



## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Paśnik pt.: „Systematyka i filogeneza afrykańskich motyli z rodzaju *Apisa*”, wykonanej w Zakładzie Zoologii Bezkręgowców Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN pod kierunkiem dr hab. Łukasza Przybyłowicza

### 1. Wstęp

Przedmiotem badań w ramach ocenianej rozprawy jest rodzaj *Apisa* Walker należący do plemienia Syntomini w obrębie rodziny Erebidae. Hipoteza dotycząca odrębności rodzaju *Apisa* i jego przynależności do Syntomini była oparta na dwóch cechach morfologicznych i jak dotąd nie doczekała się dogłębnej diagnozy, która jednoznacznie określałaby jego odmienność od innych przedstawicieli tego plemienia. Pojawiające się w ostatnich latach publikacje oparte na afrykańskich materiałach powiększają wiedzę o różnorodności taksonomicznej oraz morfologicznej Erebidae i wymuszają pilną potrzebę rewizji i sformułowania diagnoz taksonów niższej rangi, w tym rodzajów. W ten nurt badawczy wpisuje się przedstawiona dysertacja. Ze względu na różnorodność grupy, słabe zbadanie jej taksonomii, nikłe wcześniejsze rozpoznanie fauny oraz konieczność integracji tradycyjnych i nowoczesnych metod badań przyjęty temat można uznać za ambitny.

### 2. Wartość naukowa rozprawy

#### a. Oryginalność badań

Przedstawiona dysertacja mgr Anny Paśnik jest całkowicie oryginalnym opracowaniem a wiodąca rola Doktorantki w jej przygotowaniu nie budzi wątpliwości (załączono stosowne oświadczenia). Publikacje wchodzące w skład dysertacji zawierają propozycję nowego ujęcia rodzaju *Apisa*. Jest ono sformułowane w oparciu o opracowany przez Doktorantkę zestaw danych morfologicznych i molekularnych. Opracowanie to, w formie trzech odrębnych artykułów-rozdziłów, stanowi ważny wkład do toczącej się obecnie dyskusji na temat filogenezy, systematyki i biogeografii rodziny Erebidae, obszernej i różnorodnej grupy Lepidoptera. Przeprowadzona rewizja cech morfologicznych poparta opartymi na danych molekularnych delimitacją gatunków (metoda ASAP) oraz rekonstrukcją



filogenetyczną (mS-seq) stały się podstawą zaproponowanych przez Doktorantkę zmian definicji i kształtu badanego rodzaju. Niekwestionowany aspekt oryginalności posiada także część dysertacji poświęcona zagadnieniom alfa-taksonomicznym, obejmująca opisy i redeskrypcje gatunków. Dysertacja mgr Anny Paśnik jest opracowaniem nowoczesnym i spełniającym wysokie standardy w badaniach z zakresu taksonomii i systematyki Lepidoptera. Nie odbiega od bardzo dobrych opracowań dotyczących podobnych zagadnień, poświęconym innym grupom bezkręgowców.

#### b. Wartość naukowa dysertacji

Każdy z trzech przedstawionych dość obszernych artykułów-rozdziałów (dwa z nich to już opublikowane prace, trzeci to manuskrypt złożony do oceny w czasopiśmie) dotyczy problemów związanych z taksonomią rodzaju *Apisa*. Są one poświęcone następującym zagadnieniom, analizowanymi częściami w poszczególnych artykułach-rozdziałach: 1) ocenie ukrytej różnorodności przy pomocy tradycyjnych (opartych na morfologii) metod taksonomicznych i skonfrontowanie wyników z molekularną delimitacją gatunków, 2) określeniu apomorfii rodzaju *Apisa* oraz weryfikacji zasadności jego podziału na podrodzaje, 3) opracowaniu systematycznego rodzaju *Apisa* wraz z kluczami do oznaczania oraz ilustracją cech diagnostycznych. Badany rodzaj okazał się być trudną taksonomicznie grupą, o czym zadecydowała jednorodna budowa zewnętrzna w połączeniu z uproszczeniem morfologii genitaliów. Najważniejsze osiągnięcia można podsumować jako: 1) zdefiniowanie rodzaju *Apisa* jako grupy monofiletycznej, dobrze charakteryzowanej poprzez jedną autapomorfie (brak *arolium*); 2) wykazanie braku użyteczności dla celów taksonomicznych tradycyjnie wykorzystywanych w badaniach *Apisa* cech budowy aparatu kopulacyjnego, ze skutkiem podważenia dotychczasowego podziału na podrodzaje; 3) wykrycie znacznej kryptycznej zmienności w obrębie badanego rodzaju; 4) wskazanie wschodniej Afryki jako hipotetycznego obszaru powstania rodzaju *Apisa* i jednocześnie centrum jego różnorodności. W kontekście globalnego zapotrzebowania na dokumentowanie zanikającej bioróżnorodności, bardzo ważną częścią dysertacji są: 1) przedstawione opisy i redeskrypcje gatunków przygotowane w oparciu o metody taksonomii integratywnej, 2) opracowany klucz do identyfikacji gatunkowej a także 3) przedstawione mapy rozmieszczenia.



