

**Załącznik 2**

**Autoreferat przedstawiający opis osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) oraz pozostałe zainteresowania i osiągnięcia naukowe**

**1. Imię i nazwisko:**

Igor Jerzy Chybicki

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania:**

Magister – kierunek: Biologia, specjalność: biologia środowiskowa, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk i Ziemi, Toruń, 2001.

Doktor nauk biologicznych – dyscyplina: Biologia, Instytut Dendrologii, Polska Akademia Nauk, Kórnik, 2006 (Tytuł dysertacji: „Przeptyw genów w naturalnym odnowieniu sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) oraz dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) i bezszypułkowego (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.)”)

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych**

2001-2002 – starszy technik (Akademia Bydgoska im. Kazimierza Wielkiego, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska)

2002-2006 – asystent (Akademia Bydgoska im. Kazimierza Wielkiego / Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska)

2006-obecnie – adiunkt (Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biologii Eksperymentalnej)

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Struktura genetyczna naturalnie odnawiających się populacji drzew leśnych**

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl 6 publikacji:

[1] **Chybicki IJ**, Burczyk J (2009) Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity* 100:106-113 (IF: 2.052)

[2] **Chybicki IJ**, Trojankiewicz M, Oleksa A, Działuk A, Burczyk J (2009) Isolation-by-distance within naturally established populations of European beech (*Fagus sylvatica*). *Botany* (dawniej: *Canadian Journal of Botany*) 87:791-798 (IF: 0.904)

[3] **Chybicki IJ**, Oleksa A, Burczyk J (2011) Increased inbreeding and strong kinship structure in *Taxus baccata* estimated from both AFLP and SSR data. *Heredity* 107:589-600 (IF: 4.597)

[4] **Chybicki IJ**, Oleksa A, Kowalkowska K, Burczyk J (2012) Genetic evidence of reproductive isolation in a remote enclave of *Quercus pubescens* in presence of cross-fertile species. *Plant Systematics and Evolution* 298:1045–1056 (IF: 1.312)

[5] **Chybicki IJ**, Oleksa A, Kowalkowska K (2012) Variable rates of random genetic drift in protected populations of English yew: implications for gene pool conservation. *Conservation Genetics* 13:899-911 (IF: 2.183)

[6] Dering M, **Chybicki IJ** (2012) Assessment of genetic diversity in two-species oak seed stands and their progeny populations. *Scandinavian Journal of Forest Research* 27:2-9 (1.065)

Łączna liczba punktów Impact Factor wymienionych publikacji (zgodnie z rokiem publikacji) wynosi 12,113.

b) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

## Wstęp

Drzewa stanowią jeden z podstawowych składników ekosystemów lądowych. Wiele gatunków zalicza się do grupy tzw. gatunków podstawowych (ang. *foundation species*; Ellison i in. 2005), tj. gatunków o fundamentalnym znaczeniu dla struktury i funkcjonowania danego ekosystemu (Dayton i in. 1972). Wynika to z faktu, że drzewa są długowieczne i charakteryzują się dużymi rozmiarami, przez co tworzą stabilne, wysoce produktywne i duże powierzchniowo populacje. Jednocześnie drzewa są roślinami o trudnym do przecenienia znaczeniu gospodarczym.

Zaproponowane ostatnio koncepcje z pogranicza ekologii i genetyki sugerują istnienie związku pomiędzy strukturą genetyczną gatunków podstawowych dla danych ekosystemów a różnorodnością biologiczną tych ekosystemów (Bangert i in. 2008, Whitham i in. 2010). Związek ten, w myśl wspomnianej koncepcji, opiera się na tzw. skalowaniu genetycznym, tj. ekspresji genów wpływających na cechy gatunku podstawowego, które z kolei regulują ekologiczne właściwości ekosystemu na różnych poziomach organizacji (Bangert i in. 2008). Podstawą skalowania genetycznego jest istnienie zmienności genetycznej u gatunku podstawowego. Ponadto, skalowanie genetyczne powinno zachodzić szczególnie wyraźnie w biocenozach zbliżonych do naturalnych, gdzie relacje pomiędzy gatunkiem podstawowym a innymi komponentami biocenozy odzwierciedlają wzajemne zależności międzygatunkowe ukształtowane w toku ewolucji. W przypadku drzew leśnych o naturalności drzewostanu w dużym stopniu decyduje naturalny sposób odnawiania populacji, który prowadzi do ukształtowania się naturalnej struktury genetycznej populacji.

W ogólnym znaczeniu pojęcie *struktura genetyczna* populacji odnosi się do kompleksowego ujęcia właściwości genetycznych populacji, włączając różnorodność genetyczną, polimorfizm, wsobność, pokrewieństwo, a także związek tych parametrów z lokalizacją oraz czynnikami ekologicznymi. Niekiedy strukturą genetyczną populacji nazywa się sposób uporządkowania zmienności genetycznej. W tym ostatnim znaczeniu termin ten używany jest często w odniesieniu do hierarchicznego uporządkowania zmienności genetycznej. Ograniczając rozważania do zmienności neutralnej, której poświęcony jest niniejszy cykl publikacji, do podstawowych czynników struktury genetycznej populacji należą efektywna wielkość populacji oraz system kojarzenia. Efektywna wielkość populacji determinuje natężenie dryfu genetycznego, tj. procesu losowych zmian częstości alleli w populacji. System kojarzenia osobników wiąże się ze zjawiskiem wsobności lub, ogólnie ujmując, sposobem uporządkowania genów w genotypach. W przypadku drzew leśnych,

podobnie jak i innych roślin, wielkość populacji oraz system kojarzenia wiążą się z zakresem dyspersji (Epperson 2003). W przypadku nieznacznej dyspersji nasion populacje wykazują tendencję do skupiania się osobników spokrewnionych. Efekt ten może ulegać dalszemu nasileniu, jeżeli kojarzenie następuje między osobnikami z najbliższego sąsiedztwa (Turner i in. 1982). Wynika to z faktu, że u roślin całkowity zakres dyspersji genów jest wypadkową dyspersji nasion i pyłku (Crawford 1984).

Struktura genetyczna populacji drzew jest zagadnieniem o bogatej literaturze. Wiele uwagi poświęcono dotychczas zmienności genetycznej, zróżnicowaniu genetycznemu, systemom kojarzenia, filogenetyce, a obecnie również zmienności adaptacyjnej. Niemniej, charakterystyka struktury genetycznej w skali lokalnej, między-osobniczej, stanowi przykład problemu badawczego cieszącego się do niedawna stosunkowo niewielkim zainteresowaniem. Może być to związane między innymi z faktem, że wiele uwagi poświęcano dotychczas hodowlanym aspektom genetyki populacyjnej drzew, co z kolei wiązało się z wyborem do badań populacji reprezentujących uprawy leśne. Ze względu na silną presję człowieka, w tym szczególnie sposób zakładania drzewostanów poprzez nasadzenia, typowe uprawy leśne nie nadają się do badań naturalnej struktury genetycznej (tj. wsobności, struktury przestrzennej pokrewieństwa) na poziomie pojedynczych osobników. Ponadto, wzrost zainteresowania wewnątrz-populacyjną strukturą genetyczną drzew (i innych roślin) jest niewątpliwie efektem rozwoju metod statystycznych, który miał miejsce w ostatnich latach. Dotyczy to zwłaszcza analizy przestrzennej struktury pokrewieństwa (przestrzennej struktury genetycznej) (np. Rousset 2000; Vekemans i Hardy 2004).

Kształtowanie wewnątrz-populacyjnej struktury genetycznej w przypadku drzew wiatropylnych rzadko zachodzi w izolacji od innych populacji. Nawet w przypadku silnej fragmentacji, przepływ genów między populacjami utrzymuje się przeważnie dzięki dalekiej dyspersji pyłku. Uważa się, że dzięki temu populacje drzew wiatropylnych charakteryzują się wysokim poziomem wewnątrz-populacyjnej zmienności genetycznej (Bacles i Jump 2011). Kompletna izolacja populacji wydaje się zjawiskiem unikalnym. Niemniej, w takich warunkach system kojarzenia, dryf genetyczny i inne procesy kształtujące neutralną zmienność genetyczną będą oddziaływać znacznie intensywniej, niż w warunkach sieci powiązanych populacji. Jednym z oczekiwanych efektów izolacji jest spadek efektywnej wielkości populacji (Waples i England 2011).

