



Muzeum i Instytut Zoologii Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 26.08.2022

dr hab. Karol Szawaryn, prof. MiZ
Muzeum i Instytut Zoologii
Polska Akademia Nauk
ul. Wilcza 64, Warszawa

Ocena

rozprawy doktorskiej Pana magistra Macieja Kocińskiego pt. "Filogeneza pasikoników z grupy *Poecilimon ornatus* (Orthoptera)"

Przedstawiona do oceny praca dotyczy analizy powiązań filogenetycznych grupy gatunków z rodzaju *Poecilimon* Fischer, 1853 należącego do rzędu owadów prostoskrzydłych (Orthoptera). Rodzaj ten grupuje ok. 145 gatunków i jest szeroko rozmieszczony w Palearktyce. Obejmuje on głównie gatunki o zredukowanych skrzydłach i podzielony jest na 18 nieformalnych grup gatunkowych. Jedną z nich, grupą *Poecilimon ornatus*, była przedmiotem badań Doktoranta wraz z zespołem. Gatunki zaliczane do tej grupy występują przede wszystkim na obszarze Półwyspu Bałkańskiego. Klasyfikacja oraz taksonomia tej grupy gatunków, mimo wielu opracowań głównie morfologicznych, nadal stanowi problem dla specjalistów zajmujących się tą grupą owadów.

Problem badawczy, którym zajął się Pan mgr Kociński, jest o tyle typowy, że w wielu grupach owadów gatunki nielotne, dodatkowo zamieszkujące tereny górzyste, wytwarzają wiele form o trudnych do ustalenia relacjach filogenetycznych, czego przyczyną mogą być niepełne rozdzielanie puli genowej, procesy hybrydyzacji czy zmiany zasięgów występowania związane np. ze zmianami klimatu. Stanowi to dość ciekawy i nietrywialny przedmiot badań.

Praca doktorska ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w wydawnictwach naukowych. Składa się z dwóch prac opublikowanych w latach 2020 i 2021 oraz jednej przyjętej do druku. Są to następujące pozycje:

1. Kociński M. 2020. The relationships within the *Poecilimon ornatus* group (Orthoptera: Phaneropterinae) based on the cytochrome c oxidase I gene. *Folia Biologica* (Kraków) 68: 7-13.
2. 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.



3. Kociński M., Chobanov D., Grzywacz B. 2022. New insights into the genetic diversity of the Balkan bush-cricket of the *Poecilimon ornatus* group (Orthoptera: Tettigoniidae). *Arthropod Systematics & Phylogeny* - w druku.

Należy dodać że ostatnia, trzecia praca została już opublikowana po otrzymaniu przeze mnie rozprawy do oceny. Wszystkie prace zostały napisane w języku angielskim i opublikowane w międzynarodowych czasopismach indeksowanych w *Journal Citation Report*. Pierwsza praca z cyklu jest jednoautorska, a w pozostałych dwóch publikacjach mgr Maciej Kociński jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Zgodnie z informacjami zawartymi w oświadczeniach współautorów, udział Doktoranta w tworzeniu drugiej i trzeciej publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej był znaczący i w obu przypadkach wynosił 70%. Obejmował przy tym wszystkie etapy powstawania publikacji naukowej od zaplanowania badań, poprzez zebranie materiałów, badania laboratoryjne, analizy danych, interpretację wyników a finalnie także przygotowanie tekstu publikacji.

Wskaźniki oddziaływania czasopism (IF), w których opublikowano artykuły są zróżnicowane i wynoszą 0,432, 2,984 oraz 2,354. Sumaryczna wartość IF wynosi 5,77, a średnia 1,923, co w entomologii stanowi wynik bardzo dobry. Sumaryczna liczba punktów MEiN wynosi 300.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska ma układ typowy dla osiągnięć naukowych opartych na zbiorze opublikowanych artykułów. Składa się z kilku rozdziałów napisanych w j. polskim i obejmuje informacje wstępne (Streszczenie, Summary, Publikacje stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej - wykaz) oraz numerowane rozdziały części merytorycznej (Wstęp, Cele i hipotezy badawcze, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie), które łącznie omawiają cykl trzech publikacji. Na końcu znajduje się Literatura, Artykuły (wchodzące w skład rozprawy), Załączniki i Oświadczenia współautorów. Każda z prac wchodzących w skład cyklu odzwierciedla układ typowy dla publikacji naukowych i jest bogato uzupełniona tabelami oraz ilustracjami. Jedyna uwaga krytyczna odnosi się do umieszczenia materiałów dodatkowych (supplementary materials) w osobnym rozdziale zamiast bezpośrednio po odpowiednim artykule, co wydaje się bardziej naturalnym układem.

Ocena artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Prace będące podstawą rozprawy zostały opublikowane w czasopismach o ugruntowanej pozycji i renomie, co oznacza że były poddane merytorycznej ocenie redaktorów jak i recenzentów. Jednak mam pewne komentarze i uwagi do poszczególnych prac.

