

Formularz recenzji rozprawy doktorskiej

Imię i nazwisko kandydatki: Kinga Walczak

Tytuł rozprawy doktorskiej: Relacje filogenetyczne w obrębie rodziny Muscidae (Diptera): perspektywa oparta na danych filogenomicznych oraz morfologii stadiów preimaginalnych

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Szpila

Promotor zagraniczny: prof. dr Thomas Pape, Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Dania

Recenzent: prof. dr hab. Michał Grabowski

Wartość naukowa rozprawy

Oryginalność badań

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Walczak, jest bez wątpienia oryginalnym i wartościowym osiągnięciem naukowym, łączącym klasyczną taksonomię z nowoczesnymi technikami obrazowania i analizy molekularnej. Głównym elementem nowatorskim rozprawy jest według mnie szerokie zastosowanie konfokalnej laserowej mikroskopii skaningowej (Confocal Laser Scanning Microscopy: CLSM) do szczegółowych badań anatomii szkieletu głowowo-gardzielowego larw muchówek z rodziny Muscidae. Dzięki wykorzystaniu autofluorescencji chityny, Doktorantka zdołała wykonać świetnej jakości dokumentację fotograficzną oraz przeprowadzić rzetelną analizę budowy struktur, które wcześniej były trudne do zaobserwowania, „niewidoczne” lub błędnie interpretowane przy użyciu tradycyjnej mikroskopii świetlnej. Za bardzo ważne odkrycie uznaję udokumentowanie obecności pręcików parastomalnych (*parastomal bars*) u badanych taksonów, co podważa dotychczasowe koncepcje w systematyce Muscidae, wedle których rzekomy brak tych struktur uznawano za cechę synapomorficzną rodziny, podczas gdy w rzeczywistości wynikał on z niedoskonałości metod badawczych stosowanych przez poprzednich badaczy.

O wysokiej wartości rozprawy świadczy również jej aspekt praktyczny i aplikacyjny. Godne uwagi jest to, że Doktorantka opracowała chyba pierwszy w literaturze światowej, bogato ilustrowany klucz do identyfikacji taksonomicznej I i II stadium larwalnego 14 gatunków z rodziny Muscidae o znaczeniu medyczno-sądowym, występujących w zachodniej Palearktyce. Dotychczasowa wiedza na temat wczesnych stadiów rozwojowych tych owadów była szczątkowa, co stanowiło w entomologii sądowej poważną przeszkodę w precyzyjnym określaniu czasu zgonu osoby, której ciało zostało skolonizowane przez larwy muchówek. Cenne są również wyniki analizy filogenetycznej rodzaju *Lispe* na podstawie danych molekularnych uzyskanych metodą RAD-seq oraz sekwencjonowania kilku markerów DNA na platformie Oxford Nanopore Technologies. Porównanie efektywności różnych algorytmów bioinformatycznych do składania genomu w celu uzyskania wysokiej jakości referencyjnego genomu *Lispe tentaculata* stanowi, moim zdaniem, wartościowy wkład metodyczny do genomiki ewolucyjnej Diptera. Podsumowując, badania będące podstawą rozprawy doktorskiej mgr Kingi Walczak charakteryzują się wysokim stopniem innowacyjności, stanowiąc cenny wkład naukowy w systematykę muchówek z rodziny Muscidae.

Wartość naukowa rozdziałów/artykułów

Każdy z czterech powiązanych tematycznie artykułów, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, prezentuje bardzo wysoki poziom merytoryczny. We wszystkich artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką oraz, wspólnie z Andrzejem Grzywaczem,

autorką korespondującą, co bezdyskusyjnie świadczy o Jej wiodącej i kluczowej roli w prowadzeniu badań i tworzeniu publikacji składających się na ocenianą rozprawę.