Poza zagadnieniami o znaczeniu podstawowym, znajomość struktury genetycznej ma pewne implikacje również w naukach stosowanych, takich jak biologia konserwatorska czy hodowla lasu. W obu przypadkach jednym z głównych celów jest zachowanie puli genowej populacji. W biologii konserwatorskiej do podstawowych kryteriów oceny populacji pod kątem zagrożenia wyginięciem zalicza się liczebność populacji (Frankham 2003). Im mniej liczna jest dana populacja, tym w większym stopniu podlega ona fluktuacjom demograficznym i genetycznym, napędzając tzw. wir wymierania (ang. *extinction vortex*). Struktura genetyczna populacji powinna korespondować z jej liczebnością. Niemniej, w przypadku drzew leśnych wspomniana reguła nie została dotychczas zweryfikowana empirycznie w stopniu umożliwiającym szersze uogólnienia. Wykazano natomiast, że fragmentacja populacji drzew stosunkowo rzadko powoduje oczekiwane skutki genetyczne (Kramer i in. 2008). Podobnie, brakuje jednoznacznych informacji

o wpływie naturalnego odnawiania lasu na strukturę genetyczną upraw leśnych, szczególnie w porównaniu z odnawianiem sztucznym.

### **Cel prac składających się na osiągnięcie naukowe**

Celem prac składających się na osiągnięcie naukowe było określenie struktury genetycznej naturalnie odnawiających się populacji drzew leśnych. Przede wszystkim, celem było określenie struktury pokrewieństwa i poziomu wsobności oraz wnioskowanie o parametrach demograficznych na podstawie struktury genetycznej, w tym o efektywnej wielkości populacji. Ponadto, celem cyklu badań było określenie relacji między stopniem izolacji populacji a jej efektywną wielkością.

Do badań wybrano następujące gatunki drzew: buk zwyczajny, cis pospolity, dąb omszony oraz dąb szypułkowy i bezszypułkowy. Wymienione gatunki należą do drzew wiatropylnych, charakteryzujących się zbliżoną strategią dyspersji nasion. Wspomniana strategia dyspersji nasion polega na łączeniu biernej dyspersji barochorycznej o niewielkim zasięgu z daleką dyspersją przy udziale ptaków lub ssaków.

Badania przeprowadzono w ramach populacji stanowiących kontrastujące przykłady stopnia izolacji. Przykładem populacji o względnie niskim poziomie izolacji są populacje buka zwyczajnego. Z kolei cis pospolity charakteryzuje się, relatywnie do pozostałych badanych gatunków, umiarkowanym poziomem fragmentacji populacji. Stanowiska cisa są rozproszone w całym zasięgu występowania tego gatunku tworząc w ten sposób luźną sieć populacji. W zestawieniu z pozostałymi gatunkami kontrastującym przykładem jest dąb omszony, reprezentowany przez unikalną populację w rezerwacie Bielinek nad Odrą, która znajduje się daleko poza głównym obszarem występowania tego gatunku.

### **Omówienie prac składających się na osiągnięcie naukowe**

[1] Chybicki IJ, Burczyk J (2009) Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. *Journal of Heredity* 100:106-113.

Jądrowe sekwencje mikrosatelitarne (SSR, ang. *Simple Sequence Repeats*) są typem markera genetycznego obecnie powszechnie wykorzystywanym w badaniach z zakresu genetyki populacji. W powszechnej opinii uznawane są za markery o charakterze kodominacyjnym, co oznacza, że u organizmów diploidalnych genotyp heterozygotyczny będzie zawsze rozpoznawalny poprzez identyfikację odmiennych (allelicznych) fragmentów DNA pochodzących z obu chromosomów homologicznych. Niemniej, na skutek mutacji w regionach wiążących starterowe oligonukleotydy wykorzystywane w reakcji PCR, możliwe jest zahamowanie procesu amplifikacji, co w rezultacie prowadzi do niemożności określenia danego allelu, co w literaturze określane jest mianem wystąpienia tzw. alleli zerowych (niemych; ang. *null alleles*). Z punktu widzenia interpretacji genotypu, allele nieme traktowane mogą być identycznie jak allele recesywne genu i przy założeniu kodominacyjnego charakteru markerów SSR powodują błędną interpretację genotypów heterozygotycznych z allelem *null* jako genotypów homozygotycznych. W konsekwencji heterozygotyczność osobnicza czy populacyjna może być poważnie niedoszacowana, wpływając na inne statystyki zależne od częstości genotypów. Jedną z takich statystyk

jest klasyczny współczynnik wsobności ( $F_{IS}$ ). Problem istnienia alleli zerowych był częstym przedmiotem badań. W wielu wcześniejszych pracach, częstość alleli zerowych określano przy założeniu, że dana populacja znajduje się w stanie równowagi genetycznej. Jednak w populacjach o wysokiej wsobności założenia takie powodowały przeszacowanie częstości alleli zerowych.

Prowadzenie badań z zakresu oceny wsobności populacji drzew leśnych za pośrednictwem markerów mikrosatelitarnych wymagało opracowania odpowiedniej metody statystycznej uwzględniającej możliwość wystąpienia alleli *null*. W pracy [1] zaproponowano metodę statystyczną umożliwiającą ocenę  $F_{IS}$ , która jest niewrażliwa na obecność alleli *null*. Pozwala ona również na oszacowanie częstości alleli *null* i określenie istotności ich występowania w sensie statystycznym. Metoda opiera się na założeniu, że wsobność jest cechą wspólną dla wszystkich loci, co jest uzasadnione, gdyż w przypadku loci neutralnych (względem doboru naturalnego) system kojarzenia wpływa identycznie na wszystkie loci genomu jądrowego. Warto dodać, że w przypadku niekodujących sekwencji mikrosatelitarnych nie stwierdzono dotychczas możliwości bezpośredniego oddziaływania doboru, choć istnieje możliwość wystąpienia efektu „podwożenia” (ang. *hitch-hiking*). Opierając się na powyższym założeniu, w pracy [1] opracowano i przetestowano estymator największej wiarygodności zestawu parametrów (tj. częstości alleli amplifikujących, częstości alleli *null* oraz  $F_{IS}$ ) umożliwiający obliczanie średniego wewnątrzpopulacyjnego współczynnika wsobności  $F_{IS}$  (metoda PIM, patrz [1]). Ponadto, skorygowano i przetestowano bayesowski estymator osobniczych współczynników wsobności (metoda IMM, patrz [1]), zaproponowany przez Vogla i in. (2002) i oparty na zbliżonych założeniach. Badania symulacyjne wykazały, że zarówno PIM jak i IMM są asymptotycznie zgodnymi estymatorami, przy czym zgodność wzrasta wraz ze wzrostem liczby markerów SSR. Symulacje pozwoliły również wykazać, że przy 10 markerach oraz liczebności próby 50 osobników istnieje możliwość bardzo precyzyjnej oceny zarówno częstości alleli jak i poziomu wsobności w populacji. Opracowaną metodę wykorzystano do oceny wsobności i częstości alleli *null* w przykładowej populacji buka zwyczajnego. Poziom wsobności badanej populacji był nieistotny statystycznie, jednak w przypadku trzech loci stwierdzono częstości alleli *null* istotnie różne od 0. Metody statystyczne zaimplementowałem w programie komputerowym INEST, udostępnionym bezpłatnie dla osób zainteresowanych ([www.ukw.edu.pl/pracownicy/strona/igor\\_chybicki/software\\_ukw](http://www.ukw.edu.pl/pracownicy/strona/igor_chybicki/software_ukw)).

