

Poznań 8 sierpnia 2020

Ireneusz Odrzykoski, dr hab.
Wydział Biologii UAM,
Instytut Biologii Eksperymentalnej,
Zakład Genetyki

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr inż. Magdaleny Jopek „Taksonomia molekularna sekcji *Batrachium* (*Ranunculus*, *Ranunculaceae*) w Europie”.

W obrębie rodzaju *Ranunculus* w sekcji *Batrachium* opisano 30 taksonów o randze gatunkowej oraz wiele hybrydów. Uważa się również, że niektóre gatunki mają pochodzenie hybrydowe (F1) lub są allopoliploidalne. Grupa ta stanowi wielkie wyzwanie dla taksonomów w związku ze stosunkowo niewielką liczbą dostępnych cech morfologicznych oraz dużą plastycznością fenotypową. W związku z tym często trudno o jednoznaczną identyfikację materiału. Odszukanie nowych cech diagnostycznych byłoby bardzo pożądane w związku z rolą tych gatunków jako bioindykatorów stanu ekologicznego wód.

W obrębie sekcji występuje duży polimorfizm chromosomowy z cytotypami na pięciu poziomach liczby chromosomów (Prancl et al. 2018), od diploidów ($2n=16$), triploidów ($2n=24$) tetraploidów ($2n=32$), pentaploidów ($2n=40$) po heksaploidy ($2n=48$). Od dawna poszukuje się wiarygodnych markerów molekularnych, które pozwoliłyby na pewną identyfikację roślin oraz rekonstrukcję historii filogenetycznej tej grupy.

Przedstawiona do recenzji praca oparta jest na analizie obszernego materiału. Analizowano mutacje „rejonu ITS” - rodzinie genowej obejmującej fragmenty niekodujących sekwencji między genowych ITS1, ITS2 oraz gen 5.8s rDNA. Jest to fragment jądrowego DNA często badany u roślin. Sekwencja ITS2 została zaproponowana jako roślinny „barkod” do identyfikacji gatunkowych (Yao i in. 2010). Oprócz ITS zbadano polimorfizm dwóch sekwencji chloroplastowego DNA (rpl32-trnL oraz psbE-petL) jako markerów cytoplazmatycznych, a dla niektórych prób również fragment sekwencji chloroplastowego genu matK.

Materiał do badań obejmował 217 prób przypisanych pierwotnie do 18 gatunków oraz dwóch taksonów hybrydowych (*R. x glauckii* i *R. x kolchoensis*). Wstępna identyfikacja została przeprowadzona na podstawie cech morfologicznych. Ten bogaty materiał zebrano w ramach projektu, którego celem jest opracowanie taksonomiczne sekcji *Batrachium* w skali całego zasięgu. Został on w pracy wykorzystany wszechstronnie, stąd praca jest wielowątkowa. Dla recenzenta spoza grona specjalistów znających badaną grupę trudne jest prześledzenie wszystkich wątków.

Autorka starała się zweryfikować kilka hipotez funkcjonujących w literaturze oraz sformułowała również własne. Dane są analizowane na różne sposoby i moim zdaniem niektóre wątki można byłoby wyłączyć bez szkody dla pracy np. identyfikacja prób zdeponowanych w BG przez innych autorów. To samo dotyczy włączenia do analiz azjatyckiego gatunku *R. mongolensis* czy dwóch gatunków hybrydowych (*R. x glauckii* i *R. x kolchoensis*), dla których nie dysponowano dużą próbą roślin.

We wstępie omówiono badania przeprowadzone do tej pory nad przedstawicielami sekcji *Batrachium* oraz w osobnym podrozdziale krótko omówiono procesy ewolucyjne, które mogą kształtować różnorodność genetyczną badanej grupy. Omówiono również zagadnienia związane z wykorzystaniem markerów molekularnych do identyfikacji roślin, metody rekonstrukcji drzew i sieci filogenetycznych oraz metody oceny ich wiarygodności statystycznej. Jest to bardzo syntetyczne i profesjonalne wprowadzenie w aspekty metodyczne pracy. Uzasadniono również wybór markerów oraz wybrane metody analizy danych.

Głównym celem pracy było wyszukanie diagnostycznych mutacji, które byłyby przydatne do identyfikacji badanych taksonów i weryfikacja ich przydatności do identyfikacji hybridów. Jednym z celów pracy była również rekonstrukcja historii filogenetycznej gatunków „czystych” na podstawie polimorfizmu ITS i cpDNA, co zostało pominięte w części „Cele pracy i hipotezy badawcze”

Przedstawiono siedem hipotez, z których dwie są sformułowane bardzo ogólnie („W sekcji *Batrachium* dochodzi do hybrydyzacji międzygatunkowej” i „Najstarsze ewolucyjnie są włosienniczki posiadające zdolność do wykształcania liści pływających”) Pozostałe hipotezy są szczegółowe i dotyczą postulowanego pokrewieństwa taksonomicznego par gatunków albo hybridowego pochodzenia niektórych z nich.

