

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata:

Beniamin Wacławik

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Weryfikacja taksonomiczna gatunków ryjkowców w obrębie podrodzaju *Liophloeodes* (Weise, 1894)

Promotor:

dr hab. Dorota Lachowska-Cierlik

Promotor pomocniczy/drugi promotor/kopromotor (jeżeli powołany): -

Recenzent:

dr hab. Łukasz Kajtoch

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest kompleksowym opracowaniem taksonomii i filogenezy grupy ryjkowców klasyfikowanych w podrodzaj *Liophloeodes*. Podrodzaj ten wyróżniono z rodzaju *Liophloeus* (Weise 1894) i przypisywano do niego łącznie do dziewięciu taksonów. Aktualnie do tego podrodzaju klasyfikowanych jest tylko pięć gatunków, a pozostałe taksony okazały się synonimami lub podgatunkami. Klasyfikacja ryjkowców *Liophloeodes* nie jest prosta z uwagi na bardzo zbliżoną morfologię i oznaczanie możliwe wyłącznie na podstawie struktury narządów kopulacyjnych samców. Doktorant w swoich badaniach podjął się uporządkowania taksonomii tego podrodzaju oraz określenia relacji filogenetycznych między gatunkami. Wywiązał się z tego zadania w sposób nowoczesny – wykorzystując zarówno metody stosowane w klasycznej systematyce (morfometrię) jak i analizy molekularne (sekwencjonowanie wybranych markerów genetycznych). Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant pozyskał okazy do badań zbierając je w większości samodzielnie w trudnym i rozległym terenie. Badania Doktoranta potwierdziły słuszność wyróżniania pięciu gatunków, ale jednocześnie wykazały, że część z tych gatunków hybrydyzuje w niektórych obszarach współwystępowania co doprowadziło do introgresji DNA mitochondrialnego i braku zgodności filogenezy opartych na mtDNA i DNA jądrowym oraz morfometrii. Rozprawa ta stanowi spójne dzieło naukowe rozwiązujące postawiony problem badawczy i jako taka powinna pozwolić na przygotowanie publikacji naukowych.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów (25-200 słów):

Rozprawa doktorska obejmuje kilku wątków badawczych skupionych wokół problematyki odrębności taksonomicznej i relacji filogenetycznych między taksonami klasyfikowanymi w podrodzaju *Liophloeodes*. Dotychczasowa klasyfikacja taksonomiczna tych ryjkowców oparta była na morfologii okazów, a generalnie sprowadzała się jedynie do identyfikacji gatunkowej samców ponieważ brak było zidentyfikowanych cech morfologicznych umożliwiających poprawne przypisanie samic do taksonu.

Doktorant znacząco poszerzył wiedzę naukową w zakresie taksonomii i filogenezy tego podrodzaju wykonując szczegółowe analizy morfometryczne na dużej liczbie okazów oraz sekwencjonując trzy markery genetyczne na podstawie których opracował filogenezę podrodzaju. Rozdziały dotyczące zarówno części morfometrycznej jak i molekularnej są wartościowymi opracowaniami naukowymi. Dodatkowym efektem tych analiz okazało się wykrycie rozbieżności między relacjami mitochondrialnego DNA a zależnościami opartymi na DNA jądrowym i morfometrii. Rozbieżność ta została prawdopodobnie słusznie zinterpretowana przez Doktoranta jako rezultat hybrydyzacji i introgresji DNA między gatunkami, przede wszystkim *L. lentus* i *L. gibbus*.

Rozprawa zawiera także wątek wpływu endosymbiotycznych bakterii na specjację ryjkowców z rodzaju *Liophloeodes*, ale problematyka ta jest zbyt ogólnikowo potraktowana i nie prowadzi do jednoznacznych wniosków, natomiast po uzupełnieniu badań powinna stanowić ciekawy temat pozwalający na odrębne opracowanie.

2. **Wartość merytoryczna rozprawy**

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością ogólnych pojęć stosowanych w taksonomii, systematyce i filogenetyce, przez co odbiór treści rozprawy nie nastręcza trudności. Wprowadzenie do tematyki badawczej jest jednak zbyt obszerne – szczególnie podrozdział „1.2 Miejsce taksonomii w biologii” nie był konieczny do prezentacji w rozprawie doktorskiej. Lepiej gdyby rozprawa wychodziła od konkretnego problemu badawczego, a następnie w zwięzłym podrozdziale nawiązywała do stanu wiedzy i metod badawczych jako narzędzi służących rozwiązaniu tego problemu. Cel badań i hipotezy zaprezentowane przez Doktoranta były przemyślane i dobrze przygotowane, a więc możliwe do weryfikacji w oparciu o wykonane badania (co zostało uczynione). Także zastosowane metody badawcze i narzędzia analityczne zostały dobrane w odpowiedni sposób. Opis otrzymanych wyników prezentowanych w rozprawie jest klarowny, spójny i zaprezentowany w sposób logiczny. Doktorant w bardzo przekonujący sposób dokonał omówienia wyników badań konsekwentnie prowadząc do