[2] **Chybicki IJ**, Trojankiewicz M, Oleksa A, Działuk A, Burczyk J (2009) Isolation-by-distance within naturally established populations of European beech (*Fagus sylvatica*). *Botany* 87:791-798

Praca [2] podejmuje zagadnienie lokalnej przestrzennej struktury genetycznej oraz struktury wsobności w populacjach buka zwyczajnego. Mimo że buk zwyczajny był niejednokrotnie obiektem badań genetycznych, wiele wątpliwości budzą dotychczasowe wyniki dotyczące wysokiego poziomu wsobności w populacjach tego gatunku. Szczególnie wysokie wartości wsobności, sięgające nawet 0,2, notowano przy użyciu markerów SSR (Vornam et al. 2004, Jump i Penuelas 2007). Buk zwyczajny jest gatunkiem wiatropylnym, o potwierdzonej możliwości samozapłodnienia (Nielsen i Schaffalitzky De Muckadell 1954). Jednakże, jak wynika z nielicznych



opracowań, w warunkach naturalnych kojarzy się on niemal wyłącznie w drodze zapłodnienia krzyżowego. Rozdźwięk między wynikami analiz systemu kojarzenia a pomiarem struktury genetycznej populacji spotykanymi w literaturze może wynikać z kojarzenia w pokrewieństwie (innego niż samozapłodnienie). W przypadku buka zwyczajnego kojarzenie krewniacze może następować w efekcie rozwoju przestrzennej struktury rodowej. Dyspersja nasion buka jest wyraźnie ograniczona, co powoduje, że potomstwo jednego drzewa (pół-rodzeństwo) rozwija się w bezpośrednim sąsiedztwie, zwiększając szansę wzajemnego kojarzenia po osiągnięciu dojrzałości. Czynnikiem sprzyjającym wsobności jest w tym przypadku ograniczona odległość kojarzenia (efektywnej dyspersji pyłku), która prowadzi do kojarzenia w ramach grup rodowych. Wstępne wyniki, zawarte w pracy [1], pozwoliły sformułować hipotezę badawczą, że wysoka wsobność wykazywana w populacjach buka zwyczajnego przez innych autorów jest prawdopodobnie artefaktem wynikającym z obecności alleli niemych. Stąd celem pracy [2] było określenie struktury wsobności (tj. rozkładu indywidualnych współczynników wsobności) oraz struktury pokrewieństwa w ramach populacji powstałych w drodze naturalnego odnowienia. Dodatkowo, celem pracy było sformułowanie wniosków dotyczących skali dyspersji genów na podstawie analizy przestrzennej struktury genetycznej.

Badania przeprowadzono na dwóch stanowiskach, zlokalizowanych na Pomorzu i reprezentujących podobny typ lasu bukowego. Jako markery genetyczne wykorzystano zestaw 9 jądrowych sekwencji mikrosatelitarnych, dla których opracowano i zoptymalizowano reakcję multiplex-PCR. Badania wykazały, że wsobność populacji kształtuje się na poziomie 0,02-0,04, natomiast obserwowany nadmiar homozygot wywołany jest przede wszystkim obecnością alleli zerowych. Wykazano także, że rozkład wsobności osobniczej ma charakter L-kształtny, co oznacza, że większość osobników charakteryzuje się zerowym poziomem wsobności, a tylko nieliczne osobniki charakteryzują się poziomem wsobności wskazującym na kojarzenie pomiędzy osobnikami blisko spokrewnionymi lub też poprzez samozapłodnienie. Stwierdzono także istotną różnicę w poziomie wsobności między dwoma badanymi populacjami. Bliższa analiza wsobności indywidualnej pozwoliła stwierdzić, że różnica ta jest wynikiem różnic w poziomie samozapłodnienia, podczas gdy poziom wsobności oburodzicielskiej jest zbliżony w obu populacjach. Stwierdzono także, że przestrzenna struktura pokrewieństwa jest zgodna z teoretycznym modelem log-liniowym, oczekiwanym przy założeniu zjawiska izolacji przez odległość Wrighta (Rousset 2000). Na tej podstawie wykazano, że efektywna wielkość sąsiedztwa Wrighta (stanowiąca miarę efektywnej wielkości populacji) wynosi 150 osobników. Dzięki szczegółowym analizom struktury pokrewieństwa stwierdzono, że stosunek skali efektywnej dyspersji nasion do pyłku mieści się w zakresie od 1:10 do 1:100. Tym samym wyniki potwierdzają przewidywania dla badanego gatunku. Przeprowadzone badania pozwoliły sformułować następujące wnioski: i) wsobność w populacjach buka jest niewielka, a uzyskane wyniki są zgodne z bezpośrednimi badaniami systemu kojarzenia, ii) silna przestrzenna struktura genetyczna powstaje przede wszystkim na skutek niewielkiej dyspersji nasion, iii) skala dyspersji pyłku jest znaczna, przez co możliwość kojarzenia się osobników spokrewnionych, a tym samym rozwoju wsobności oburodzicielskiej, jest ograniczona.

[3] **Chybicki IJ**, Oleksa A, Burczyk J (2011) Increased inbreeding and strong kinship structure in *Taxus baccata* estimated from both AFLP and SSR data. *Heredity* 107:589-600

Praca [3] dotyczy struktury genetycznej populacji w przypadku fragmentacji metapopulacji. Jako organizm modelowy posłużył cis pospolity, który naturalnie występuje w stosunkowo nielicznych, wyraźnie izolowanych enklawach. Cis pospolity jest gatunkiem rozdzielnopłciowym i charakteryzuje się wiatropylnością. Jego nasiona, zamknięte w mięsistych osnówkach są chętnie zjadane przez ptaki, co stwarza możliwość dyspersji nasion na znaczne odległości. Jednakże, duża część nasion opada bezpośrednio pod drzewem, przez co całkowita skala dyspersji nasion może być ograniczona. W warunkach typowych dla obszarów Polski cis pospolity wchodzi razem z innymi niskimi drzewami i krzewami w skład drugiego piętra lasu. Dlatego też pyłek cisa, choć stosunkowo lekki, nie podlega tak łatwo silnym prądom powietrza, jak ma to miejsce w przypadku drzew górnego piętra lasu, takich jak sosna czy dąb. Badania palinologiczne podjęte w rezerwacie w Wierzchlesie oparte na liczeniu pyłku w pułapkach wykazały, że ilość ziaren pyłku maleje bardzo szybko wraz ze wzrostem odległości od osobników męskich (Noryśkiewicz 2006). Przez to uznać należy, że dyspersja pyłku u tego gatunku może być ograniczona zarówno między populacjami (przez fakt izolacji), ale również w skali lokalnej.

Do tej pory badania z zakresu genetyki populacji cisa koncentrowały się głównie na zróżnicowaniu genetycznym między populacjami. Wykazano między innymi obecność silnej struktury genetycznej na poziomie metapopulacji. Stwierdzono, że poziom zmienności genetycznej maleje wraz z oddalaniem się od centrum zasięgu naturalnego występowania gatunku. Z kolei wiedza na temat struktury genetycznej wewnątrz populacji w chwili podjęcia badań była znikoma. W pracy [3] sformułowano następujące hipotezy badawcze: i) istnieje przestrzenna struktura genetyczna pokrewieństwa wynikająca z ograniczonej dyspersji nasion oraz ii) ze względu na możliwe kojarzenie krewniacze w populacjach cisa występuje podwyższona wsobność. Jako teren badań wybrałem dwie populacje ujęte w rezerwat przyrody, zlokalizowane w Polsce północnej („Cisy w Czarnem” i „Cisy Staropolskie” w Wierzchlesie) różniące się znacząco pod względem liczby oraz zagęszczenia osobników. Jako markery genetyczne wykorzystano sekwencje mikrosatelitarne (6 loci) i markery AFLP (126 loci) (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*). Pobocznym zagadnieniem, choć ważnym z punktu widzenia rozwoju metodologii, było opracowanie metody statystycznej umożliwiającej szacowanie poziomu wsobności populacji na podstawie markerów dominujących (takich jak AFLP, RAPD itp.). Metoda została zaimplementowana w programie komputerowym I4A ([www.ukw.edu.pl/pracownicy/strona/igor\\_chybicki/software\\_ukw](http://www.ukw.edu.pl/pracownicy/strona/igor_chybicki/software_ukw)).

