonomicznej form mieszańcowych i stref mieszańcowych. Moją szczególną uwagę zwróciło interesująco poprowadzone przez Doktorantkę wnioskowanie – przeprowadzone na podstawie wzorców genetycznych *Allium ursinum* oraz rozmieszczenia geograficznego gatunków z *Senecio nemorensis* agg., w relacji do wyników innych autorów – wiązące historię powstania zasięgów tych taksonów na obszarze Polski z migracją *Fagus sylvatica* po ostatnim zlodowaceniu. Dyskusja jest napisana w sposób przekonujący i skupiający uwagę, a dojrzała interpretacja wyników i poprawne formułowanie wniosków świadczą o doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego.

Podsumowując mam podstawy twierdzić, że recenzowana rozprawa wnosi istotny wkład do wiedzy w zakresie wykorzystania analiz morfometrycznych w taksonomii roślin. Zidentyfikowane przez Doktorantkę zestawy cech morfologicznych mogą stanowić podstawę do rozróżniania taksonów w obrębie badanych kompleksów. Cennym wnikiem jest uzupełnienie/weryfikacja istniejącego podziału taksonomicznego oraz opracowanie kluczy do wyróżniań występujących w Polsce gatunków w obrębie *Senecio nemorensis* agg. oraz podgatunków *Anthyallis vulneraria*. Istotnym wynikiem pracy jest również potwierdzenie istnienia morfotypów o cechach pośrednich i prawdopodobnym mieszańcowym pochodzeniu (w obrębie kompleksu *Anthyallis vulneraria* i w strefie stykania się zasięgów podgatunków *Allium ursinum*). Praca zawiera rzetelnie zebrane dane, zatem z powodzeniem będzie mogła służyć w przyszłości jako podstawa do badań porównawczych. Na zwrócenie uwagi raz jeszcze zasługuje przemyślany i zwięzły sposób konstruowania wywodu, swobodne posługiwanie się terminologią naukową oraz umiejętnie
korzystanie z obszernej literatury, głównie obcojęzycznej, świadczące o bardzo dobrej orientacji w podejmowanej problematyce badawczej.

Trudno było doszukać się w pracy Pani mgr Kai Roli uchybień czy usterek. Większość wyników została już opublikowana zatem poddana ocenie recenzentów specjalistów. Moje uwagi mogą mieć zatem jedynie charakter dyskusyjny, a odnoszą się do braku jasno sprecyzowanych hipotez badawczych, które 'ukryte są' w tekście.

**Konkluzja**

Rozprawa doktorska Pani mgr Kai Roli, przedstawiona w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów w języku angielskim (dwóch opublikowanych, jednego w druku i jednego przekazanego do recenzji) wraz z częścią tekstową (autoreferatem) w języku polskim, spełnia warunki określone w artykule 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; Dz.U. z 2005 r., nr 164, poz. 1365; Dz.U. z 2011 r., nr 84, poz. 455), zatem wnosi o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk biologicznych i dyscyplinie biologii.

W mojej opinii, przedłożona do oceny rozprawa zasługuje na wyróżnienie, o co wnioskuje do Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Katowice, dn. 26 sierpnia 2014 r.

Barbara Tokarska-Guzik