W **artykule 1**, opublikowanym w *Zoologica Scripta* (Q1 in zoology), Doktorantka rewiduje pozycję systematyczną rodzaju *Alluaudinella*, proponując jego transfer do podrodziny Reinwardtiinae na podstawie unikatowej morfologii larw i sekwencji DNA z czterech loci: dwóch mitochondrialnych (*COI* – podjednostka I oksydazy cytochromu c, *cytB* – cytochrom b) oraz dwóch jądrowych (*Ef-1α* – czynnik elongacyjny 1-alfa, *CAD* – syntetaza karbamoilofosforanowa II), co konkluduje wieloletnią debatę nad filogenezą tej grupy.

Artykuł 2, opublikowany w *Arthropod Systematics & Phylogeny* (Q2 in entomology), dowodzi wysokiej sprawności warsztatowej Doktorantki, która zdołała z sukcesem wykorzystać stuletnie, uszkodzone promieniowaniem UV materiały muzealne larw *Achanthiptera*, identyfikując u nich specyficzne modyfikacje szkieletu głowowo-gardzielowego.

Artykuł 3, opublikowany w *Forensic Science International* (Q1 in medicine, legal), renomowanym czasopiśmie w dziedzinie nauk sądowych i kryminalistyce, ma kluczowe znaczenie dla entomologii sądowej, dostarczając narzędzi diagnostycznych pozwalających na identyfikację gatunkową larw w najwcześniejszych stadiach rozwoju. Publikacja ta wypełnia lukę w wiedzy taksonomicznej, która od dekad zmuszała biegłych do żmudnej hodowli larw do postaci dorosłej w celu ich oznaczenia.

W **artykule 4**, opublikowanym w *Molecular Phylogenetics and Evolution* (Q1 in evolutionary biology), Doktorantka wykazała, że dane uzyskane metodą RAD-seq pozwalają na znacznie bardziej precyzyjne ustalenie relacji filogenetycznych w obrębie rodzaju *Lispe* niż sekwencjonowanie konwencjonalnych markerów molekularnych.

Podsumowując, każdy z artykułów stanowi zamkniętą całość o dużej wartości naukowej, a ich dobór i kolejność prezentacji w rozprawie ukazują logiczny rozwój myśli naukowej Doktorantki, od analizy cech morfologicznych po zaawansowane badania genomowe. Wartość tych prac potwierdza również fakt, że korygują one błędy uznanych badaczy w zakresie systematyki Muscidae (np. Petera Skidmore’a czy Mfony Ekanem), co świadczy o odwadze formułowania krytycznych wniosków i kwestionowania autorytetów, co jest pożądaną cechą u każdego badacza.

Wartość merytoryczna rozprawy

Według mojej oceny, wartość merytoryczna rozprawy doktorskiej mgr Kingi Walczak jest imponująca i nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka wykazuje się doskonałą umiejętnością wprowadzenia w skomplikowaną tematykę systematyki i filogenezy Muscidae, identyfikując luki w wiedzy zawartej w literaturze przedmiotu i sprzeczności między danymi morfologicznymi a molekularnymi. Hipotezy badawcze zostały sformułowane precyzyjnie i dobrze umotywowane, koncentrując się na niedocenianym dotąd znaczeniu stadiów przedimaginalnych jako źródła cech filogenetycznych w filogenezie Muscidae. Dobór metod badawczych jest moim zdaniem optymalny i świadczy o biegłości kandydatki w metodyce nowoczesnych badań taksonomicznych. Połączenie mikroskopii świetlnej, skaningowej (SEM) i konfokalnej (CLSM) pozwoliło na uzyskanie bardzo dobrej jakości wyjściowej dokumentacji morfologicznej. Doceniam również drobne ale bardzo istotne szczegóły związane z preparatyką, np. optymalizację czasu maceracji okazów w KOH w celu zachowania delikatnych sklerytów larwalnych.