Badane populacje charakteryzowały się silną przestrzenną strukturą genetyczną, wskazującą na istnienie struktury rodowej. Dodatnia korelacja genetyczna miała zasięg 50-100 metrów, w zależności od populacji. Oszacowany poziom wsobności był stosunkowo wysoki i mieścił się w zakresie od 0,016 do 0,063. Badania pozwoliły na wykazanie następujących wzorców struktury genetycznej: i) markery AFLP wskazywały na wyższy poziom wsobności populacji niż markery SSR, ii) markery AFLP pokazały silniejszą strukturę przestrzenną niż markery SSR, iii) poziom wsobności i pokrewieństwa był wyższy w populacji o większym



zagęszczeniu, iv) w przypadku populacji w Wierzchlesie, markery AFLP wykazały istnienie dwóch subpopulacji (tj. odrębnych pul genowych). Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że dyspersja genów u cisa zachodzi na niewielką odległość. Ponadto, w skali lokalnej dyspersja genów jest bardziej ograniczona w populacji o większym zagęszczeniu. Od strony metodologicznej, w pracy [3] wykazano, że markery dominujące mogą być z powodzeniem wykorzystane do wnioskowania o wsobności w populacji. Jednakże, ze względu na znacznie mniejszy ładunek informacji zawartej w markerach dominujących, wnioskowanie takie jest możliwe pod warunkiem, że dysponuje się dużą liczbą loci (>100) oraz znaczną liczebnością próby z danej populacji (>100).

[4] **Chybicki IJ**, Oleksa A, Kowalkowska K, Burczyk J (2012) Genetic evidence of reproductive isolation in a remote enclave of *Quercus pubescens* in presence of cross-fertile species. *Plant Systematics and Evolution* 298:1045–1056

Praca [4] podejmuje zagadnienie przebiegu procesów demograficznych w populacji skrajnie izolowanej, tj. znajdującej się poza naturalnym zasięgiem występowania. Jako obiekt modelowy posłużyła populacja dębu omszonego występująca w rezerwacie Bielinek nad Odrą. Dąb omszony jest typowym przedstawicielem flory południowo-europejskiej. Zasięg naturalnego występowania dębu omszonego osiąga północny kres w południowych Niemczech, Austrii, Czechach i Słowacji. Niemniej, w Europie znane są wyspowe populacje tego gatunku sięgające daleko na północ. Do najdalszych enklaw należy populacja w Bielinku. Dotychczasowe badania oparte na cechach morfologicznych liści dowodziły, iż populacja w Bielinku charakteryzuje się pośrednią morfologią między typowym dębem omszonym a dębem bezszypułkowym. Wynik taki interpretowano jako efekt domniemanej introgresji wynikającej z niedoboru pyłku dębu omszonego. Niemniej, ze względu na brak bezpośrednich dowodów na istnienie introgresji, nie można wykluczyć, że pośredni (nietypowy) charakter cech biometrycznych liści może być następstwem efektu założyciela lub też działania doboru naturalnego zachodzącego na skraju niszy ekologicznej. Wobec powyższego podstawowym celem pracy była weryfikacja hipotezy o introgresji. W wyniku badań przeprowadzonych w oparciu o zestaw 14 jądrowych markerów mikrosatelitarnych wykazano, że populacja dębu omszonego w Bielinku jest genetycznie odmienna od lokalnych populacji przedstawicieli rodzaju *Quercus*. Ponadto stwierdzono, że badana populacja charakteryzuje się bardzo małą efektywną liczbą osobników (średnio 31), a także stosunkowo wysokim poziomem wsobności ( $F_{is} = 0,052$ ). Stopień pokrewieństwa między osobnikami był znaczny, sugerując, że kojarzenie w populacji zachodzi w dużym stopniu między osobnikami spokrewnionymi. Wykazano również, że całkowita dyspersja genów, mierzona odległością między osobnikiem rodzicielskim i potomnym, wyniosła średnio 40 metrów. Interesujących wyników dostarczyła bayesowska analiza historii demografii populacji, według której pod względem liczebności obecna populacja stanowi ok. 0,5% populacji wyjściowej, natomiast okres redukcji wielkości populacji rozpoczął się ok. 17 pokoleń temu. Biorąc za średni czas trwania pokolenia okres 200 lat, początek obecnej populacji mógłby przypadać na okres tzw. optimum klimatycznego w czasie Holocenu.

Praca [4] pokazała, że izolacja przestrzenna może prowadzić do znacznej redukcji efektywnej wielkości populacji, przez co może stać się dominującym czynnikiem ewolucyjnym kształtującym strukturę genetyczną populacji. Brak dopływu genów spoza populacji (w tym również brak introgresji) powoduje wzmocnienie efektu ograniczonej dyspersji genów, nawet u gatunku o znacznym potencjale do dalekiej dyspersji pyłku.

[5] **Chybicki IJ**, Oleksa A, Kowalkowska K (2012) Variable rates of random genetic drift in protected populations of English yew: implications for gene pool conservation. *Conservation Genetics* 13:899-911

W dotychczasowych badaniach cisa pospolitego prowadzonych na terenie Alp wykazano, że poziom zmienności genetycznej tego gatunku jest niższy w populacjach charakteryzujących się niewielką liczebnością. Niemniej, w pracy [3] niniejszego cyklu wykazano, że pozornie duża populacja może faktycznie charakteryzować się ukrytą wewnętrzną strukturą genetyczną, przez co efektywna wielkość populacji może być znacznie niższa niż rzeczywista liczba osobników. Wśród innych czynników ograniczających efektywną wielkość populacji cisa wymienić można znaczne dysproporcje liczebności płci, nagłe fluktuacje demograficzne, nierównomierny udział osobników rodzicielskich w tworzenia pokolenia potomnego oraz znaczne wahania stopnia pokrewieństwa między kojarzającymi się osobnikami.

Praca [5] podejmuje zagadnienie wielkości populacji jako predyktora wewnątrz-populacyjnej struktury genetycznej, w tym poziomu polimorfizmu, wsobności oraz pokrewieństwa. Do badań wytypowano 6 populacji cisa pospolitego rozproszonych na terenie Polski. Genotypy osobników (nie mniej niż 60 na populację) określono w oparciu o 5 markerów mikrosatelitarnych. Do szczegółowych celów badań należało określenie poziomu polimorfizmu (bogactwa alleli) oraz rozdziału zmienności allelicznej na komponent wewnątrz- i między-populacyjny, określenie poziomu wsobności, średniego poziomu pokrewieństwa między osobnikami danej populacji oraz (wsobnej) efektywnej wielkości populacji. Celem nadrzędnym badań było zweryfikowanie hipotezy o istnieniu związku między wielkością populacji a wymienionymi komponentami struktury genetycznej. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano istnienie znacznych różnic między badanymi populacjami. Dotyczyły one w szczególności bogactwa alleli, a także w udziale badanych populacji w poszczególnych komponentach całkowitej różnorodności allelicznej (ang. *allelic diversity*). Stwierdzono również znaczne różnice w poziomie wsobności populacji (od 0,02 do 0,12) oraz w poziomie średniego pokrewieństwa (od 0,042 do 0,217). Co ważne, nie stwierdzono związku między rzeczywistą (censusową) wielkością populacji a badanymi parametrami struktury genetycznej. Z drugiej strony wykazano związek parametrów struktury genetycznej (poziomu polimorfizmu, wsobności i pokrewieństwa) z efektywną wielkością populacji. W pracy wykazano, że tempo dryfu genetycznego w izolowanych populacjach cisa pospolitego jest bardzo zmienne i nie powiązane z censusową wielkością populacji, a raczej z innymi czynnikami o charakterze lokalnym. Do takich czynników zaliczyć można jakość siedliska, sposób założenia populacji czy historię demograficzną (znaczne fluktuacje liczebności populacji, w tym *bottleneck*). Wyniki przedstawione w pracy [5] mają także implikacje w zakresie praktyk konserwatorskich. Z omawianej pracy wynika bowiem, że wybór

populacji do celów ochrony zasobów genowych cisa pospolitego, np. produkcji sadzonek do reintrodukcji, dokonany na podstawie cenzusowej wielkości populacji może być dalece mylący. Tym samym praca wskazuje na potrzebę wykorzystania badań genetycznych w celu opracowania i realizacji programów ochrony zasobów genowych cisa oraz innych gatunków o podobnej biologii i podobnym charakterze występowania.