weryfikacji przedstawionych hipotez, każdorazowo odnosząc się w przekonujący sposób do literatury (zarówno prac dotyczących bezpośrednio *Liophloeodes*, jak i analogicznych badań na innych organizmach co dowodzi b. dobrej znajomości literatury, w tym współczesnej). Pewnym wyjątkiem jest ponownie wątek dotyczący bakterii endosymbiotycznych, który wymaga kontynuacji i rozbudowania badań. Także wykryte bliskie pokrewieństwo *Liophloeodes* z *Liophloeus tesulatus* daje podstawę do kontynuacji badań nad relacjami tych dwóch podrodzajów.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Rozprawa mgr Wacławika ma spójną, klarowną i logiczną formę, zawierając przy tym wszystkie podstawowe elementy opracowania naukowego. Poza nielicznymi błędami stylistycznymi, rozprawa ta napisana jest poprawnym językiem.

Doktorant prezentuje swoje badania na 104 stronach podzielonych na 7 rozdziałów (wliczając załączniki i literaturę). Wyniki w rozprawie prezentowane są w 25 tabelach i 37 rycinach. Generalnie szata graficzna rozprawy jest poprawna. Na uznanie zasługują wysokiej jakości zdjęcia obrazujące szczegóły morfologii badanych gatunków z oznaczeniami sposobu wykonania pomiarów morfometrycznych. Natomiast niektóre inne ryciny mogłyby zostać przygotowane staranniejsze (m.in. mapa rozmieszczenia gatunków jest mało czytelna, a ryciny obrazujące PCA mogłyby być zaprezentowane bez zbędnego tła i dodatkowo połączone w planszę). Drzewa filogenetyczne są przygotowane zgodnie z zasadami ale lepiej gdyby Doktorant wykonał te drzewa na haplotypach zamiast na wszystkich dostępnych sekwencjach (dla każdego osobnika) – w aktualnym układzie odbiór topologii, a szczególnie odczytywanie nazw jest bardzo utrudnione, szczególnie że drzewa te są prawdopodobnie wstawionymi do pliku pdf rycinami (przypuszczam, że z plików .jpg z uwagi na ich słabą jakość), przez co nawet powiększanie obrazu nie poprawia ich czytelności. Tabele są przygotowane w sposób czytelny ale lepiej gdyby zawierały minimalną liczbę linii (tylko linie główne horyzontalne), jak to jest praktykowane w publikacjach naukowych.

Wykorzystana literatura obejmuje 128 pozycji, zarówno dawnych opracowań kluczowych dla taksonomicznego kontekstu pracy, jak i najnowszych publikacji molekularnych, co dowodzi bardzo dobrego rozeznania Doktoranta w koniecznym piśmiennictwie.

4. Uwagi krytyczne

Zadaniem recenzenta jest wskazanie zarówno mocnych, jak i słabszych stron rozprawy doktorskiej. Poniżej chciałbym zwrócić uwagę na kilka aspektów badań, które w mojej ocenie powinny być

rozważone i wyjaśnione przez Doktoranta w czasie publicznej obrony rozprawy doktorskiej oraz wzięte pod uwagę przy przygotowywaniu publikacji.

Str. 10

Doktorant cytuje szereg prac źródłowych dla taksonomii badanego podrodzaju ale powinien odnieść się tutaj także do najnowszych opracowań systematyki i taksonomii chrząszczy i ryjkowców takich jak: Alonso-Zarazaga & Lyal 1999, Löbl & Smetana 2004, Wanat & Mokrzycki 2005. Współczesna taksonomia badanych ryjkowców wynika z tych najnowszych prac podsumowujących i rewidujących wcześniej obowiązującą taksonomię i systematykę ryjkowców.

Wszędzie gdzie Doktorant pisze o podgatunkach *Liophloeodes* powinien używać skrótu np. *L. (L.) lentus*, a nie jedynie *L. lentus*, ponieważ to sugeruje albo gatunek *Liophloeus lentus* albo *Liophloeodes lentus* (a takich gatunków nie ma).

Str. 11 – drugi akapit i str. 66 – pierwszy akapit

Brak informacji źródłowych na temat ekologii. Doktorant w rozprawie wychodzi z założenia że brak jest różnic ekologicznych (w tym w roślinach żywicielskich) ale nie podpira tego założenia ani cytacjami wcześniejszych prac ani własnymi badaniami. Tymczasem różnice w rozmieszczeniu mogą wynikać z preferencji do różnych mikrosiedlisk lub różnych roślin żywicielskich (lub dostępności różnych gatunków roślin w zasięgu badanych ryjkowców), na co może wskazywać mozaikowe rozmieszczenie zasięgów poszczególnych gatunków *Liophloeodes*.

