

Dr hab. inż. Kinga Skrzyszewska
Zakład Genetyki, Nasiennictwa i Szkółkarstwa Leśnego
Instytut Ekologii i Hodowli Lasu
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja
al. 29-Listopada 46, 31-425 Kraków
e-mail: rlkskrzy@cyf-kr.edu.pl
tel: 12 662 51 26; 605 681 606

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agaty Koneckiej

Wpływ metod produkcji szkółkarskiej na kształtowanie się struktury genetycznej materiału sadzeniowego sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)

napisana pod kierunkiem dr hab. Justyny Nowakowskiej, prof. IBL

Wydział Leśny, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Elementem funkcjonowania ekosystemów leśnych jest zmienność genetyczna drzew. Kluczowe znaczenie dla leśnych zasobów genowych ma sposób powstawania odnowienia. Odnowienie naturalne umożliwia przepływ informacji genetycznej do następnej generacji, nie wykluczając adaptacyjnych i nieadaptacyjnych zmian jej struktury genetycznej. Odnawianie sztuczne z kolei zakłócając wprawdzie naturalne funkcjonowanie ekosystemu leśnego w konkretnych warunkach wzrostu, umożliwia utrzymanie i zwiększenie zmienności genetycznej oraz produktywności poprzez dobór i hodowlę potomstwa najlepszych progeniencji o strukturze genetycznej gwarantującej stabilność adaptacyjną.

Struktura genetyczna współcześnie występujących populacji sosny pospolitej w Polsce jest wypadkową wielu procesów, począwszy od naturalnego rozpowszechniania się gatunku aż po zastępowanie naturalnych drzewostanów sztucznymi nasadzeniami. Należy, zatem szczególną uwagę zwrócić na pochodzenie i jakość hodowlaną materiału sadzeniowego. Głębszej analizie wymaga również oszacowanie poziomu zmienności genetycznej wprowadzanej populacji. Wysokie zróżnicowanie genetyczne sprzyja adaptacji do zmieniających się warunków środowiska i zwiększa szansę przeżycia.

Kluczowy problem ujęty w tytule pracy dotyczy wyjaśnienia czy i w jakim stopniu ulega modyfikacji struktura genetyczna odnowienia sztucznego, hodowanego w warunkach polowych szkółek otwartych - sadzonki z odkrytym systemem korzeniowych oraz warunkach

kontrolowanych - metoda kontenerowa - materiał sadzeniowy z zakrytym systemem korzeniowym. W tym kontekście Doktorantka stawia tezę, że metoda produkcji leśnego materiału sadzeniowego może być tym czynnikiem, który modyfikuje wielkość i zróżnicowanie puli genetycznej hodowanej populacji. Ważny jest również, poruszany w rozprawie aspekt, oceny struktury genetycznej populacji potomnej i odniesienie uzyskanych wyników do poziomu zmienności drzewostanów matecznych, z których pozyskiwane były nasiona.

Praca omawiająca zagadnienie zachowania zmienności genetycznej, jako gwarancji zdolności przystosowawczych populacji drzew leśnych, z punktu widzenia dalszej hodowli jest cenna. Uważam, że wymienione względy uzasadniają podjęcie badań, których podsumowaniem jest recenzowana praca.

Struktura formalna rozprawy

Układ dysertacji nie budzi zastrzeżeń. Rozprawa została napisana poprawnie pod względem językowym i formalnym. Autorka dowiodła umiejętności konstruowania tekstu naukowego. Rozprawa obejmuje 131 stron druku, w tym 24 tabele i 14 rycin. Posiada logiczną strukturę z zachowaniem właściwych proporcji między poszczególnymi rozdziałami. Najważniejsza część rozprawy tj. rozdziały: *Wyniki*, *Dyskusja* i *Wnioski* stanowi znaczący, ponad 50% udział w jej treści. Cel pracy został podany w sposób jasny i prawidłowy. Hipotezy badawcze sformułowano prawidłowo. Autorka zacytowała 234 pozycje literatury. Niewielka ich część – 12 pozycji ukazała się po 2010 roku. Warto podkreślić, że wśród publikacji ostatniego pięciolecia znajdują się dwie pozycje współautorskie Doktorantki.

OCENA ROZPRAWY

Wątpliwość recenzenta budzi sformułowanie tytułu rozprawy - „Wpływ metod...” zakłada z góry słuszność przyjętej hipotezy.

