

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Macieja Kocińskiego pt. „Filogeneza pasikoników z grupy *Poecilimon ornatus* (Orthoptera)”,**

wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Beaty Grzywacz z Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt, Polskiej Akademii Nauk.

Podstawą formalno-prawną przygotowania recenzji rozprawy doktorskiej mgra Macieja Kocińskiego pt. „Filogeneza pasikoników z grupy *Poecilimon ornatus* (Orthoptera)” jest uchwała nr 1.E4.2022, z dnia 13 czerwca 2022, Rady Naukowej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt, Polskiej Akademii Nauk, podjęta w trybie Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t. jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w zw. z Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska składa się z trzech, powiązanych tematycznie, artykułów, które zostały opublikowane w języku angielskim w renomowanych zagranicznych, wysoko punktowanych, czasopismach naukowych:

Kocinski M. 2020. The relationships within the *Poecilimon ornatus* group (Orthoptera: Phaneropterinae) based on the cytochrome C oxidase I gene. *Folia Biologica* 68: 7-13. [https://doi.org/10.3409/fb\\_68-1.02](https://doi.org/10.3409/fb_68-1.02). Impact Factor: 0,432; punkty MEiN: 100; wkład: 100%

Kociński M., Grzywacz B., Hristov G., Chobanov D. 2021. A taxonomic outline of the *Poecilimon affinis* complex (Orthoptera) using the geometric morphometric approach. *PeerJ* 9: e12668. <https://doi.org/10.7717/peerj.12668>. Impact Factor: 2,984; punkty MEiN: 100; wkład: 70%

Kociński M., Chobanov D., Grzywacz B. 2022. New insights into the genetic diversity of the Balkan bush-crickets of the *Poecilimon ornatus* group (Orthoptera). *Arthropod*

Systematics & Phylogeny 80: 243-259. <https://doi.org/10.3897/asp.80.e82447>. Impact Factor: 2,354; punkty MEiN: 100; wkład: 70%. W momencie otrzymania rozprawy doktorskiej do recenzji praca ta miała status „w druku”, niedługo potem została ona opublikowana.

Sumarycznie IF wynosi 5,77 (choć po sprawdzeniu tych wartości, wydaje się, że zostały one nieco zaniżone przez Doktoranta), a punkty ministerialne wynoszą 300. Prace są powiązane ze sobą tematycznie i stanowią logiczną ciągłość badań. Przedstawione w rozprawie doktorskiej publikacje poprzedzone są 21 stronicowym wprowadzeniem, zawierającym klasyczne rozdziały: streszczenia po polsku i angielsku, wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i spis literatury. W rozprawie umieszczone zostały również oświadczenia współautorów prac o zaangażowaniu w powstanie konkretnej publikacji.

Ogólnym celem przeprowadzonych badań była rekonstrukcja pokrewieństw filogenetycznych w obrębie pasikoników z rodzaju pstro kaczek (*Poecilimon*), a konkretnie grupy taksonów *P. ornatus*. Użycie nieformalnej jednostki taksonomicznej, jaką jest tak zwana „grupa”, jasno wskazuje na powód, dla którego Doktorant wybrał ją do badań - jej pozycja taksonomiczna jest po prostu niejasna. W rzeczywistości rodzaj *Poecilimon* obejmuje niemal 150 gatunków o nieznanymi dokładnie powiązaniach filogenetycznych, pomimo wielu prac obejmujących badania molekularne, morfologiczne, a także dane bioakustyczne i cytogenetyczne. Brak pełnej wiedzy o taksonomii tej grupy wynika m. in. podobieństwa i zmienności cech morfologicznych, na których oparte może być wyróżnianie gatunków. W obrębie rodzaju wyodrębniono kilkanaście grup gatunków, a także gatunki nie należące do żadnej z nich, jedną z takich grup jest, analizowana w niniejszej pracy, *Poecilimon ornatus*.

Bardziej szczegółowymi celami prac składających się na niniejszą rozprawę doktorską, oprócz określenia pokrewieństw w obrębie *P. ornatus*, było określenie różnorodności genetycznej tych pasikoników oraz wyjaśnienie taksonomii grupy w oparciu o zróżnicowanie genetyczne oraz morfologię, w tym określenie statusu *Poecilimon affinis*, gatunku stosunkowo zmiennego, charakteryzującego się największym zasięgiem geograficznym spośród gatunków należących do grupy *P. ornatus*. Według mnie wybór badanej grupy i postawione pytania/cele mają duże znaczenie poznawcze oraz mogą mieć znaczenie praktyczne, przyczyniając się do lepszego poznania bioróżnorodności pasikoników i do lepszego zrozumienia ich taksonomii. Są również konieczne do podjęcia ewentualnych działań ochronnych i ewidencji możliwych zagrożonych gatunków.