Tabela 1

Z mapy wynika że *L. liptoviensis* zasiedla także Karpaty Zachodnie.

Dlaczego *L. ovipennis* nie jest uwzględniony w badaniach (nawet jeżeli to tylko podgatunek to dlaczego nie ma okazów należących do tego taksonu w badanym materiale?). Jeżeli doktorant zamierzał zbadać pełną taksonomię *Liophloeodes* to nie powinien wykluczać z badań populacji/podgatunków z pewnych obszarów.

Podobnie *L. laevifrons* - ten niepewny takson nie jest uwzględniony w badaniach (przypuszczam, że jest w materiale pochodzący z Rumunii ale nie jest to wyjaśnione w pracy)

Str. 16 – 2.3 Badania molekularne i analiza sekwencji

Dlaczego zastosowano dwa sposoby izolacji DNA? Czy weryfikowano efektywność obu metod i czy zaobserwowano jakieś różnice mogące wpływać na dalsze etapy prac?

Dlaczego wybrano akurat te markery DNA – nie jest to uzasadnione w rozprawie, a np. 28S i ITS2 to dwa fragmenty rDNA sąsiadujące ze sobą, a więc praktycznie stanowiące jedno locus. Czy nie praktyczniejszą decyzją byłoby wybranie trzech niesprzężonych loci?

Str. 18

Dlaczego dla *Wolbachia* wybrano tylko gen wsp, podczas gdy standardem jest genotypowanie w oparciu o 5 genów MLST? Wsp jest krytykowany jako marker do analiz z uwagi na wysoki polimorfizm i częstą rekombinację tego genu między szczepami *Wolbachia*. Ponadto znajduje się tu sprzeczność bo w tekście wymieniony jest tylko wsp, a w tabeli podano że użyto primerów zarówno dla wsp jak i ftsZ.

Str. 21

Szkoda że do konstrukcji drzew nie użyto haplotypów zamiast sekwencji z każdego osobnika oddzielnie. Aktualne drzewa są bardzo rozbudowane i trudne do śledzenia i interpretacji. Zastosowanie kolorów na drzewach jedynie trochę ułatwia ich interpretację ponieważ mnogość nazw bardzo małą czcionką utrudnia ich czytanie.

Dlaczego nie wykonano analizy relacji za pomocą jednej z metod tworzących sieci haplotypów? W badaniach na poziomie populacyjnym lub bliskich taksonach takie wizualizacje lepiej pokazują relacje między populacjami/(pod)gatunkami.

Dziwi mnie, że nie zrobiono podstawowej analizy AMOVA między taksonami i geograficznymi grupami populacji co pozwoliłoby określić jaki procent zmienności genetycznej tłumaczy taksonomia, a jaki geografia.

Tabela 6

Z czego wynika inna liczba powtórzeń w analizie dla różnych markerów?

Tabela 7

Dlaczego zastosowano różne grupy zewnętrzne w każdym markerze?

Str. 22 - 2.4 Oznaczanie gatunków i badania morfometryczne.

Nie wydaje mi się by była to akceptowalna w taksonomii i morfometrii metoda - brak danych powinien być pozostawiony w macierzy do analizy a nie sztucznie zastępowany średnią z pomiarów z innych osobników.

Str. 23

Nie bardzo widzę powód dla przyjęcia podziału w analizie wg krajów - gatunki nie znają granic politycznych więc analiza wg krajów ma wątpliwe znaczenie, co innego analiza oparta o krainy

geograficzne lub inne naturalne podziały (w przypadku gatunków górskich można było uwzględnić podział wysokościowy, a dodatkowo z uwagi na nadrzeczne występowanie tych ryjkowców - podział po granicach zlewni np. mórz lub dorzeczy większych rzek).

Opis statystyk (PCA, GLM) jest bardzo lakoniczny i nie bardzo rozumiem jak to zostało wykonane (jakie dane - zmienne, jakie założenia modelowania itp.). Poza tym zamiast PCA do wizualizacji relacji między osobnikami względem ich pozycji taksonomicznej lepiej było użyć plotów NMDS.

Str. 29 – drugi akapit

Brak w tym opisie *L. herbstii*, dlaczego?

Str. 30

Zdanie: „(choć w kilku przypadkach gatunek *L. liptoviensis* jest stwierdzony na podstawie badań markerów jądrowych, a nie morfologii).” - W metodyce było podkreślone że gatunki identyfikowano morfologicznie, więc nie rozumiem tego opisu w nawiasie zdania.