[6] Dering M, **Chybicki IJ** (2012) Assessment of genetic diversity in two-species oak seed stands and their progeny populations. *Scandinavian Journal of Forest Research* 27:2-9

Jednym z celów praktyk hodowli i uprawy lasu jest ochrona zasobów genowych. Uważa się, że zachowywanie wysokiej różnorodności genetycznej umożliwi utrzymywanie potencjału adaptacyjnego populacji. Ma to szczególne znaczenie w obliczu zagrożeń wynikających np. z globalnych zmian klimatu. W przypadku drzew leśnych o znaczeniu gospodarczym utrzymywanie ogólnej zmienności genetycznej na wysokim poziomie jest bardzo pożądane, ponieważ aktualna wiedza o związku między genami a cechami o znaczeniu adaptacyjnym jest nadal niedostateczna. W przypadku tej grupy drzew, utrata zmienności genetycznej może mieć daleko idące negatywne skutki gospodarcze i społeczne, włączając spadek produkcji drewna i zachwianie przyrodniczej funkcji lasów.

Hodowla drzew leśnych polega między innymi na utrzymywaniu wartościowej bazy nasiennej w postaci wyłączonych drzewostanów nasiennych (WDN). Z założenia, pokolenie potomne utworzone na bazie WDN-ów, jako wyselekcjonowane, cechuje się lepszymi genotypami w porównaniu z uprawami gospodarczymi. Niemniej, zakłada się przy tym, że zmienność genetyczna pokolenia rodzicielskiego jest efektywnie przekazywana do pokolenia potomnego. Do naturalnych czynników warunkujących efektywne przekazywanie genów z pokolenia na pokolenie jest system kojarzenia. Niemniej, w przypadku upraw leśnych kluczową rolę odgrywa sposób odnawiania lasu. Odnowienie naturalne bazuje na naturalnym procesie dyspersji pyłku i nasion. Z kolei odnowienie sztuczne (poprzez zakładanie plantacji) wymaga ingerencji człowieka, między innymi przy zbiorze nasion. Teoretycznie, zakładając, że udział osobników rodzicielskich w pokoleniu potomnym jest proporcjonalny do ich płodności (ilości produkowanych nasion), oba sposoby odnawiania powinny prowadzić do zbliżonych efektów hodowlanych. Niemniej, wiedza w tym zakresie jest nadal niepełna.

Celem pracy [6] było określenie, czy zmienność genetyczna wyłączonych drzewostanów nasiennych dębu szypułkowego i bezszypułkowego (pokolenie rodzicielskie) jest efektywnie przekazywana do pokolenia potomnego. W szczególności praca miała na celu porównanie zmienności genetycznej upraw plantacyjnych oraz naturalnego odnowienia w drzewostanach nasiennych oraz określenia zmienności parametrów struktury genetycznej w różnych latach dużego urodzaju (tzw. latach nasiennych). Wykorzystując markery mikrosatelitarne wykazano, że różnice w strukturze genetycznej między pokoleniem rodzicielskim i potomnym są nieznaczne. Jednakże stwierdzono, że uprawy plantacyjne mogą charakteryzować się niższą zmiennością genetyczną, jak w przypadku populacji w Jamach. Może być to bezpośrednim efektem sposobu zbioru przyjmując, że

pokolenie potomne reprezentuje niewielką liczbę drzew matecznych charakteryzujących się największym urodzajem. Stwierdzenie to znajduje poparcie w ocenie efektywnej wielkości populacji, która w przypadku upraw plantacyjnych mieściła się w zakresie od 26 do 64, ze średnią 34, podczas gdy dla naturalnego odnowienia wyniosła średnio 82. W obu badanych populacjach stwierdzono niedobór heterozygot w pokoleniu potomnym świadczący o wsobności w pokoleniu potomnym. Niemniej, niedobór heterozygot wykazano jedynie w przypadku upraw plantacyjnych, podczas gdy naturalne odnowienie nie odbiegało od stanu równowagi Hardy'ego-Weinberga. Jedną z możliwych przyczyn może być kojarzenie osobników spokrewnionych, co wykazano między innymi w pracach [2] i [4]. Różnica między uprawami plantacyjnymi oraz naturalnym odnowieniem może wiązać się z różnicami w zdolności przeżywania wsobnego potomstwa w warunkach optymalnych (plantacje) i sub-optymalnych (naturalne odnowienie). Nie wykazano wyraźnych różnic w parametrach struktury genetycznej między różnymi latami nasiennymi. Niemniej, stwierdzono istotne statystycznie zróżnicowanie genetyczne między poszczególnymi uprawami potomnymi oraz między uprawami potomnymi a pokoleniem rodzicielskim. Wspomniany efekt jest wyraźnie słabszy w przypadku naturalnego odnowienia. Skłania to do wniosku, że pula genowa upraw potomnych może być zdeterminowana przede wszystkim przez nielosowy sposób zbioru nasion. Aby wyeliminować efekt zróżnicowania genetycznego między różnymi uprawami potomnymi, nasiona powinny być pozyskiwane z możliwie dużej liczby drzew rozmieszczonych równomiernie w drzewostanie nasiennym.

### **Podsumowanie**

Omówione prace pokazują przede wszystkim, że jednym z kluczowych efektów izolacji przestrzennej u drzew wiatropylnych jest spadek efektywnej wielkości populacji. W przypadku dość powszechnie występującego buka zwyczajnego, naturalnie odnawiająca się populacja charakteryzuje się (wsobną) efektywną wielkością na poziomie 144 osobników. Dla porównania, w przypadku cisa pospolitego liczba kojarzących się osobników wynosi 87, podczas gdy w kompletnie izolowanej populacji dębu omszonego zaledwie 33. Z kolei poziom wsobności u badanych gatunków zmieniał się w odwrotnym kierunku, tj. 0,030 w przypadku buka, 0,041 w przypadku cisa oraz 0,052 w populacji dębu omszonego. Tym samym, zgodnie z oczekiwaniami stwierdzono wzrost wsobności wraz ze wzrostem izolacji przestrzennej populacji.

Interesującym wynikiem było wykazanie, że poziom polimorfizmu czy wsobności populacji może mieć słaby związek z cenzusową wielkością populacji. Badania nad cisem pokazały, że skuteczna ochrona zasobów genowych wymaga określenia efektywnej wielkości populacji, która ma bezpośredni związek z prawdopodobieństwem identyczności (ze względu na pochodzenie) genów oraz nierównowagą sprzężeń. Z kolei badania nad rodzimymi gatunkami dębu pokazały, że pod względem struktury genetycznej analizowanej za pośrednictwem neutralnych markerów genetycznych, naturalne odnawianie lasu jest bardzo skuteczną metodą zachowania zmienności genetycznej, podczas gdy niewłaściwie zaplanowane odnowienie sztuczne może prowadzić do redukcji zmienności genetycznej populacji potomnych.

Wykazano ponadto, że wyspowa populacja dębu omszonego może skutecznie trwać w izolacji rozrodczej pomimo silnej presji introdukcji ze strony blisko spokrewnionych rodzimych gatunków dębu. Wynik ten otworzył interesujące perspektywy dla badań procesu kojarzenia w tej wyjątkowej populacji.

Ważnym osiągnięciem, wykraczającym poza cel przedstawionego cyklu prac, było opracowanie statystycznej metody jednoczesnej oceny wsobności i częstości alleli zerowych (praca [1]). Warto podkreślić, że od chwili publikacji (praca [1]) omawiane metody cieszą się dużym zainteresowaniem w międzynarodowym środowisku naukowym, czego dowodem jest rosnąca z roku na rok liczba cytowań, która w latach 2009-2013 wg bazy WoS wynosiła 5, 5, 16, 21, 21 (ze średnią 13.6 cytowań na rok). Poza tym, z niedawno opublikowanych badań (prowadzonych przez niezależny zespół badaczy) wynika, że metoda opracowana w pracy [1] charakteryzuje się generalnie najlepszymi właściwościami statystycznymi spośród wszystkich dostępnych metod oceny współczynnika wsobności, które uwzględniają jednocześnie efekt wsobności i alleli zerowych (Campagne et al. 2012). Zastosowanie wspomnianej metody do własnych badań pozwoliło wykazać, że wsobność w populacjach takich gatunków jak buk zwyczajny czy cis pospolity może ewoluować nawet bez udziału samozapłodnienia. Niemniej, poziom wsobności u tych gatunków nie jest prawdopodobnie tak wysoki jak to oszacowano w innych badaniach, w których nie brano pod uwagę możliwości występowania alleli zerowych. W przypadku obu gatunków głównym źródłem wsobności jest kojarzenie krewniacze, które może zachodzić ze względu na silną przestrzenną strukturę genetyczną.