Materiał do badań zbierano przez dość długi czas (13 lat) co umożliwiło uzyskanie prób z większości obszaru występowania badanych taksonów, a więc z Bałkanów, Rumunii i Ukrainy. Dla uzyskania odpowiedzi na postawione pytania badawcze Autor rozprawy doktorskiej wykorzystał zarówno techniki molekularne, jak i morfologiczne.

W badaniach molekularnych użył kilku markerów mitochondrialnych o różnym stopniu zmienności genetycznej (oksydazy cytochromowej, dehydrogenazy NADH 2 oraz regionu kontrolnego). Użycie tych markerów (które można co prawda traktować jako jeden locus) miało na celu umożliwienie analiz na różnym poziomie zróżnicowania genetycznego, markery o niskiej zmienności pozwalają na rozwikłanie filogenezy dla taksonów bardziej odległych niż w przypadku markerów o wysokiej zmienności. Doktorant zastosował również jeden marker jądrowy (ITS1), który jako fragment niekodujący posiada wystarczającą zmienność dla analizy taksonów w obrębie jednego rodzaju, składającego się w rzeczywistości ze stosunkowo blisko spokrewnionych gatunków. Generalnie Doktorant zastosował wszystkie podstawowe metody używane w badaniach filogenetycznych, takie jak sprawdzanie nasycenia substytucji, dwie powszechne metody rekonstrukcji filogenezy (maksymalnej wiarygodności i wnioskowanie bayesowskie), czy też sprawdzenie modelu substytucji nukleotydów. Dla COI, w celu wyznaczenia (delimitacji) gatunków użył czterech najczęściej wykorzystywanych metod; dodatkowo oszacował czasy dywergencji poszczególnych badanych grup pasikoników. Doktorant przeprowadzał również analizy biogeograficzne oraz sprawdzał związki między odległościami genetycznymi i geograficznymi. Badania morfologiczne, przeprowadzone na dość dużej liczbie osobników, obejmowały takie struktury jak przedplecze, przysadkę odwłokową, pokładelko, przednie skrzydło oraz aparat strydulacyjny. W swoich badaniach Doktorant wykorzystał analizy zmiennych kanonicznych oraz analizy głównych składowych.

Do najważniejszych wyników recenzowanej rozprawy należą: wykazanie spójności pomiędzy zmiennością genetyczną i morfologiczną (niezwykle istotną dla wnioskowania taksonomicznego), udowodnienie monofiletyczności grupy *P. ornatus* (co ma bezpośredni wpływ na uporządkowanie taksonomii całego rodzaju) oraz potwierdzenie odrębności genetycznej i morfologicznej *P. affinis* (co również ma duże znaczenie taksonomiczne). Wyniki te wpisują się w niezwykle ważną część badań podstawowych, jaką są analizy bioróżnorodności organizmów żywych i ustalenie liczby rzeczywistych gatunków. Badania takie mają oprócz wartości poznawczej, również wartość praktyczną, m. in. umożliwiają określenie miejsc o dużej bioróżnorodności i określenie konkretnych gatunków, które mogą wymagać ochrony.