## 2. Wartość merytoryczna rozprawy

Wartość merytoryczną rozprawy oceniam wysoko. Hipotezy badawcze są jasno sformułowane a zaproponowane metody badawcze adekwatne do ich weryfikacji. Podstawą analiz taksonomicznych jest dopracowanie metod umożliwiających uzyskanie powtarzalnych i porównywalnych danych. Wybrany obiekt badań stwarza w tym aspekcie spore trudności. Aparat kopulacyjny (kluczowa struktura w pracach nad taksonomią grupy) to struktura słabo zesklebotyzowana, trudno poddająca się powtarzalnej preparacji w kontekście zachowania ogólnego kształtu, wymagająca dodatkowo wybarwienia. Struktury zesklebotyzowane, trójwymiarowe (skrzydła, łuski, stopy) są także trudne do powtarzalnego udokumentowania metodami mikroskopii świetlnej w różnych wariantach czy też SEM. Należy tu zaznaczyć, że Doktorantka opanowała ten warsztat w bardzo dobrym stopniu, zapewne korzystając z doświadczeń swojego promotora. Cechy morfologiczne gatunków opracowanych w dysertacji są dobrze udokumentowane na masową skalę z zastosowaniem metod mikroskopii świetlnej oraz SEM. Stanowi to wiarygodną podstawę zarówno opisów nowych taksonów, rewizji, jak i rozważań ewolucyjnych. Relacje filogenetyczne zostały odtworzone i przedstawione graficznie przy wykorzystaniu właściwego, aktualnego oprogramowania. Ich interpretacja jest prawidłowa a wnioski wyciągnięte na tej podstawie dotyczące zmian w klasyfikacji *Apisa* (zniesienie podziału na podrodzaje) oceniam jako uzasadnione.

## 3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Dysertacja ma poprawny układ. Główna część rozprawy została poprzedzona Streszczeniem w języku polskim i angielskim. Następnie przedstawiono listę artykułów/manuskryptów wchodzących w skład dysertacji. Po krótkim Wstępie Doktorantka wymieniła wyraźnie zdefiniowane cele badań oraz przedstawiła hipotezy badawcze. W rozdziale Materiał i metody zostały podsumowane metody zastosowane we wszystkich pracach wchodzących w skład dysertacji. Podobnym zbiorczym podsumowaniem są rozdziały Wyniki i Dyskusja. Po nich mgr Paśnik przedstawiła syntetyczne Podsumowanie. Po spisie literatury zostały zamieszczone trzy obszernie artykuły/manuskrypty liczące odpowiednio 16, 25 i 70 stron. Każda z nich ma układ charakterystyczny dla typowej publikacji naukowej z podziałem na wstęp, materiał i



metody, wyniki i dyskusję a także w przypadku dwóch ostatnich części załączniki. Na uwagę zasługuje przejrzyste przedstawienie dokumentacji morfologicznej oraz uzyskanych drzew filogenetycznych. Całość zamykają stosowne oświadczenia współautorów i samej Doktorantki.

#### 4. Uwagi krytyczne

Przedstawiona do oceny dysertacja prezentuje dobry poziom merytoryczny. Przedstawione uwagi krytyczne należy traktować raczej jako sugestie modyfikacji/aktualizacji części stosowanych metod. Realizacja części celów pracy a także weryfikacja postawionych hipotez badawczych napotkała na niespodziewane przeszkody. W streszczeniu pojawia się enigmatyczne stwierdzenie: „... w przypadku grup tak jednorodnych morfologicznie, a jednocześnie cechujących się znacznym stopniem zmienności morfologicznej...”. Mamy tu ewidentny błąd logiczny, powtórzony także w wersji angielskiej („... in the case of a group as morphologically homogeneous as this and yet still characterized by a significant degree of morphological variation...”). Obiekt badań jest różnorodny morfologicznie, czy też nie jest? Jakie są właściwie wnioski płynące z morfologicznej części badań? Nie mniej z lektury dalszej części dysertacji wiemy, że gatunki należące do rodzaju *Apisa* charakteryzują się wyjątkową jednolitością budowy zewnętrznej w połączeniu z uproszczeniem budowy aparatu kopulacyjnego, gdzie dodatkowo pojawiają się liczne kontrowersje dotyczące interpretacji budowy poszczególnych jego elementów. Tutaj pojawia się ważna (i słuszna) decyzja Doktorantki, aby porzucić oparty na tych cechach system podziału na podrodzaje. W mojej opinii powinno to skutkować także silniejszym przesunięciem badań w stronę analizy danych molekularnych. Dysponując sekwencjami barkodowymi COI, Doktorantka wykonała analizę delimitacji gatunkowej w oparciu o metodę ASAP. W dysertacji brakuje uzasadnienia dlaczego wybrano akurat tą metodę (z kilku dostępnych)? Dlaczego wobec niskiej użyteczności cech morfologicznych w delimitacji nie została podjęta próba zastosowania innych metod delimitacji gatunkowej, także opartych na nieco innych algorytmach (np. *Automatic Barcode Gap Discovery* ABGD, czy *Bayesian Phylogenetics & Phylogeography* BPP i in.) w celu ewentualnej weryfikacji delimitacji uzyskanych poprzez zastosowanie narzędzia ASAP? Podstawą rekonstrukcji filogenetycznej zaproponowanej przez Doktorantkę i jej współpracowników jest analiza danych molekularnych. Dlaczego