Tabele 8-10

Dlaczego nie podano dystansów wewnątrzgatunkowych? Zestawienie zakresu dystansów wewnątrz- i międzygatunkowych pozwoliłoby na określenie czy istnieje tzw. "barcoding gap" między taksonami.

Str. 49

„..., a brak sekwencji „reverse” nie pozwolił zweryfikować, czy ...”

Dlaczego zatem nie wykonano sekwencjonowania „reverse” dla osobników o nieczytelnych sekwencjach?

Tabela 11

Takie przedstawienie polimorfizmów jest trudne do interpretacji. Zamiast tej tabeli albo jako jej uzupełnienie powinien znaleźć się alignment obrazujący wszystkie polimorficzne miejsca dyskryminujące taksony.

Tabela 12

Wygląda na to że część osobników badano na wsp a część na ftsZ - dlaczego? Lepiej było skupić się na jednym markerze (a docelowo wykonać genotypowaniem pełnym MLST).

Tabela 13

Co to znaczy podobne sekwencje? Jaki był % podobieństwa przy jakim pokryciu sekwencji względem referencji z Banku Genów?

Str. 55

Nieprzekonujące jest to wytłumaczenie braku samców *L. tesulatus* w badaniach - pozyskanie kilku okazów samców nie powinno być problemem np. na drodze współpracy z koleopterologami z Europy Zachodniej lub w efekcie pojedynczego wyjazdu w zasięg gatunku.

Zdanie „W przypadku samców można zaobserwować wyraźną różnicę między *L. lentus* a *L. liptoviensis* (choć oba zbiory częściowo się pokrywają) (Ryc. 31).” jest wewnętrznie sprzeczne - skoro morfometria tych gatunków się pokrywa to jak mogą się wyraźnie różnić?

Problemem jest także bardzo mała liczba osobników aż dwóch gatunków (*L. herbstii* oraz *L. pupillatus*) w badaniach morfometrycznych. Doktorant słusznie to podkreśla, niemniej jest to istotne ograniczenie badań uniemożliwiające wykonanie niektórych porównań.

Str. 62 - 3.3 Delimitacja gatunków

Szkoda że w rozprawie nie pokazano tych wyników delimitacji na rycinach (drzewach) jak to się zwyczajowo robi.

Str. 65 – pierwszy akapit

Jak już wzmiankowałem to wcześniej, badania nad endosymbiotycznymi bakteriami, a szczególnie *Wolbachia* są ciekawym, pobocznym tematem doktoratu, ale wymagają kontynuacji (bardziej szczegółowej analizy rozkładu infekcji w taksonach i populacjach), a w dyskusji wyników nawiązania do horyzontalnej transmisji tych bakterii – zjawiska które może tłumaczyć obecność tego samego szczepu *Wolbachia* w różnych gatunkach *Liophloeodes* oraz grupie zewnętrznej (*L. tesulatus*).

5. Ocena końcowa (uzasadnienie 25-200 słów):

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest wartościowym opracowaniem naukowym dotyczącym taksonomii i filogenezy ryjkowców z podrodzaju *Liophloeodes*. Mgr Wacławik wywiązał się z podjętych w celach rozprawy zadań badawczych, w tym z weryfikacji postawionych hipotez badawczych. Wykonał kompleksową analizę relacji między badanymi taksonami z uwzględnieniem różnic populacyjnych. Wykorzystał do tego zarówno metody morfometryczne jak i molekularne. Potwierdził, że wszystkie pięć analizowanych gatunków *Liophloeodes* charakteryzuje się odmienną morfologią (ale ograniczoną tylko do narządów kopulacyjnych samców) oraz odrębnymi genotypami jądrowymi. Natomiast filogeneza mitochondrialna tego podrodzaju wskazała na zjawisko hybrydyzacji zachodzące między różnymi gatunkami, czego efektem jest introgresja mtDNA. Wpływ na specjację i/lub hybrydyzację tych gatunków mogły mieć bakterie endosymbiotyczne ale wątek ten wymaga dalszych badań Doktoranta. W swoich badaniach mgr Wacławik wykazał się zarówno znajomością i

umiejętnością pracy terenowej jak i laboratoryjnej, co jest aktualnie coraz rzadziej spotykane wśród doktorantów i pracowników naukowych. Umiejętność poprawnego formułowania problemów badawczych i planowania badań oraz udokumentowana zdolność do wykonywania prac badawczych w szerokim zakresie metodycznym i technicznym bardzo dobrze rokuje naukowej przyszłości Doktoranta.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr **Beniamina Wacławika** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **Beniamina Wacławika** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

TAK/NIE

18.06.2018
data sporządzenia recenzji


.....
podpis recenzent