#### Literatura

- Bacles CFE, Jump AS (2011) Taking a tree's perspective on forest fragmentation genetics. *TREE* 16:13-18.
- Bangert RK, Lonsdorf EV, Wimp GM, Shuster SM, Fischer D, Schweitzer JA, Allan GJ, Bailey JK, Whitham TG (2008) Genetic structure of a foundation species: scaling community phenotypes from the individual to the region. *Heredity* 100:121-131.
- Campagne P, Smouse PE, Varouchas G, Silvain J-F, Leru B (2012) Comparing the van Oosterhout and Chybicki-Burczyk methods of estimating null allele frequencies for inbred populations. *Mol Ecol Res* 12:975-982.
- Crawford TJ (1984) The estimation of neighbourhood parameters for plant populations. *Heredity* 52:273-283.
- Dayton PK (1972) Toward an understanding of community resilience and the potential effects of enrichments to the benthos at McMurdo Sound, Antarctica. *Proceedings of the Colloquium on Conservation Problems in Antarctica* (ed BC Parker), pp 81-95. Allen Press, Lawrence.
- Ellison AM, Bank MS, Clinton BD, Colburn EA, Elliott K, Ford CR, Foster DR, Kloeppel BD, Knoepp JD, Lovett GM, Mohan J, Orwig DA, Rodenhouse NL, Sobczak WV, Stinson KA, Stone JK, Swan CM, Thompson J, Von Holle B, Webster JR (2005) Loss of foundation species: consequences for the structure and dynamics of forested ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9:479-486.
- Epperson BK (2003) *Geographical Genetics*. Princeton University Press, New Jersey.
- Frankham R (2003) Genetics and conservation biology. *CR Biologies* 326:22-29.
- Jump AS, Peñuelas J (2007) Extensive spatial genetic structure revealed by AFLP but not SSR molecular markers in the wind-pollinated tree, *Fagus sylvatica*. *Mol Ecol* 16:925-936.
- Kramer AT, Ison JL, Ashley MV, Howe HF (2008). The paradox of forest fragmentation genetics. *Conservation Biology* 22: 878-885.
- Nielsen PC, Schaffalitzky De Muckadell M (1954) Flower observations and controlled pollinations in *Fagus*. *Silvae Genet* 3:6-17.
- Noryskiewicz M (2006) Historia cisa w okolicy Wierchlasu w świetle analizy pyłkowej. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Toruń.
- Rousset F (2000) Genetic differentiation between individuals. *J Evol Biol* 13:58-62.
- Turner ME, Stephens JC, Anderson WW (1982) Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. *Proc Natl Acad Sci* 79:203-207
- Vekemans X, Hardy O J (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol Ecol* 13:921-935.
- Vogl C, Karhu A, Moran G, Savolainen O (2002) High resolution analysis of mating systems: inbreeding in natural populations of *Pinus radiata*. *J Evol Biol* 15:433-439.



- Vornam B, Decarli N, Gailing O (2004) Spatial distribution of genetic variation in a natural beech stand (*Fagus sylvatica* L) based on microsatellite markers. *Conserv Genet* 5:561-570.
- Waples RS, England PR (2011) Estimating Contemporary Effective Population Size on the Basis of Linkage Disequilibrium in the Face of Migration. *Genetics* 189:633-644.
- Whitham TG, Gehring CA, Evans LM, LeRoy CJ, Bangert RK, Schweitzer JA, Allan GJ, Barbour RC, Fischer DG, Potts BM, Bailey JK (2010) A community and ecosystem genetics approach to conservation biology and management. W: *Molecular Approaches in Natural Resource Conservation and Management* (Eds. A DeWoody, J Bickham, C Michler, K Nichols, G Rhodes, K Woeste). pp 50-73, Cambridge University Press.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Wśród pozostałych osiągnięć badawczych, udokumentowanych dorobkiem w postaci publikacji, wyróżniają się następujące grupy tematyczne:

1. System kojarzenia oraz dyspersja genów poprzez pyłek i nasion u drzew
2. Hybrydyzacja i introgresja
3. Struktura genetyczna populacji

Ad. 1. Jednym z głównych zagadnień badawczych podejmowanych przeze mnie jest proces dyspersji genów w populacjach drzew. Pierwsze prace zostały opublikowane jeszcze przed doktoratem (Burczyk i Chybicki 2004; Burczyk i in. 2006) i dotyczyły głównie aspektów statystycznych oceny przepływu genów za pomocą metod bazujących na analizie rodzicielstwa. Wynikiem tych prac było opracowanie metod statystycznych służących do oceny przepływu genów. Warto dodać, że rozwój tych metod zaowocował w późniejszym czasie opracowaniem programu komputerowego NM+ (Chybicki i Burczyk 2010b). Nowością metodologiczną oferowanego w NM+ modelu była możliwość uwzględnienia alleli zerowych, a w kolejnych wersjach błędów genotypowania (lub mutacji), przy obliczaniu prawdopodobieństwa ojcostwa i macierzyństwa. Warto dodać, że program ten jest wykorzystywany przez niezależne grupy badawcze (15 cytowań na dzień 21.01.2014).

Praca opublikowana w *Molecular Ecology* (Chybicki and Burczyk 2010a) stanowiła rozwinięcie badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej. Na podstawie oryginalnych danych przeprowadzono re-analizy rozkładu prawdopodobieństwa dyspersji genów poprzez nasiona i pyłek uwzględniając zarówno dane o odległości między rodzicami a potomstwem w ramach drzewostanu, jak i proporcję nasion i pyłku pochodzących spoza drzewostanu (imigrantów). Dzięki temu stwierdzono, że dyspersja genów przez pyłek jest znacznie bardziej rozległa (średnio 380 m), niż wskazują na to wyniki oparte jedynie na zrekonstruowanym rodzicielstwie (średnio 23 m). Nowością pracy było zastosowanie wieloparametrowych krzywych dyspersji, umożliwiając precyzyjną ocenę pierwotnej i wtórnej dyspersji, co ma szczególne znaczenie u dębów z uwagi na barochorię oraz wtórną zoochorię. Warto także wspomnieć, że praca ta została wyróżniona dyplomem przez Polskie Towarzystwo Biologii Eksperymentalnej Roślin.

Współpraca prowadzona w ramach sieci doskonałości EVOLTREE (finansowanej ze środków UE) zaowocowała także badaniami na dyspersją genów w populacjach buka pospolitego oraz buka japońskiego. Celem badań opisanych na łamach *Forest Ecology and Management* było m.in. porównanie pośrednich i bezpośrednich metod oceny dyspersji genów. Metody pośrednie, oparte na analizie przestrzennej struktury genetycznej, pozwalają ocenić tzw. historyczny (średni z wielu pokoleń) zakres dyspersji genów, podczas gdy metody bezpośrednie, oparte na analizie rodzicielstwa, dostarczają informacji o bieżącym zakresie dyspersji genów.



Analizy wykazały daleko idącą zgodność między ocenami historycznej i bieżącej dyspersji genów. Ponadto, wyniki uzyskane dla buka zwyczajnego potwierdziły również wnioski z analiz struktury genetycznej omówione w pracy [2] wchodzącej w skład cyklu publikacji omówionej w poprzednim rozdziale.

Rozwój metod statystycznych służących do analiz dyspersji genów i systemu kojarzenia był jednym z celów projektu badawczego (IP2010 005470) finansowanego w ramach inicjatywy „IUVENTUS Plus” zorganizowanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W ramach tego projektu została opracowana bayesowska metoda oceny parametrów systemu kojarzenia oraz dyspersji genów oparta na wcześniejszych modelach (Burczyk i in. 2002, Klein i in. 2008). Za nowatorskie należy uznać podejście statystyczne do oceny struktury pokrewieństwa w ramach puli pyłku pochodzącego spoza analizowanej populacji (Chybicki 2013). Podstawą opracowanej metody był tzw. F-model częstości alleli (złożony rozkład wielomianowy-Dirichleta), w którym wariancja częstości alleli wewnątrz grup może być (pod pewnymi założeniami) interpretowana jako prawdopodobieństwo identyczności dwóch alleli ze względu na pochodzenie ( $F$ ) (Balding 2003).