Dysertację rozpoczyna **Streszczenie**, którego treść wymaga przeredagowania. Autorka w dwóch następujących po sobie akapitach przekazuje tą samą informację: „ (...) sadzonki z hodowli kontenerowej są bardziej zróżnicowane genetycznie i cechują się bogatszą pulą genową” i w zdaniu następnym „Sadzonki z hodowli kontenerowej posiadają większą pulę genową i są bardziej zróżnicowane od sadzonek z hodowli tradycyjnej (...)”.

Dalszą część rozprawy stanowi – 25 stronicowy przegląd literatury napisany interesująco, potwierdzając kompetencje w zakresie ogólnej wiedzy teoretycznej zagadnień związanych z jej treścią.

We **Wstępie** Autorka zarysowała kontekst badanej problematyki oraz krótko przedstawiła zakres rozprawy. Opisując znaczenie badań zaznacza cyt. „Określenie poziomu różnorodności genetycznej gatunków, które tworzą ekosystemy może zapewnić zachowanie ich stabilności i gwarancję trwałości” – przyjmuje duże uproszczenie, samo określenie poziomu różnorodności nie "zapewni", ale jedynie może posłużyć do przygotowania rzetelnych planów w zakresie ochrony i zachowania zasobów genowych.

„W naukach leśnych – pisze Autorka – istnieje luka dotycząca informacji na temat zmian struktury” (str. 7), i w kolejnym rozdziale „W dziedzinie genetyki drzew leśnych przeprowadzono niewiele badań związanych z wpływem zabiegów pielęgnacyjnych w drzewostanach dojrzałych na strukturę genetyczną tych populacji...” (str. 19) – są to stwierdzenia dyskusyjne – jest bowiem szereg prac, które poruszają ten problem, na różnych poziomach ingerencji człowieka np. zbiór nasion, ilość osobników matecznych, wpływ zabiegów pielęgnacyjnych, czy też sposobu użytkowania drzewostanów. W załączeniu do recenzji kilka z nich - El-Kassaby & Benowicz 2000; Buiteveld et al. 2007; Rajendra et al. 2014; Thomas et al. 1999; Skroppa Tore 1994; İçgen et al. 2006.

Dobór materiału badawczego

Nasuwają się pytania w kwestii doboru materiału badawczego. Autorka określiła liczbę osobników matecznych, z których pobrano próbki do analiz, ale nie zamieszcza informacji o sposobie pozyskiwania nasion – z ilu drzew dokonano zbioru nasion w Nadleśnictwach Olsztynek i Oleszyce. Autorka sama podkreśla istotny wpływ tego faktu na wyniki badań pisząc m.in. na stronie 20: „ (...) badania (...) wykazały niewielką redukcję zmienności genetycznej populacji z samosiewu, ale pod warunkiem, że wystarczająco duża grupa drzew dorosłych brała udział w przekazywaniu genów”, również na stronie 21: zaznacza, że „(...) większy wpływ na strukturę genetyczną materiału sadzeniowego ma poprawność związana ze zbiorem nasion”. Nasuwa się pytanie, czy osobniki w liczbie 34 sztuk w Nadleśnictwie Olsztynek i 21 w Nadleśnictwie Oleszyce to wszystkie drzewa, z których zbierano nasiona? Jeżeli tak, to może niepokoić fakt ich małej liczby, a także dużej różnicy w masie zebranych nasion, odpowiednio 130 i 320 kilogramów.

Kolejną kwestią jest rozmieszczenie drzew na wybranych powierzchniach doświadczalnych. Na wynik zmienności genetycznej duży wpływ mają między innymi takie czynniki jak przepływ genów, czy selekcja, co ściśle wiąże się z lokalizacją osobników/populacji podlegających ocenie. Przy obecnym dostępie do narzędzi i technik geoinformatycznych, wskazanym wydaje się dołączenie do ew. publikacji pracy

charakterystyki lub mapki z lokalizacją drzew na powierzchniach, zarówno tych z których zbierano nasiona, jak i tych które posłużyły do pobrania próbek drewna.

W pracy nie zamieszczono informacji, czy do czasu wysiewu zebrane partie nasion przechowywano w jednakowych warunkach, jak również: czy partie nasion przeznaczoną do hodowli kontenerowej i tradycyjnej rozdzielono tuż po zbiorze, czy tuż przed wysiewem. Porównując zmienność genetyczną wyodrębnionych subpopulacji Autorka nie odnosi się w żaden sposób do tej „luki informacyjnej”. W pracy brak komentarza dotyczącego ewentualnego wpływu, lub jego braku, jaki na obserwowany finalnie rozkład zmienności genetycznej, mógł mieć okres przechowywania nasion, ich przygotowania do siewu, sam siew, czy zabiegi prowadzone na szkółce. Z metodycznego punktu widzenia lepiej byłoby wysiać i hodować sadzonki z wybranych lokalizacji w tych samych warunkach gospodarstwa szkółkarskiego.