Co oczywiste pierwszym etapem badań było określenie pokrewieństw filogenetycznych w obrębie *P. ornatus* (publikacja pierwsza). Doktorant przebadiał 84 osobniki pochodzące z 27 miejsc na terenie Półwyspu Bałkańskiego, Rumunii i Ukrainy. W badaniach użyto jednego markera COI, jednak mimo to wyniki przybliżyły wiedzę na temat taksonomii grupy. Badania potwierdziły monofiletyczność grupy *P. ornatus* oraz dość duże jej wewnętrzne zróżnicowanie. W jej obrębie można wyróżnić cztery kłady oraz jedną grupę parafiletyczną. Badania nie do końca potwierdziły wcześniejszy podział taksonomiczny badanych pasikoników. Przykładowo DNA przedstawicieli zdefiniowanych wcześniej jako *P. affinis* można znaleźć w różnych kładach nie tworzących grupy monofiletycznej. Doktorant dość dokładnie przeanalizował zgodności lub niezgodności otrzymanych wyników z wcześniejszą taksonomią grupy, biorąc pod uwagę liczne czynniki, takie jak zasięgi geograficzne, różnice w środowisku życia, cechy morfologiczne oraz różnice bioakustyczne. Praca ta jest niewątpliwym dobrym i koniecznym wstępem do dalszych, bardziej szczegółowych badań i stanowi dowód na dobre zaplanowanie całych badań wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Kolejnym etapem (publikacja druga) były analizy morfometryczne, które m. in. miały odpowiedzieć na pytanie, czy osobniki kompleksu *P. affinis* posiadają specyficzne cechy morfologiczne. W sumie Doktorant przeanalizował 196 osobników należących do 16 taksonów. W badaniach wykorzystał wymienione już wyżej cechy morfologiczne oraz, dla wybranych osobników, przeprowadził analizę filogenetyczną. Wśród ważniejszych wyników tej pracy należy wymienić m. in. odrębność niektórych gatunków, określoną na podstawie różnych cech morfologicznych, odrębność kompleksu *P. affinis* na podstawie przysadki odwłokowej oraz brak takiej odrębności dla pokładełka i przedplecza. Analizy aparatu strydulacyjnego wykazały odrębność kompleksu *P. affinis* i przynależność do niego tych samych gatunków, na które wskazywały wyniki analiz molekularnych. Niewątpliwie użyte przez Doktoranta metody morfometryczne okazały się przydatne do analizy taksonomicznej wielu gatunków z grupy *Poecilimon ornatus*, szczególnie z kompleksu *P. affinis*. Porównanie analiz morfologicznych i molekularnych wskazuje na parafilię tego kompleksu i konieczność włączenia do niego dwóch innych gatunków. Wyniki wykazały pewne rozbieżności z poprzednimi badaniami i wskazały na potrzebę dalszych badań nad fenetyką i genetyką tych pasikoników.

Takie kompleksowe wyniki zostały przedstawione w trzeciej publikacji, uzyskanej na podstawie badań molekularnych obejmujących cztery markery genetyczne, trzy mitochondrialne (o różnym poziomie konserwatywności) oraz jeden jądrowy. Oprócz analiz

filogenetycznych zostały przeprowadzone testy delimitacji gatunków, próba określenia czasów dywergencji oraz analizy biogeograficzne. W sumie Doktorant przebadiał 74 osobniki, pochodzące z 34 populacji, reprezentujące 19 wcześniej wyróżnionych gatunków. W pracy tej zostały potwierdzone wcześniejsze wyniki uzyskane przez Doktoranta, w tym monofiletyzm grupy *P. ornatus* oraz parafiletyzm kompleksu *P. affinis* oraz dość wiarygodne powiązania filogenetyczne pomiędzy poszczególnymi taksonami. Analizy delimitacji gatunków były dość rozbieżne (co jest dość częste w tego typu badaniach), przykładowo analiza ABGD wykazała istnienie 9 potencjalnych gatunków, podczas gdy metoda GMYC nawet do 34 możliwych gatunków. Co ciekawe trzy z zastosowanych metod wskazywały kompleks *P. affinis* jako jeden gatunek, ponownie jak w poprzednich badaniach, wraz z dwoma innymi, wcześniej wyodrębnionymi, gatunkami. Wyniki umieszczone w tej pracy wskazują również na czasy dywergencji poszczególnych badanych grup, m. in. czas dla wspólnego przodka całej grupy *P. ornatus* został określony na 1,62 miliona lat temu, a dla *P. affinis* około 0,41-0,02 miliona lat temu. Wyniki wskazują również na wpływ sześciu epizodów dyspersji i pięciu epizodów wikariancji na wzorec geograficzny rozmieszczenia badanej grupy *P. ornatus*.

Podsumowując przedstawione przez Doktoranta publikacje niewątpliwie przyczyniły się do rozjaśnienia taksonomii wybranej grupy. Mogą one być również podstawą do dalszych analiz z zastosowaniem innych cech morfologicznych i markerów genetycznych, jak i podstawą do rozszerzonych badań obejmujących innych przedstawicieli rodzaju *Poecilimon*.

Mam kilka pytań, uwag do Doktoranta. Po pierwsze czy jest możliwe stworzenie listy gatunków badanej grupy, potwierdzonych na podstawie uzyskanych wyników? Oczywiście rozumiem, że ostateczne podanie rzeczywistych gatunków nie jest możliwe, ale takie taksonomiczne opracowanie, wraz np. z mapami pokazującymi zasięgi geograficzne, może stanowić dobre podsumowanie przeprowadzonych badań. Jednocześnie, czy Doktorant planuje wykonanie formalnej rewizji taksonomicznej badanej grupy?

Nieco brakuje mi zestawienia wartości odległości genetycznej pomiędzy poszczególnymi wyróżnionymi gatunkami, tak dla mtDNA, jak i ITS. Wartości te pomiędzy kompleksem *P. affinis*, a pozostałymi taksonami grupy *P. ornatus* wydają się być niewielkie, ciekawe byłoby porównanie takiej zmienności wewnątrz i między grupami/gatunkami. Przydałoby się również porównanie zależności poziomu zmienności genetycznej i czasów dywergencji, jak takie stosunki mają się do innych pasikoników, owadów?