Opracowaną metodę oceny struktury pokrewieństwa w ramach imigrującej puli pyłku (Chybicki 2013) zastosowano do analizy procesu kojarzenia w ramach drzewostanu dębu szypułkowego i bezzypułkowego (Chybicki i Burczyk 2013). Wykazano, że szereg parametrów opisujących system kojarzenia wykazuje dużą zmienność międzypopulacyjną. W szczególności dotyczyło to poziomu zapłodnienia krzyżowego z osobnikami lokalnej populacji oraz z osobnikami spoza lokalnej populacji. W pracy ponadto określono przestrzenny rozkład płodności męskiej, wskazując na jego nielosowy charakter w badanej populacji. Ważnym i nowatorskim aspektem badawczym była ocena stopnia pokrewieństwa w ramach imigrującej puli pyłkowej. Dotychczas uważano, że pula pyłku pochodzącego spoza lokalnej populacji (imigracja pyłku) powodująca efektywne zapylenie stanowi losową reprezentację zmienności genetycznej otaczających populacji będących donorem imigrującego pyłku (kojarzenie losowe). Założenie to prowadziło do konkluzji, że wysoki poziom imigracji prowadzi w sumie do wysokiego poziomu przepływu genów między populacjami i jest mechanizmem odpowiedzialnym za utrzymywanie się wysokiego poziomu zmienności genetycznej. Tym niemniej, badania pokazały, że stopień pokrewieństwa w ramach imigrującej puli gamet pyłkowych oceniony osobno dla każdego drzewa był bardzo zmienny. Oznacza to, że niezależnie od poziomu imigracji ocenionej dla poszczególnych drzew matecznych, liczba osobników będących donorem imigrującego pyłku może być zmienna, zależna prawdopodobnie od czynników genetycznych, jak i środowiskowych. Prowadzi to do wniosków, że u dębów kojarzenie nie zachodzi w sposób losowy, a wysoki poziom imigracji nie musi prowadzić w sposób jednoznaczny do zachowania wysokiego poziomu zmienności genetycznej populacji potomnych.

Publikacje:

Burczyk J, **Chybicki I** (2004) Cautions on direct gene flow estimation in plant populations. *Evolution* 58: 956-963

Burczyk J, **Chybicki I** (2005) Przepływ genów w populacjach drzew leśnych a ochrona leśnych zasobów genowych. W: Ochrona leśnych zasobów genowych i hodowla selekcyjna drzew leśnych w Polsce – stan i perspektywy. Międzynarodowa

- Konferencja Naukowo-Techniczna. Malinówka 8-10.06.2005. SITLD, Warszawa, ss. 90-100.
- Burczyk J, Adams WT, Birkes DS, **Chybicki IJ** (2006) Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants based on naturally regenerated seedlings. *Genetics* 173: 363–372
- Chybicki IJ**, Burczyk J (2010a) Realized gene flow within mixed stands of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) L. revealed at the stage of naturally established seedling. *Molecular Ecology* 19: 2137-2151
- Chybicki IJ**, Burczyk J (2010b) NM+: software implementing parentage-based models for estimating gene dispersal and mating patterns in plants. *Molecular Ecology Resources* 10: 1071–1075
- Oddou-Muratorio S, Bontemps A, Klein EK, **Chybicki IJ**, Vendramin GG, Suyama Y (2010) Comparison of direct and indirect genetic methods for estimating seed and pollen dispersal in *Fagus sylvatica* and *Fagus crenata*. *Forest Ecology and Management* 259: 2151-2159
- Krutovsky KV, Burczyk J, **Chybicki IJ**, Finkeldey R, Pyhajarvi T, Robledo-Arnuncio JJ (2012) Gene Flow, Spatial Structure, Local Adaptation, and Assisted Migration in Trees. W: *Genomics of Tree Crops* (p.red. RJ Schnell, PM Priyadarshan), Springer New York: 71-116
- Chybicki IJ** (2013) Note on the applicability of the F-model in analysis of pollen pool structure. *Journal of Heredity* 104:578-585
- Chybicki IJ**, Burczyk J (2013) Seeing the forest through the trees: comprehensive inference on individual mating patterns in a mixed stand of *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Annals of Botany* 112:561-574

Ad. 2. Kolejny dobrze zdefiniowany obszar mojej działalności badawczej stanowią prace dotyczące hybrydyzacji i introgresji. Badania w tym zakresie prowadzone są w dwóch modelowych układach: zwierzęcym reprezentowanym przez kompleks *Apis mellifera* (podgatunki: *mellifera*, *carnica*) oraz roślinnym reprezentowanym przez kompleks *Quercus* (gatunki: *robur*, *petraea*). W przypadku pszczoły miodnej możliwość introgresji i hybrydyzacji między podgatunkami *mellifera* i *carnica* wynika z faktu, że drugi z podgatunków, obcy pod względem naturalnego zasięgu występowania, jest powszechnie wykorzystywany w pszczelarstwie z uwagi na mniejszą żądliwość, a tym samym łatwość hodowli. Badania z wykorzystaniem markerów DNA wykazały, że w warunkach izolacji (w tzw. zamkniętym rejonie hodowli w Puszczy Augustowskiej) pszczoła miodna z podgatunku *mellifera* wykazuje niewielki poziom introgresji genomu podgatunku *carnica* (Oleksa i in. 2011). Niemniej, pomimo izolacji przestrzennej rodzimej pszczoły „augustowskiej” stwierdzono ślady introgresji ze strony obcego podgatunku. Wynik ten sugeruje, że w niekontrolowanych warunkach hybrydyzacja może zachodzić na dużo większą skalę. Kolejne badania dotyczyły weryfikacji hipotezy o istnieniu izolacji rozrodczej między *mellifera* i *carnica* w (Oleksa i in. 2013). Umożliwiono dziewiczym królowym o znanym statusie taksonomicznym spontaniczne unasiennienie w warunkach naturalnych. Za pomocą analiz DNA wykazano, że królowe typu *mellifera* kojarzyły się w zasadzie jedynie w ramach podgatunku. Z kolei królowe typu *carnica* nie wykazały istotnej preferencji w tym względzie. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że istnieje

częściowa izolacja rozrodcza między podgatunkami, której podstawą może być różny behavior podczas lotów godowych.

Dąb szypułkowy i bezszypułkowy stanowią modelowy kompleks gatunków drzew dla badań nad hybrydyzacją i introgresją. Wiadomo, że gatunki te wykazują znaczne podobieństwo genetyczne za wyjątkiem niewielkich obszarów genomu, w ramach których prawdopodobnie znajdują się geny odpowiedzialne za różnice w morfologii oraz spektrach ekologicznych. Ze względu na częste współwystępowanie, *Q. robur* i *Q. petraea* mają możliwość kojarzenia międzygatunkowego. Podobnie jak w przypadku kompleksu *Apis*, nie do końca wiadomo jednak, czy utrzymywanie się czystych gatunków jest efektem istnienia izolacji rozrodczej, czy też mechanizmów doboru kierunkowego (lub obu czynników jednocześnie). W badaniach podjętych w ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (IP2010 005470) wykazano, że w warunkach niekontrolowanych istnieje znaczna zmienność preferencji kojarzenia się w ramach i między gatunkami, począwszy od kojarzenia wyłącznie wewnątrz gatunku, po swobodne kojarzenie bez względu na przynależność taksonomiczną (Chybicki i Burczyk 2013). Niemniej, wykazano że dąb bezszypułkowy charakteryzuje się istotnie większą specyficnością kojarzenia niż szypułkowy. Ponadto, w przypadku drzew-mieszaińców gatunkowych wykazano tendencję do kojarzeń wstecznych z dębem bezszypułkowym. Interesującym było także stwierdzenie dla dęby bezszypułkowego istnienia pozytywnego związku między proporcją kojarzeń lokalnych a tendencją do kojarzenia wewnątrzgatunkowego. Związek ten może wynikać z braku synchronizacji kwitnienia obu gatunków.

Publikacje:

Oleksa A, **Chybicki IJ**, Tofilski A, Burczyk J (2011) Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *Journal of Apicultural Research* 50: 116-129

Oleksa A, Wilde J, Tofilski A, **Chybicki IJ** (2013) Partial reproductive isolation between European subspecies of honey bees. *Apidologie* 44: 611-619.