Materiał i metody

Materiał pochodził głównie z Polski, Rosji i Finlandii. Wszystkie próby były identyfikowane na podstawie cech morfologicznych przez specjalistów. Przypisano je do 17 gatunków i dwóch taksonów hybridowych (*R. x glauckii*, *R. x kolchoensis*). W przypadku 9 prób identyfikacja morfologiczna była alternatywna (*R. aquatilis/trichophyllus*). Identyfikacja była później weryfikowana przy pomocy wykrytych alleli diagnostycznych. Nie dysponowano danymi cytogenetycznymi, a dane literaturowe dotyczące możliwej liczby chromosomowej badanych roślin są cytowane sporadycznie.

Uzyskano sekwencje nukleotydowe dla 215 prób. Sekwencje te zostały zdeponowane w bazie GeneBank (NCBI) i uzyskały numery katalogowe (akcesyjne). Niektóre z sekwencji były wykorzystane wcześniej w pracy Bobrova i in. (2015), której doktorantka jest jednym ze współautorów. W niektórych analizach wykorzystano również sekwencje zdeponowane w Banku Genów uzyskane przez innych autorów. Należy wspomnieć o tym, że sekwencjonowanie odbywało się z wykorzystaniem jednego startera (s. jednokierunkowe). W przypadku ITS sekwencjonowanie przeprowadzono również dla klonowanych produktów reakcji PCR dla sześciu próbek *R. kaufmanii*, trzech *R. x glauckii*, dwóch *R. x kolchoensis* i *R. penicillatus* oraz jednej *R. pseudofluitans*. Klonowanie miało na celu sprawdzenie haploidalnego zestawu alleli dla weryfikacji poprawności interpretacji miejsc heterozygotycznych dla gatunków o postulowanym hybridowym pochodzeniu.

Wyniki

Wyniki omówiono bardzo szczegółowo, zestawiając dane w wielu kombinacjach: osobno dla gatunków „czystych” oraz po uwzględnieniu gatunków i prób traktowanych jako hybridowe.

Analizowano również osobno sekwencje ITS i sekwencje cpDNA oraz porównywano ich wyniki. Główne wyniki przedstawione są również w podsumowaniu (podrozdziale 5.6) Dotyczą one trzech zagadnień:

Identyfikacji „molekularnej” gatunków

Wykryto 76 genotypów („rybotypów”) ITS oraz 19 haplotypów chloroplastowego DNA

1. Autorka znalazła allele diagnostyczne umożliwiające identyfikacje 11 z 17 badanych gatunków, co pozwoliło na przypisanie prób do odpowiednich gatunków lub ich zidentyfikowanie jako prób o pochodzeniu hybrydowym (ze wskazaniem gatunków rodzicielskich). Trudno się jednak zorientować, ile i jakie mutacje są gatunkowo specyficzne. Można te informacje wyszukać w załączonych tabelach (tab. 8,12), ale nie jest to łatwe. Autorka stwierdziła, że identyfikacja morfologiczna prób w wielu przypadkach jest zawodna i nie pokrywa się z identyfikacją na podstawie diagnostycznych mutacji.
2. Na 217 badanych prób błędną identyfikację stwierdziła dla 66 prób, a 58 prób było pochodzenia hybrydowego. Okazało się np. że nieomal wszystkie próby identyfikowane morfologicznie, jako *R. penicillatus* to *R. peltatus*.
3. Autorka wykryła błędną identyfikację taksonomiczną sekwencji zdeponowanych przez innych autorów. Dotyczy to połowy porównywanych sekwencji.(8/15)

Analiza filogenetyczna

Genotypy ITS podzielono na 28 mniejszych grup i 3 grupy główne (tab. 8) . Dla sekwencji chloroplastowych wykryto 19 haplotypów podzielonych na 6 grup. (Tab. 12)

1. Autorka przeprowadziła analizę filogenetyczną, która pozwoliła na wyróżnienie czterech kładów na podstawie sekwencji „ITS” dla prób „czystych” (n-A,B,C,D) lub siedmiu, gdy włączeniu do analizy gatunki i próby hybrydowe Wyróżniono również cztery kładów na podstawie sekwencji chloroplastowych (cp-A,B,C,D).
2. Potwierdziła silne zróżnicowanie genetyczne *R. trichophyllus*, gatunku polimorficznego pod względem liczby chromosomów (Prancl et al. 2018) . Stwierdziła polifiletyczność tego gatunku (sekwencje ITS w kładach C i D z haplotypami B i D) oraz występowanie gatunków kryptycznych. Nie wiadomo jednak, czy jest korelacja pomiędzy kładami a cytotypami.
3. Stwierdziła, że najstarsze filogenetycznie są dwa gatunki diploidalne (*R. hederaceus* i *R. omniophyllus*) oraz tetraploidalny *R. tripartitus*. Gatunki te charakteryzują się wspólnym rybotypem i haplotypem . Wyniki pozwoliły na odrzucenie hipotezy o wykształcaniu liści pływających tylko u gatunków najstarszych ewolucyjnie w sekcji *Batrachium*.
4. Autorka stwierdziła również, że *R. baudotii* nie jest spokrewniony filogenetycznie z *R. peltatus*.