Dobór metody badawczej

Przyjęta metodyka badań umożliwia realizację celu i pozwala na weryfikację postawionych hipotez badawczych. Markery mikrosatelitarnego DNA znane są jako dobre narzędzie badawcze do analiz zróżnicowania genetycznego populacji. Oprócz wielu zalet jakie posiadają należy jednak pamiętać, że w ich przypadku (markerów SSR) może dochodzić do błędów podczas amplifikacji DNA, co przejawia się pojawianiem tzw. „alleli zerowych”. W celu uniknięcia błędów interpretacyjnych wskazane jest, oszacowanie prawdopodobieństwa pojawiania się takich alleli w badanej próbie osobników, przy użyciu odpowiednich programów (np. Micro-Checker, INEst), czego Autorka nie wykonała.

Daleko idące wnioski prezentowane w pracy dotyczące poziomu zmienności genetycznej materiału sadzeniowego hodowanego różnymi metodami, mogą być dyskusyjne ze względu na niewielką ilość *loci* użytych do analiz – cztery przy DNA jądrowym oraz trzy przy DNA chloroplastowym. Jak wskazują ostatnie badania dobór *loci* – ich rodzaju oraz liczby w znaczący sposób może modyfikować otrzymane wyniki.

Autorka porównuje wyniki oparte na analizie nierównolicznych prób 34, 21 oraz 150 osobników, co może prowadzić do błędów interpretacji. Wskazane byłoby zastosowanie metody rarefakcji, która umożliwia porównywanie bogactwa allelicznego pomiędzy próbkami o różnej liczebności (Leberg 2002: Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks)

Wyniki

Poza częścią opisową, wyniki przedstawiono syntetycznie w formie 14 rycin i 21 tabel. Otrzymane stężenie próbek wahało się od 4,11 do 129,44 ng/ μ l w próbach z Nadleśnictwa Olsztynek oraz 2,36 do 123,31 ng/ μ l w próbach z Nadleśnictwa Oleszyce. W pracy brak informacji na temat przygotowania próbek do amplifikacji – czy dokonywano rozcieńczania próbek o wysokiej zawartości DNA w celu ujednoczenia poziomu stężenia?

Brak tabelarycznego zestawienia frekwencji alleli. Tabela taka powinna zostać załączona w Aneksie. Autorka skrupulatnie wylicza allele prywatne dla poszczególnych subpopulacji, ale często ich frekwencja jest tak mała, że trudno jest ją odczytać z wykresu i porównać do wyników innych subpopulacji.

Autorka stwierdza, że „badania potwierdziły *znaczący* wpływ człowieka na kształtowanie się puli leśnych zasobów genowych w polskich lasach już na etapie produkcji szkółkarskiej”, podczas gdy w prezentowanych wynikach trudno doszukać się takiej jednoznaczności. Tym bardziej, że we „Wnioskach” Autorka używa już łagodniejszych sformułowań typu: „niewielkie różnice”, „nieznacznie większa pula genowa”.

Podobieństwo genetyczne między badanymi subpopulacjami (pokolenie potomne) jest bardzo duże, co nie potwierdza zubożenia puli genowej w wyniku zastosowania tradycyjnej metody hodowli sadzonek. Zarówno w przypadku populacji z Nadleśnictwa Olsztynek, jak i z Nadleśnictwa Oleszyce sadzonki z produkcji kontenerowej i tradycyjnej są podobne do siebie w 97% (SSR jądrowe) oraz 99% (DNA chloroplastowe).

Potwierdza to wartość współczynnika utrwalenia (F_{ST}), który wskazuje że grupa sadzonek kontenerowych i z odkrytym systemem korzeniowym różni się zaledwie w 0,2% (DNA jądrowe). W pracy brak jest informacji na temat stopnia istotności statystycznej obserwowanych zmian. Istotność taką obliczono jedynie dla współczynnika wsobności (F_{IS}), nie wykazując jednak w żadnym przypadku istotnych różnic.