Analiza filogenetyczna została przeprowadzona właściwie, z wykorzystaniem ugruntowanych narzędzi bioinformatycznych, takich jak wnioskowanie bayesowskie oraz metoda *maximum likelihood*. Doktorantka w sposób kompetentny interpretuje wyniki na tle literatury światowej, nie unikając konfrontacji z wcześniejszymi opisami, które punktuje za fragmentaryczność lub błędy wynikające z ograniczeń metodycznych i technicznych. Wykazanie, że morfologia larw z podrodziny Reinwardtiinae oraz tych z rodzaju *Alluaudinella* jest bardzo podobna, znajduje uzasadnienie w danych molekularnych i potwierdza konieczność stosowania integratywnych metod w taksonomii muchówek. Wnioski

wyciągnięte z badań są logiczne i dobrze uzasadnione przez Doktorantkę. Praca mgr Walczak świetnie wpisuje się w nowoczesne integratywne podejście do systematyki stawonogów, gdzie drobiazgowa analiza struktur morfo-anatomicznych współgra z zaawansowanymi metodami genetycznymi i genomicznymi.

Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa charakteryzuje się wzorową poprawnością redakcyjną i wysoką estetyką. Układ pracy jest spójny i logiczny – po obszernym wstępie teoretycznym, w którym Doktorantka nakreśliła kontekst ewolucyjny i systematyczny rodziny Muscidae, zaprezentowane są cele pracy, a następnie cykl czterech artykułów naukowych, uzupełniony o syntezę wyników i ogólną dyskusję. Styl pisania jest klarowny, precyzyjny i cechuje się wysoką kulturą języka naukowego. Doktorantka z dużą swobodą operuje specjalistyczną terminologią, zarówno w języku polskim, jak i angielskim, co jest szczególnie istotne w szczegółowych opisach morfologii larw.

Najsilniejszą stroną warstwy wizualnej rozprawy są, moim zdaniem, ilustracje. Mikrofotografie wykonane techniką CLSM i SEM są doskonałej jakości, a ich odpowiednie przetworzenie, np. projekcje o maksymalnej intensywności (MIP) oraz wizualizacje 3D, pozwala na wnikliwą analizę struktur anatomicznych. Tablice prezentujące szkielety głowowo-gardzielowe larw różnych gatunków są czytelne i doskonale uzupełnione o precyzyjne rysunki, co podnosi wartość użytkową rozprawy. Drzewa filogenetyczne są klarownie zaprezentowane, co ułatwia śledzenie skomplikowanych relacji pokrewieństw i układu taksonomicznego. Bibliografia jest obszerna, aktualna i obejmuje kluczowe pozycje z zakresu dipterologii, od prac klasycznych po najnowsze doniesienia z zakresu filogenomiki. Brak uchybień edytorskich oraz wysoka dbałość o detale w prezentacji danych sprawiają, że rozprawę czyta się z przyjemnością, co nie jest oczywiste biorąc pod uwagę skomplikowane zagadnienia taksonomiczne, których dotyczy.

Uwagi krytyczne

W analizie dotyczącej rodzaju *Alluaudinella* i jego przeniesienia do podrodziny Reinwardtiinae w **artykule 1**, Doktorantka przyznaje, że wsparcia statystyczne niektórych węzłów w drzewach filogenetycznych (szczególnie zrekonstruowanych w RAxML) były stosunkowo niskie. Przykładowo, wsparcie *bootstrap* dla kładu (*Atherigoniinae* + (*Alluaudinella* + *Cyrtoneuropsis*)) wynosiło jedynie 27%. Mimo to, na podstawie przesłanek morfologicznych dotyczących stadiów larwalnych, Doktorantka zaproponowała radykalną rewizję taksonomiczną. Jako recenzentowi, przychodzi mi do głowy prowokacyjne pytanie: czy w sytuacji tak wyraźnej rozbieżności między słabym sygnałem molekularnym a silnym sygnałem morfologicznym, przyznanie priorytetu cechom morfologicznym nie jest powrotem do krytykowanego w dzisiejszych czasach subiektywizmu taksonomicznego? Dlaczego Doktorantka zdecydowała się już teraz na formalną rewizję? Czy nie należałoby wstrzymać się z taką decyzją do czasu uzyskania pełniejszych danych molekularnych (np. genomowych)?