**Chybicki IJ**, Burczyk J (2013) Seeing the forest through the trees: comprehensive inference on individual mating patterns in a mixed stand of *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Annals of Botany* 112: 561-574

Ad. 3. Pozostałe osiągnięcia naukowe obejmują wyniki badań struktury genetycznej różnych organizmów. W badaniach tych wykazano między innymi, że populacje sosny zwyczajnej mogą charakteryzować się przestrzenną strukturą genetyczną, pod warunkiem że powstały poprzez naturalne odnowienie (Chybicki i in. 2008). Badając związek mikoryzowy między lakówką ametystową a bukiem zwyczajnym wykryto, że u buka zwyczajnego korzenie jednego osobnika mogą być skolonizowane przez wiele genotów grzyba (Hortal i in. 2012). Ponadto wykazano, że w populacji lakówki może ukształtować się przestrzenna struktura genetyczna, co jest prawdopodobnie związane z ograniczoną dyspersją spor. Z kolei porównanie struktury genetycznej dwóch gatunków chrząszczy saproksylicznych ujawniło, że specjalizacja siedliskowa może wzmacniać efekt izolacji przestrzennej (Oleksa i in. 2013).

Publikacje:

- Chybicki I**, Burczyk J (2002) Wykorzystanie metod autokorelacji przestrzennej w badaniach zmienności genetycznej i modelowaniu procesów demograficznych populacji roślin. *Wiadomości Botaniczne* 46(3/4): 7-18
- Chybicki IJ**, Działuk A, Trojankiewicz M, Sławski M, Burczyk J (2008) Spatial genetic structure within two contrasting stands of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genetica* 57: 193-202
- Hortal S, Trocha L, Murat C, **Chybicki I**, Buee M, Trojankiewicz M, Burczyk J, Martin F (2012) Beech roots are simultaneously colonized by multiple genets of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystina* clustered in two genetic groups. *Molecular Ecology* 21: 2116-2129
- Oleksa A, **Chybicki IJ**, Gawroński R, Svensson GP, Burczyk J (2013) Isolation by distance in saproxylic beetles may increase with niche specialization. *Journal of Insect Conservation* 17:219-233

Osiągnięcia naukowe znajdujące się poza omówionymi obszarami badawczymi obejmują wyniki dwóch prac. Pierwsza z prac dotyczy technicznego aspektu badań nad strukturą genetyczną i systemem kojarzenia u drzew, tj. opracowania reakcji multipleks-PCR umożliwiających jednoczesną amplifikację i analizę kilku loci SSR (Działuk i in. 2005). Mimo że obecnie reakcja typu multipleks jest laboratoryjnym standardem, w chwili publikacji zdecydowana większość analiz była prowadzona w oparciu o jedno-locusowe reakcje PCR. W owym czasie korzyści płynące z analiz typu multipleks były rewolucyjne: znaczna redukcja kosztów analiz oraz redukcja ryzyka błędów genotypowania (podczas scalania danych).

Interesującym osiągnięciem było również odkrycie osobników triploidalnych u dębu szypułkowego i bezszypułkowego. Mimo że zjawisko triploidii było notowane dla rodzaju *Quercus*, ze względu na bardzo rzadkie występowanie nie jest ono dobrze poznane. Badania jednoznacznie wykazały, że genotyp osobnika eu-triploidalnego może w niektórych loci markerowych mieć wzór genotypu diploidalnego (tj. niepełna heterozygotyczność). Tym samym, mimo że markery SSR mogą być skutecznym narzędziem do wykrywania aberracji liczby chromosomów, nie pozwalają one na jednoznaczne odróżnienie eu- i aneuploidii.

Publikacje:

- Działuk A, **Chybicki I**, Burczyk J (2005) PCR-multiplexing of nuclear SSR loci in *Quercus* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 23: 121-128
- Działuk A, **Chybicki IJ**, Welc M, Śliwińska E, Burczyk J (2007) Presence of triploids among oak species. *Annals of Botany* 99: 959-964

Wyniki swoich badań wielokrotnie prezentowałem w postaci referatów oraz posterów na międzynarodowych konferencjach naukowych. Do osiągnięć naukowych można zaliczyć także pełnienie funkcji recenzenta łącznie 31 (nie licząc recenzji po resubmisji lub korekcie) manuskryptów złożonych do 21 czasopism z listy JCR, a także 2 projektów badawczych zgłoszonych w ramach konkursu Narodowego Centrum Nauki (2011/01/N/NZ9/..., 2012/07/N/NZ8/...).

Podsumowanie bibliograficzne dorobku naukowego

Okres	Liczba publikacji z listy JCR	Liczba publikacji ogółem	Liczba punktów Impact Factor	Liczba punktów MNiSW
przed doktoratem	3	5	8.990	98
po doktoracie	17	18	43.005	515
ogółem	20	23	51.995	613

## 6. Omówienie działalności dydaktycznej i organizacyjnej

W ramach działalności organizacyjnej pozyskałem środki finansowe w postaci grantów badawczych (kierownik projektu): 2 projektów finansowanych w ramach grantu MNiSW/NCN oraz 2 projektów badawczych finansowanych w ramach inicjatywy IUVENTUS Plus (I i II edycja). Pełniłem rolę współorganizatora konferencji szkoleniowej „Wykorzystanie sekwencji mikrosatelitarnych w jądrowym DNA drzew leśnych do udowodnienia pochodzenia materiału dowodowego w postępowaniu sądowym”. Od 2010 roku pełnię rolę wydziałowego koordynatora programu ERASMUS oraz MOST.

W ramach działalności dydaktycznej prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów kierunków biologia, ochrona środowiska i biotechnologia. Jestem koordynatorem przedmiotów: Matematyka, Metody statystyczne w biologii, Genetyka populacyjna. Ponadto jestem współprowadzącym zajęcia (wykłady i ćwiczenia/laboratoria) w ramach następujących przedmiotów: Genomika, Genetyka sądowa i konserwatorska, Ekologia ewolucyjna. W latach 2003-2011 sprawowałem opiekę naukową nad pracami licencjackimi (11) oraz magisterskimi (13) zrealizowanymi w Katedrze Genetyki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, a także pełniłem funkcję promotora prac magisterskich (4) zrealizowanych w latach (2011-2013) w Katedrze Genetyki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego. Ponadto, prowadziłem wykłady w ramach międzynarodowej konferencji szkoleniowej „Workshop on estimating gene flow in forest trees” zorganizowanej w ramach działań sieci doskonałości EVOLTREE, a także wykłady w ramach konferencji szkoleniowej dla Specjalistów ds. Selekcji i Nasiennictwa Regionalnych Dyrekcji Lasów Państwowych, czy wykłady w ramach Dni Nauki organizowanych cyklicznie przez Uniwersytet Kazimierza Wielkiego. Jestem także autorem przekładu rozdziałów *Random Genetic Drift* oraz *Mutation and the Neutral Theory* podręcznika *Principles of Population Genetics* Daniela L. Hartla, Andrew G. Clarka wydanego pod tytułem „Podstawy genetyki populacyjnej” p.red. Jarosława Burczyka nakładem Wydawnictw Uniwersytetu Warszawskiego.



## 7. Nagrody i wyróżnienia

Wyrazem osiągnięć naukowych było przyznanie w 2011 roku 3-letniego Stypendium MNiSW dla Wybitnych Młodych Naukowców oraz następujących nagród:

1. Nagroda zespołowa I st Rektora UKW, 2005, za osiągnięcia naukowe
2. Nagroda indywidualna III st Rektora UKW, 2006, za osiągnięcia naukowe
3. Nagroda Naukowa Prezydenta Miasta Bydgoszczy (nagroda zespołowa), 2009, za osiągnięcia naukowe
4. Wyróżnienie Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin, 2011, za wyróżniającą się publikację z zakresu biologii eksperymentalnej roślin w latach 2009-2010 (publikacja w Molecular Ecology 2010)
5. Naukowa indywidualna II st Rektora UKW, 2011, za osiągnięcia naukowe
6. Nagroda Wydziału II Nauk Biologicznych i Rolniczych Polskiej Akademii Nauk, 2012, za cykl prac badawczych „Przebieg procesów genetycznych w populacjach drzew leśnych”

Wyrazem osiągnięć na polu dydaktycznym i organizacyjnym było przyznanie w 2010 roku zespołowej Nagrody III stopnia Rektora UKW.

*Chybicki Igor*