do odtwarzania filogenez zastosowano sekwencje tylko trzech genów (COI, WG, RpS5)? uzyskanych wyłącznie metodą sekwencjonowania Sangerowskiego? Stosowanie sekwencjonowania Sangerowskiego można uznać powoli za przeżytek, z powodu względnie wysokiego kosztu (czas, środki finansowe) uzyskania stosunkowo niewielkich fragmentów sekwencji. Dodatkowo użyteczność części wybranych przez Doktorantkę genów (np. COI) do odtwarzania relacji filogenetycznych jest kwestionowana. Filogenezy oparte na „zwierzęcej” sekwencji barkodowej COI są niewiarygodne, szczególnie w kontekście topologii/niskiego wsparcia wewnętrznych węzłów rekonstruowanych drzew. Obserwowane w pracach słabe wsparcie wewnętrznych węzłów drzew (np. Paśnik i in. manuskrypt: Fig. 1) – to z pewnością wynik zastosowania tej ograniczonej liczby genów, niekoniecznie adekwatnych do rozstrzygnięcia o relacjach na wyższym poziomie taksonomicznym. Uzyskana filogeneza słabo koresponduje z rozmieszczeniem kluczowych cech morfologicznych. Trudno jednak odpowiedzieć na pytanie czy odpowiada za to nieprawidłowe odtworzenie relacji pokrewieństwa wynikając np. z niskiej informatywności wybranych markerów genetycznych, czy też mamy tu do czynienia z licznymi przykładami konwergencji kluczowych cech budowy aparatu kopulacyjnego (Paśnik i in., manuskrypt: Fig. 2). Być może postulowana przez Doktorantkę niska użyteczność taksonomiczna cech budowy aparatu kopulacyjnego, nie jest aż tak niska. Zdaję sobie sprawę z trudności w izolacji DNA z okazów muzealnych (co ogranicza zastosowanie części metod z zakresu możliwości jakie daje sekwencjonowanie nowej generacji). Ważnym aspektem było też zapewne uzyskanie danych molekularnych kompatybilnych z tymi już opublikowanymi i zdeponowanymi w repozytoriach. Daje to możliwość zwiększania próbkowania, bardzo ważnego w badaniach bogatych gatunkowo grup bezkręgowców. Chciałbym zachęcić Doktorantkę do sięgnięcia w przyszłych badaniach po alternatywne metody molekularne, umożliwiające uzyskanie bogatych sekwencji także z niewielkich izolatów DNA (*genome skimming*, UCE). Zastosowanie metod filogenomicznych z pewnością pomoże w uzyskaniu drzew o wysokim wsparciu także na wewnętrznych węzłach, rozstrzygając relacje pokrewieństwa z większą wiarygodnością.



### 5. Ocena końcowa

Przedstawiona dysertacja dostarcza nowych oryginalnych danych morfologicznych i genetycznych dla słabo zbadanych motyli z rodzaju *Apisa* o afrotropikalnym występowania. Poprzez udane zastosowanie metod taksonomii integratywnej, Doktorantka wpisuje się w nowoczesne kierunki i standardy w badaniach taksonomii, systematyki, filogenezy owadów. Jej wiodąca rola w powstaniu dysertacji nie budzi żadnych wątpliwości. Uważam, że mgr Anna Paśnik wykazała się zdolnością do skutecznego prowadzenia badań naukowych oraz dobrą umiejętnością opracowania wyników i przedstawienia ich w formie rozprawy naukowej.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Anny Paśnik spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 (lub 13 ust. 2 - w przypadku zbioru artykułów) ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2018 r. poz. 1789 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN o dopuszczenie mgr. Anny Paśnik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.