W **artykule 2**, Doktorantka koncentruje się na wykorzystaniu CLSM do obrazowania stuletnich larw *Achanthiptera*, które uległy uszkodzeniu pod wpływem promieniowania UV twierdząc, że metoda ta pozwoliła „zobaczyć niewidoczne”. Istnieje jednak ryzyko, że autofluorescencja resztkowa w tak starym i uszkodzonym materiale może generować artefakty lub zniekształcać obraz subtelnych struktur, takich jak pręciki parastomalne czy skleryty dodatkowe. W jaki sposób wyeliminowano ryzyko interpretacji uszkodzeń mechanicznych chityny jako nowych cech morfologicznych? Czy przeprowadzono testy porównawcze, np. na świeżym materiale spokrewnionych gatunków, aby potwierdzić, że specyficzne modyfikacje szkieletu głowowo-gardzielowego larw *Achanthiptera* (np. *dome-shaped anterior rod*) nie są wynikiem procesów degradacyjnych i kurczenia się tkanek podczas wieloletniego przechowywania w postaci suchych preparatów?

Opracowany w **artykule 3** klucz do identyfikacji I i II stadium larwalnego gatunków z rodziny Muscidae istotnych dla entomologii sądowej jest osiągnięciem imponującym, jednak opiera się on w dużej mierze

na cechach szkieletu głowowo-gardzielowego widocznych dzięki CLSM. Autorka wspomina, że klucz może być używany przy użyciu mikroskopii świetlnej, ale przyznaje też, że wiele cech jest wówczas trudnych do zaobserwowania i właściwego zinterpretowania. W praktyce kryminalistycznej, biegli chyba dość rzadko mają dostęp do mikroskopów konfokalnych. Czy w związku z tym wartość aplikacyjna tego narzędzia nie jest ograniczona głównie do dobrze wyposażonych specjalistycznych laboratoriów akademickich? Czy Doktorantka nie uważa, że cechy morfologiczne, uznane przez nią za „jedynie wspierające”, mogłyby zostać lepiej wykorzystane w celu stworzenia bardziej praktycznego narzędzia dla entomologów sądowych pracujących w terenie?

W **artykule 4**, analizie poddano 49 gatunków z rodzaju *Lispe*. Choć jest to liczba znacząca, stanowi ona mniej niż 1/3 wszystkich opisanych (ok. 170-180 w zależności od źródeł) gatunków z tego rodzaju. Doktorantka zauważa, że pozycja taksonomiczna niektórych grup gatunków (np. *pumila*, *pygmaea*, *leucospila*) pozostaje niepewna. Zatem, czy przy tak dużej liczbie gatunków, które nie zostały włączone do badań, wnioski dotyczące monofiletyczności poszczególnych grup gatunków nie są przedwczesne?. Jak gęstsze próbkowanie gatunków mogłoby wpłynąć na stabilność topologii drzewa, szczególnie w kontekście kładów A i B, gdzie różnice w topologii między drzewami *RAXML* i *BPP* są najbardziej widoczne? Czy genom referencyjny *Lispe tentaculata* jest wystarczająco reprezentatywny dla tak zróżnicowanego rodzaju?