Art #1. Pierwsza publikacja dotyczy analizy powiązań filogenetycznych w obrębie grupy gatunkowej *Poecilimon ornatus*. Analiza ta oparta jest o jeden marker molekularny, barkodowy fragment pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej (COI). Publikację tę należy uznać za badania wstępne i stanowiące punkt wyjścia do dalszych badań nad analizowaną grupą owadów. Jest to pierwsza próba analizy powiązań filogenetycznych w tej grupie gatunków przy użyciu oksydazy cytochromowej. Praca w całości wykonana jest przez doktoranta i należy tu docenić samodzielność i umiejętność wykonania wszystkich analiz. Jednak nie udało się uniknąć kilku błędów takich jak np.: a) brak informacji w jakim programie wykonana została analiza bayesowska; b) rozbieżna liczba okazów użytych w analizie, w sekcji *Material and Methods* wymieniono, że w analizie użyto 84 okazów *Poecilimon* (zarówno z grupy *ornatus* jak i z innych grup gatunkowych), a jako grupy zewnętrznej użyto *Polysarcus denticauda* (łącznie 85 okazów), zaś w towarzyszącej artykułowi tabeli wymieniono 65 okazów z grupy *ornatus* plus 6 z grup zewnętrznych (łącznie 71), natomiast na drzewie filogenetycznym widnieją 84 taksony terminalne.

Art #2. W drugiej publikacji Doktorant wraz ze współpracownikami skupia się na analizie morfometrycznej czterech wybranych struktur morfologicznych, trzech samca (pronotum, przysadka odwłokowa, przednie skrzydło) oraz jednej struktury samicy (pokładętko). Analizy wykazały zróżnicowaną przydatność tych struktur do wyodrębniania taksonów na poziomie gatunkowym i podgatunkowym. Oceniam tę część pracy doktorskiej jako wartościową, gdyż w dobie wszechobecnych analiz molekularnych analizy cech morfologicznych są stosunkowo rzadko wykonywane, a niosą ze sobą dużo informacji o ewolucji struktur czy behawiorze, czego brakuje w analizach czysto molekularnych.

Dodatkowo w pracy tej wykonana została ponownie analiza sekwencji oksydazy cytochromowej jednak trudno nie odnieść wrażenia, że jest ona niejako doklejona i nie ma wiele wspólnego z analizowanymi cechami morfologicznymi. Cechy morfologiczne nie zostały zmapowane a tylko pobieżnie omówione w kontekście tego drzewa. Można było przecież przedyskutować wyniki analizy morfometrycznej w oparciu o drzewo zaprezentowane w poprzedniej pracy. Dodatkowo w sekcji *Materials & Methods* nie ma podanej listy użytych do analiz sekwencji, co znacząco utrudnia porównanie tych wyników z wynikami z pierwszej pracy. Ponadto znów, w tekście pojawia się liczba 71 przeanalizowanych sekwencji, podczas gdy na zaprezentowanym drzewie widnieje jedynie 57. Pomimo wykonania analiz metodą bayesowską i największej wiarygodności, w opisie wyników trudno się doszukać opisu różnic czy podobieństw otrzymanych drzew (poza enigmatycznym stwierdzeniem, że były podobne), a na ilustracjach zamieszczono jedynie drzewo bayesowskie.

Art #3. Trzecia praca jest najobszerniejsza i obejmuje analizę czterech markerów molekularnych w tym oksydazy cytochromowej COI, fragmentu dehydrogenazy NADH2, regionu kontrolnego CR oraz ITS1. Dane te zostały poddane wielu analizom takim jak rekonstrukcja powiązań filogenetycznych, analizie wyznaczania granic gatunków, analizie czasu dywergencji,

czy analizie biogeograficznej. Oceniam tę pracę pozytywnie z racji wykazania umiejętności wykonania wielu obliczeń przy zastosowaniu różnych, czasem skomplikowanych programów.

Moją wątpliwość budzi jednak wybranie niektórych fragmentów genów do odtwarzania relacji filogenetycznych, a zwłaszcza oparcie większości analiz (poza analizą filogenetyczną) na tylko jednym markerze molekularnym, czyli sekwencji oksydazy COI, co w obecnych czasach stanowi już przeżytek. Obecnie istnieje wiele publikacji dokumentujących niewiarygodność barkodowego fragmentu sekwencji oksydazy COI (ale i całej sekwencji genu) w odtwarzaniu powiązań filogenetycznych. Oczywiście analiza tego fragmentu w ramach badań wstępnych jest uzasadniona, m.in. z racji największej bazy danych sekwencji porównawczych zdeponowanych w GenBanku czy łatwości amplifikacji tego fragmentu genu. Jednak wnioskowanie o relacjach filogenetycznych na podstawie tego fragmentu DNA powinno być traktowane ze sporą rezerwą. Stąd też moje pytanie, dlaczego mając do dyspozycji kilka markerów molekularnych Doktorant zdecydował się na wykonanie wielu analiz (jak analiza wyznaczania granic gatunków, datowanie drzewa filogenetycznego czy analiza biogeograficzna) w oparciu tylko o jeden marker czyli oksydazę? Analizy te mogą być w dużym stopniu obciążone błędem wynikającym z niewłaściwej rekonstrukcji drzewa filogenetycznego w oparciu o ten jeden marker. Co prawdopodobnie ma odzwierciedlenie w analizie wyznaczania granic gatunków gdzie Doktorant sam stwierdza, że żadna z zastosowanych metod nie potwierdza liczby gatunków wyznaczanych metodami morfologicznymi czy bioakustycznymi.