Zróżnicowanie genetyczne jakie występuje pomiędzy dwoma grupami sadzonek z hodowli kontenerowej i tradycyjnej (K i T) wskazuje, że z ostrożnością należy podchodzić do wyciągania jednoznacznych wniosków, zwłaszcza na podstawie danych jądrowych SSR. W mojej opinii różnice zarówno w obserwowanej (N_a) oraz oczekiwanej (N_e) liczbie alleli, jak i w pozostałych analizowanych parametrach (indeks Shannona, heterozygotyczność obserwowana H_o i oczekiwana H_e oraz heterozygotyczność h wg Nei'a) są zbyt małe aby mówić o „znaczącym wpływie człowieka”. W niektórych przypadkach subpopulacja z hodowli tradycyjnej w porównaniu do kontenerowej ma wartości porównywalne (np. H_e i h

Nei w subpopulacji P2) lub nawet wyższe (np. Ho w subpopulacji P1). W pracy brak jest analizy istotności prezentowanych różnic.

Ważną częścią dysertacji doktorskiej jest **Dyskusja** zawierająca interpretację uzyskanych wyników oraz **Wnioski końcowe**. Rozdział Dyskusja na swoich pierwszych kilku stronach jest w dużej mierze ponownym przedstawieniem wyników. Autorka czyniąc podsumowanie raczej skupiła się na odnoszeniu się do wyników własnej pracy, a w niewielkim tylko stopniu do literatury tematu. Dalsze strony to typowy przegląd literatury, nie często odwołujący się do przedstawianych wyników.

Niefortunne sformułowania i niezręczności stylistyczne przykłady:

Streszczenie: „(...) na dalszych etapach hodowli lasów” – trafniej było by „hodowli lasu”

str.42: „dzieje się tak ponieważ DNA organellowe (zarówno chloroplastowe, jak i iglastych DNA chloroplastowe...” - aż do końca akapitu, ten fragment wymaga przeredagowania, jest niejasny

str.48: opis ryciny „Frkwencja” zamiast „Frekwencja”

str. 58: „niwielkim” zamiast „niewielkim”

str. 94: „kontem” zamiast „kątem”

Podsumowanie

Wymienione w recenzji uwagi i przedstawione wątpliwości są propozycją do dyskusji i nie umniejszają walorów rozprawy. Oceniana praca jest wartościowa i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością literatury z zakresu objętego przedmiotem rozprawy. Dowiodła również, umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej począwszy od przedstawiania założeń metodycznych po wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników badań.

Autorka posiada wyobraźnię badawczą, otwartość oraz zdolność nieszablonowego myślenia. Cechy te twórczo wykorzystwała w realizacji pracy. W pełni zrealizowała przyjęty cel rozprawy i sformułowała wartościowe wnioski. Uzyskane rezultaty wzbogacają wiedzę ogólną, związaną z tematem dysertacji, posiadają również znaczenie praktyczne.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona przez mgr inż. Agatę Konecką rozprawa pt. *Wpływ metod produkcji szkółkarskiej na kształtowanie się struktury genetycznej materiału*

sadzeniowego sosny zwyczajnej (Pinus sylvestris L.) przygotowana pod opieką dr hab. Justyny Nowakowskiej, prof. IBL wyczerpuje wymagania art. 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. Nr 65, poz. 595; z późn. zm.). i spełnia warunki stawiane rozprawie doktorskiej. Wnioskuje o dopuszczenie mgr inż. Agaty Koneckiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Stip Szymek -

Kraków, dnia 22 kwietnia 2016 r.

Literatura uzupełniająca:

- Buiteveld, J. et al., 2007. Genetic diversity and differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L.) stands varying in management history. *Forest Ecology and Management*, 247(1-3), pp.98–106.
- El-Kassaby, Y.A. & Benowicz, A., 2000. Effects of commercial thinning on genetic, plant species and structural diversity in second growth Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) stands. *Forest Genetics*, 7(3), pp.193–203.
- İçgen, Y. et al., 2006. Potential impact of forest management and tree improvement on genetic diversity of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) plantations in Turkey. *Forest Ecology and Management*, 225(1-3), pp.328–336.
- Rajendra, K.C. et al., 2014. Subtle human impacts on neutral genetic diversity and spatial patterns of genetic variation in European beech (*Fagus sylvatica*). *Forest Ecology and Management*, 319, pp.138–149.
- Skroppa Tore, 1994. Impacts of tree improvement on genetic structure and diversity of planted forests. *Silva Fennica* 28 (4): 265-274
- Thomas, B.R. et al., 1999. Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 98(5), pp.793–801.