Próbki do badań były zbierane głównie na Bałkanach, Rumunii i Ukrainie, ale, według literatury, istnieją jeszcze populacje w Słowenii i północnych Włoszech, co o nich wiadomo?

Czy były badane molekularnie i morfologicznie? Czy też należą do grupy *P. ornatus*? Podobnie czy Doktorant próbował stworzyć drzewo filogenetyczne ze wszystkich sekwencji COI z GenBank? Oczywiście byłoby to drzewo dość karkołomne i nie publikowalne, ale tak z czystej ciekawości mogłoby być interesujące.

Mam też kilka pytań co do zastosowanych metod: dlaczego Doktorant wybrał aplikację IQ TREE dla analizy maksymalnej wiarygodności i jaka jest jej przewaga nad np. RAxML?, czy użyte były partycje w analizach filogenetycznych?, czy sprawdzane były również inne markery jądrowe, jak histon, ITS2, czy inne, i czy okazały się one niezienne? Dlaczego kład III wyodrębniony na podstawie COI określony jest jako parafiletyczny, czy nie można go traktować jako dwóch odrębnych kładów, jaka jest odległość genetyczna pomiędzy dwoma podgrupami tego kładu?

Powyższe pytania wynikają głównie z ciekawości recenzenta i zupełnie nie wpływają na wysoką ocenę recenzowanej pracy.

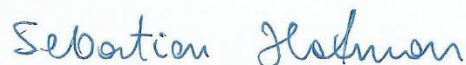
## Konkluzje

Rozprawa doktorska mgra Macieja Kocińskiego stanowi niewątpliwie oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, na co wskazują badania przeprowadzone na grupie owadów o nierozwiązanych do tej pory powiązaniach filogenetycznych i nie do końca poznanej taksonomii tej grupy. Odpowiednie metody zastosowane przez Doktoranta pozwoliły na uzupełnienie braków wiedzy dla tej grupy pasikoników, a wyniki można bezpośrednio użyć do wyciągnięcia ogólniejszych wniosków, np. o ochronie bioróżnorodności. Mogą być one również podstawą do formalnej rewizji taksonomicznej badanej grupy. Trzeba nadmienić, że badania nad zmiennością organizmów z wykorzystaniem różnych podejść, jak analiza zmienności morfologicznej i zmienności markerów mitochondrialnych i jądrowych, są niezwykle cenne, gdyż tylko takie podejście może dać miarodajne wyniki, biorąc pod uwagę nie tylko szeroko rozumianą zmienność międzygatunkową, ale również pozwolić na wykrycie takich zjawisk jak istnienie zmienności kryptycznej i pseudokryptycznej, a także hybrydyzacji i introgresji. Jak zawsze tego typu badania, są również podstawą do dalszych analiz z zastosowaniem większej liczby markerów, cech morfologicznych i behawioralnych.

Przedstawione prace oraz wprowadzenie niewątpliwie świadczą o dużej wiedzy Doktoranta z zakresu nauk biologicznych. Świadczą o tym odpowiednio postawione cele badań i ich realizacja, odpowiedni wybór technik badawczych, sprawne posługiwanie się

literaturą naukową i umiejętność wyciągania wniosków z otrzymanych wyników oraz ich dyskusowanie. Trzeba pamiętać, że Doktorant posługiwał się wieloma technikami używanymi zarówno w badaniach molekularnych, jak i morfologicznych. Wybór ciekawego i uzasadnionego merytorycznie tematu pracy i zastosowanie odpowiednich metod umożliwiających osiągnięcie zaplanowanych celów, świadczy pośrednio również o samodzielności Doktoranta. Znaczący wkład w powstanie dwóch przedstawionych artykułów, a przede wszystkim publikacja, której Doktorant jest samodzielnym autorem, również świadczą o Jego dużej samodzielności w projektowaniu, przeprowadzaniu i publikowaniu badań naukowych.

Biorąc pod uwagę, że podjęte badania stanowią oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego, posiadają znaczne wartości poznawcze, świadczą o dużej wiedzy Autora z zakresu nauk biologicznych i jego umiejętnościach niezbędnych do samodzielnego prowadzenia badań oraz wyciągania wniosków, stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska mgra Macieja Kocińskiego spełnia wszelkie warunki ustawowe stawiane pracom doktorskim, na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t. jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w zw. z Ustawą z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt, Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgra Macieja Kocińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Sebastian Hofman, prof UJ