Także w tej pracy pojawiają się pewne nieścisłości. Nie jest np. wyraźnie opisane ile sekwencji i dla jakich markerów zostało pozyskanych *de novo*, a które pochodzą z wcześniejszych prac, a tym samym czy analizowane okazy to są te same okazy co użyte w analizach w poprzednich pracach (a więc dane są kompatybilne) czy też są to inne, nowo zebrane okazy. Tych informacji można dowiedzieć się jedynie sprawdzając numery akcesyjne poszczególnych sekwencji.

Uwagi ogólne

Część wstępna pracy doktorskiej, napisana w języku polskim, nie zawsze jest kompatybilna z treścią poszczególnych artykułów, Na przykład opisanie wspólnego dla wszystkich prac paragrafu *Materiały i metody* nie odzwierciedla różnic metodycznych zastosowanych w poszczególnych artykułach np. w Art #1 analiza Maximum Likelihood została policzona w programie Phym1 (o którym nie ma słowa w *Materiałach i metodach*), a nie IQ-Tree jak w dwóch pozostałych pracach. Analizy filogenetyczne wykonano też na różnych zestawach danych w przypadku każdej z trzech prac, natomiast część metodyczna napisana jest w taki sposób, że czytelnik odnosi wrażenie, że w każdej z trzech publikacji analizowany jest taki sam zestaw danych. Wynika to zapewne ze zbyt skrótowego opisu tej części pracy.

Cele przeprowadzonych badań i hipotezy zostały dość jasno określone. Choć sformułowanie pierwszej hipotezy budzi pewne moje wątpliwości "*I) Zróżnicowanie genetyczne pasikoników z grupy *Poecilimon ornatus* jest zgodne z ich zmiennością morfologiczną*". Nie jestem pewien czy zróżnicowanie genetyczne da się w prosty sposób porównać ze zmiennością morfologiczną, a tym samym stwierdzić czy jest ono zgodne czy też niezgodne. Co najwyżej można stwierdzić, że drzewa pokrewieństwa oparte na danych molekularnych i morfologicznych dają podobną czy identyczną topologię. Jednak analizy filogenetycznej w oparciu o dane morfologiczne nie wykonano. Należy też mieć na uwadze, że przeanalizowano jeden marker molekularny i morfologię czterech struktur, tak więc należy być ostrożnym przy wyciąganiu wniosków z tych analiz. Niemniej należy stwierdzić, że w wyniku przeprowadzonych badań udało się potwierdzić dwie pozostałe hipotezy, a mianowicie że pasikoniki z grupy *Poecilimon ornatus* stanowią grupę monofiletyczną, a w obrębie tej grupy kompleks gatunkowy *Poecilimon affinis* również jest taksonem monofiletycznym.

Dodatkowo, w ramach dyskusji nad pracą doktorską chciałbym poznać opinię Doktoranta na temat wyznaczania granic gatunku, zarówno opierając się na danych morfologicznych jak i molekularnych. Nie jest to zadanie trywialne, a w dobie odkrywania gatunków kryptycznych może być dość karkołomne. Zwłaszcza jeżeli mamy do czynienia z gatunkami o ograniczonych możliwościach dyspersji, a ich główną barierą rozrodczą są uwarunkowania geologiczne np. góry. Jaki wpływ na wyznaczenie danego gatunku mogą mieć zjawiska przesuwania się zasięgów występowania czy hybrydyzacji.

Ocena końcowa

Przedstawiony do oceny cykl prac stanowi próbę badań wykorzystujących różne dane (molekularne, morfologiczne) oraz różne rodzaje analiz do rekonstrukcji powiązań filogenetycznych badanej grupy pasikoników. Dla wielu grup blisko spokrewnionych organizmów analiza jedynie danych molekularnych bądź morfologicznych nie daje jednoznacznych odpowiedzi dotyczących ich ewolucji. Stąd też analizy integrujące różne źródła danych zasługują na uznanie.

Przedstawione powyżej uwagi nie wpływają na moją ogólną pozytywną ocenę przedstawionej pracy. Wychodząc z założenia, że podstawowym celem pracy doktorskiej jest opanowanie różnorodnych metod badawczych, stwierdzam że mgr Maciej Kociński udowodnił, że posiadał umiejętności analizy zarówno danych molekularnych, jak i morfologicznych w badaniach filogenetycznych.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgra **Macieja Kocińskiego** jest oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych, spełniając tym samym warunki określone w art. 13 ust. 1 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 z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228 z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana mgra **Macieja Kocińskiego** do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

dr hab. Karol Szawaryn, prof. MiZ