Hybrydyzacja i poliploidyzacja

Dowody na hybrydowe pochodzenie prób opierają się głównie na wykryciu „addytywnego charakteru wielu diagnostycznych pozycji nukleotydowych” (heterozygotyczności) w rejonie ITS dla wielu loci jednocześnie. Dodatkowe dowody pochodzą z klonowanych fragmentów reakcji PCR u *R. kaufmanii*, *R. penicillatus* i *R. pseudofluitans* oraz *R. x glauckii* i *R. x kelchoensis*, co pozwoliło na identyfikację gatunków rodzicielskich.

1. Wyniki sugerują, że szeroko rozpowszechniony *R. aquatilis* jest heksaploidem, który powstał przez poliploidyzację dwóch kryptycznych gatunków z grupy *R. trichophyllus* o różnym rybotypie (r6 x r3). Pierwszy z nich jest gatunkiem matczynym, co wynika z haplotypów cpDNA.
2. Autorka sugeruje, że tetraploidalny *R. kaufmanii* powstał przez hybrydyzację dwóch kryptycznych gatunków *R. trichophyllus*.
3. Autorka przedstawia dowody na to, że *R. penicillatus* jest hybrydem *R. fluitans* i *R. peltatus*.
4. Wyniki pozwalają na potwierdzenie hipotezy, że triploidalny *R. schmalhauseni* (2n=24) jest hybrydem *R. peltatus* oraz niezidentyfikowanego gatunku rodzicielskiego. Wyniki opublikowano w pracy Bobrova i in. (2015).
5. Dane autorki potwierdzają hipotezę, że hexaploidalny *R. pseudofluitans* jest hybrydem tetraploidalnego *R. fluitans* (jako gatunek matczyny) i diploidalnego *R. circinatus*.
6. Wyniki autorki potwierdzają zatem hipotezę o częstym tworzeniu taksonów hybrydowych w badanej grupie. Dla przejrzystości warto byłoby podzielić je na hybrydy, u których nie zaszła poliploidyzacja od gatunków allopoliploidalnych.

Na końcu podsumowania autorka wspomina o trudnościach, które napotkała przy interpretacji swoich danych w sytuacji niepewności identyfikacji morfologicznej. W dalszych badaniach proponuje „zastosowanie metod opartych na sekwencjonowaniu nowej generacji, co być może umożliwi uporządkowanie taksonów mieszańcowego pochodzenia czy poliploidów”. Moim zdaniem lepsze wyniki mogłoby przynieść powiązanie badania genotypów z analizą cytologiczną metodą cytometrii przepływowej oraz informacjami np. na temat sterility badanych prób.

Wnioski autorki są z reguły dobrze udokumentowane. Mam jednak pewne wątpliwości, co do dwóch kwestii.

Czy hipoteza sugerująca, że najstarszą filogenetycznie jest grupa trzech gatunków (*R. hederaceus* i *R. omniophyllus*, *R. tripartitus*) nie jest za wcześnie odrzucona? W analizie filogenetycznej powinno uwzględnić się większą liczbę genów i wszystkie gatunki sekcji. Wyniki analizy tylko małych fragmentów genomu mogą nie odzwierciedlać filogenezy gatunkowej.

Zastanawiam się również nad tym, czy relacje filogenetyczne nie zmieniłyby się, gdyby przy rekonstrukcji genomu chloroplastowego (i w mniejszym stopniu ITS) pominąć insercje – delekcje o dyskutowanej przydatności? Nie zrobiono takiego porównania.

W pracy autorka poruszyła wiele wątków. Przesiedzenie wszystkich było dużym wyzwaniem dla recenzenta. Trudno było zapoznać się z pełną dokumentacją zawartą w wielkoformatowych tabelach zbiorczych. Ułatwieniem byłoby, gdyby surowe dane i rysunki były dostarczone jako pliki na dołączonej płytce CD. Pożądane byłoby również przygotowanie dodatkowych tabel zbiorczych, pozwalających łatwo zorientować się o wielkości próby dla gatunków czystych, hybrydów oraz liczbie i rodzaju diagnostycznych mutacji pozwalających odróżniać gatunki itp.

Podsumowując mogę stwierdzić, że praca zawiera oryginalną, autorską próbę rozwiązania problemu naukowego. Wykazuje opanowanie warsztatu filogenetyka molekularnego oraz ogólną wiedzę teoretyczną autorki dotyczącą analizy zmienności genetycznej. Dowodzi umiejętności prowadzenia pracy naukowej na wszystkich jej etapach, od formułowania hipotez, generowania i analizy danych, po kompetentną dyskusję wyników na tle literatury przedmiotu.

Stwierdzam, że przedstawiona mi rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym.....” z późniejszymi uzupełnieniami. Stawiam zatem wniosek o dopuszczenie pani mgr inż. Magdaleny Jopek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Ireneusz Odrzykoski