Ponadto, głównym założeniem rozprawy, silnie wyeksponowanym w tytule i wstępie, jest wykorzystanie morfologii stadiów przedimaginalnych jako kluczowego źródła fenotypowych danych filogenetycznych. Tymczasem w **artykule 4**, dotyczącym rodzaju *Lispe* i stanowiącym najobszerniejszą część molekularną rozprawy, dane morfologiczne larw zostały całkowicie pominięte. Autorka argumentuje to brakiem dostępności materiału i niedostatecznymi opisami literaturowymi. Z taksonomicznego punktu widzenia powstaje pytanie, które pozostaje bez odpowiedzi: w jakim stopniu wnioski dotyczące filogenezy rodzaju *Lispe* oparte wyłącznie na danych molekularnych są spójne z morfologią larw? Czy i w jaki sposób brak danych morfologicznych może upośledzać poprawność wnioskowania, którą miało przynieść podejście integratywne deklarowane w tytule rozprawy? Jak Doktorantka ocenia ryzyko, że zrekonstruowane relacje filogenetyczne nie znajdą odzwierciedlenia w morfologii larw ze względu na potencjalne homoplazje wynikające z obligatoryjnie drapieżnego trybu życia larw tych muchówek?

Powyższe uwagi mają oczywiście charakter dyskusyjny i nie obniżają mojej ogólnej, bardzo wysokiej oceny ocenianej rozprawy doktorskiej. Stanowią one wręcz dowód na to, że rozprawa mgr Kingi Walczak prowokuje do nowych ważnych pytań badawczych i otwiera nowe perspektywy w badaniach nad niezwykle różnorodną i trudną taksonomicznie grupą owadów, jaką są muchówki.

Ocena końcowa

Podsumowując wszystko co napisałem powyżej stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Kingi Walczak jest dziełem dojrzałym, nowatorskim naukowo i wnoszącym istotny wkład do światowej entomologii. Moim zdaniem, Doktorantka udowodniła, że nowoczesna taksonomia, integrująca metody molekularne i zaawansowane techniki obrazowania, takie jak np. CLSM, daje realną szansę na weryfikację dotychczasowych podziałów systematycznych i pomaga rozstrzygnąć wieloletnie kontrowersje taksonomiczne w obrębie Diptera. Ponadto, rozprawa z powodzeniem łączy badania podstawowe z konkretnym potencjałem aplikacyjnym w kryminalistyce i dowodzi, że mgr Kinga Walczak, poza biegłością w stosowaniu metod molekularnych i bioinformatycznych, charakteryzuje się również cierpliwością i precyzją niezbędną w badaniach morfologicznych. Wreszcie, opublikowanie wyników badań realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej w renomowanych czasopismach naukowych jest najlepszym świadectwem rangi jej badań oraz dojrzałości naukowej, mimo wczesnego etapu kariery.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Kingi Walczak spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce

(Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Kingi Walczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, co uzasadniam następująco.

Według mnie, za przyznaniem wyróżnienia przemawia przede wszystkim bardzo wysoka jakość naukowa rozprawy potwierdzona publikacjami w renomowanych czasopismach naukowych. Co kluczowe, we wszystkich opublikowanych artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką oraz autorką korespondującą, co bezdyskusyjnie świadczy o Jej wiodącej roli w prowadzeniu badań i tworzeniu publikacji składających się na rozprawę doktorską. Oceniana rozprawa stanowi, w mojej ocenie, istotny wkład w rozwój dipterologii. Doktorantka zweryfikowała dotychczasową diagnozę morfologiczną rodziny Muscidae, korygując utrwalone w literaturze przedmiotu definicje taksonomiczne. Świadczy to, według mnie, o odwadze formułowania krytycznych wniosków i kwestionowania autorytetów, co jest cenną i raczej rzadko spotykaną cechą i młodych badaczy na tym etapie kariery. Kluczowym osiągnięciem o charakterze aplikacyjnym jest opracowanie pierwszego klucza do identyfikacji wczesnych stadiów larwalnych muchówek o znaczeniu kryminalistycznym. Narzędzie to wypełnia istotną lukę w entomologii sądowej, umożliwiając precyzyjną diagnostykę materiału dowodowego. Biegłość w stosowaniu zaawansowanego i zróżnicowanego aparatu badawczego oraz rzetelność w rewizji systematyki trudnych taksonów jednoznacznie potwierdzają wysokie kompetencje Doktorantki i również przekonują mnie, że jej rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie.