

Prof. dr hab. Krystyna Boratyńska
Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk
Kórnik
borkrys@man.poznan.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej **Pani mgr Magdaleny Jopek pt. „Taksonomia molekularna sekcji *Batrachium* (*Ranunculus*, *Ranunculaceae*) w Europie”**

Rozprawa napisana została w formie niepublikowanej monografii, a nie w formie zbioru publikowanych prac, jak to się ostatnio najczęściej przyjmuje. Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki zezwala na takie przygotowanie rozprawy doktorskiej.

Promotorem Pani Magdaleny Jopek jest Pani dr hab. Joanna Zalewska-Gałosz (prof. UJ) na podstawie decyzji Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, a promotorem pomocniczym jest dr hab. Michał Ronikier, prof. Instytutu Botaniki im. W. Szafera PAN w Krakowie.

Recenzję wykonałam na podstawie pisma Przewodniczącego Rady Dyscypliny ‘Nauki Biologiczne’ Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, Pana prof. dr. hab. Andrzeja Kozika z dnia 27.05.2020 r.

1. Wartość naukowa rozprawy

Gatunki z sekcji *Batrachium* (włosieniczniki, jaskry wodne) należą do rodzaju *Ranunculus* i takie ujęcie taksonomiczne przyjęto w niniejszej rozprawie. Ta grupa roślin stwarza sporo kłopotów już na poziomie ustalenia samej liczby taksonów i ich odróżniania, nie wspominając o badaniach pokazujących ich drogi rozwoju ewolucyjnego. Dlatego, uważam, że każda praca na ten temat jest cenna i wnosi nowe wartości. Podjęcie badań nad zróżnicowaniem gatunków w obrębie badanej grupy roślin, w oparciu o markery genetyczne z równoległym uwzględnieniem ich morfologii, jest niewątpliwie oryginalnym i ważnym wkładem Pani Magdaleny Jopek w poznanie ich taksonomicznych relacji.

Uważam, że podjęcie przez Panią Magdalenę Jopek zadania polegającego na identyfikacji molekularnej gatunków sekcji *Batrachium* oraz ustalenia ich wzajemnych relacji było nie lada wyzwaniem. Było to możliwe dzięki opiece Pani Promotor, dr hab. Joanny Zalewskiej-Gałosz, która jest specjalistką w taksonomii tej grupy roślin, a także dzięki wydatnej pomocy promotora pomocniczego, Pana Michała Ronikiera.

Na wstępie chciałabym wymienić kilka najciekawszych wyników, jakie Doktorantka uzyskała:

- przyczyniła się do uściślenia pozycji taksonomicznej kilkunastu taksonów, między innymi takich, jak: *Ranunculus ashibetsuenis* Wiegleb., *R. baudotii* Godr., *R. circinatus* Sibth., *R. confervoides* (Fr.)Fr., *R. fluitans* Lam., *R. mongolicus* (Krylov) Serg., *P. peltatus* Schrank, *R. rionii* Lager czy *R. trichophyllus* Chaix.
- potwierdziła, że trzy gatunki, *Ranunculus omiophyllus* Ten, *R. hederaceus* L. i *R. tripartitus* DC. są uznane za najstarsze ewolucyjnie i wyraźnie wyodrębniają się od reszty badanych taksonów.
- dowiodła mieszańcowego pochodzenia *Ranunculus aquatilis* L., *R. kauffmanni* Clerc., *R. × gluckii* A. Felix (= *R. circinatus* × *R. trichophyllus*), *R. schmalhauseni* Luferov, *R. penicillatus* (Dumort.) Bab. i *R. pseudofluitans* (Syme) Newbould ex Baker & Foggitt,
- wykryła mieszańce międzygatunkowe: *Ranunculus aquatilis* × *R. peltatus*, *R. mongolicus* × *R. trichophyllus*, *R. fluitans* × *R. circinatus* a także mieszańca do tej pory nie opisanego - *R. fluitans* × *R. baudotii*.
- wykryła znaczną, nieznaną wcześniej zmienność wewnątrzgatunkową *Ranunculus trichophyllus*, przy czym gatunek ten morfologicznie nie jest aż tak zróżnicowany, jak można byłoby się spodziewać biorąc pod uwagę jego bardzo rozległy zasięg, który przypada na niemal całą Europę, znaczne tereny Azji i Afryki, Amerykę Północną i Amerykę Południową, Australię oraz Nową Zelandię.

Przytoczone wyniki świadczą o dużej wadze przedłożonej rozprawy oraz wskazują na jej szeroki, europejski zakres. Szkoda, że Pani mgr Magdalena Jopek nie publikowała na bieżąco wyników swoich badań.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Rozprawa została napisana, jak wspomniałam wyżej, w poprawnym stylu właściwym dla dysertacji. W obszernym 'Wstępie' (19 str.), Pani Magdalena Jopek we właściwy sposób przedstawiła obiekt badań, jak i wprowadziła w tematykę badawczą. Wskazała także na

ważniejsze aspekty wpływające na wyjątkową uciążliwość badań taksonomicznych rodzaju *Ranunculus*, sekcji *Batrachium*, do których zaliczyć należy powszechną hybrydyzację i introgresję, a także poliploidyzację. Dość obszerna (być może nawet zbyt obszerna) jest część, w której przybliżone zostały zagadnienia związane z filogenetyką molekularną roślin, zastosowaniem markerów molekularnych w filogenetyce, konstruowaniem drzew filogenetycznych, oceną wiarygodności drzew filogenetycznych.

Cel pracy i hipotezy badawcze zostały sformułowane krótko i przejrzysto. Podstawowym celem była identyfikacja gatunków i ustalenie ich wzajemnych relacji. Doktorantka postawiła sobie 7 różnych hipotez badawczych, między innymi założyła, że identyfikacja molekularna taksonów będzie zgodna z identyfikacją morfologiczną. Do wszystkich hipotez ustosunkowała się w dalszych częściach rozprawy, a zwłaszcza w podrozdziale 'Podsumowanie'.

Materiał i metody przedstawione są na 11 stronach. Materiał do badań obejmował 19 taksonów (w tabeli na stronie 26 jest chyba 21 taksonów), większość roślin zebrana była z terenu Polski, ale także z Rosji, Estonii, Finlandii, Wielkiej Brytanii, Danii, Węgier, Chorwacji, Czarnogóry, Grecji i Gruzji. Wykaz analizowanych prób i danych sekwencyjnych wraz z nazwami taksonów i danymi lokalizacyjnymi zawiera dołączona tabela (jako strona 26). Szkoda, że wspomniana tabela nie ma tytułu ani numeracji. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka omówiła szczegółowo techniki badań genetycznych (izolacje DNA, amplifikacje DNA, elektroforezę i czyszczenie produktu PCR, sekwencjonowanie DNA, klonowanie produktu PCR) oraz przedstawiła sekwencje, na podstawie których wykonała analizy filogenetyczne.

Wyniki badań Doktorantka zaprezentowała na 15 stronach, ilustrując je 7 tabelami oraz 6 rycinami (w numeracji rycin są pomyłki). Wykonano sekwencjonowanie czterech regionów DNA: jądrowego - ITS i trzech chloroplastowych - *rpl32-trnL*, *psbE-petL* oraz *matK*. Badaniami objęto 28 grup (rybotypów) odpowiadających taksonom. Rozumiem, że ta rozbieżność w liczbie taksonów (w materiałach wspomina się o 19 taksonach, w tabeli na stronie 26 jest 21) zmieniła się po uwzględnieniu wyników badań molekularnych opartych na jądrowych markerach (czy tylko na rybosomalnych ITS?), w wyniku których ustalono, że mamy do czynienia nie z 19 ale z 28 taksonami (patrz tab. 8). Ten wątek nie jest do końca jasny. W badaniach chloroplastowych wyróżniono 19 haplotypów (h1-h19), zaliczonych do 6 grup (tab. 12).

Drzewo filogenetyczne taksonów sekcji *Batrachium* zbudowane na podstawie regionów ITS ujawniło 7 kladów, w których znalazły się najbliższe spokrewnione ze sobą taksony oraz

grupę zewnętrzną którą stanowił *R. sceleratus* (ryc. 3). Wspomniany wyżej *R. trichophyllus*, reprezentowany jest w badaniach przez 6 rybotypów (r1-r6), znalazł się aż w 4 kładach, co świadczy o znacznej jego zmienności wewnątrzgatunkowej.

Dendrogram, wykonany na sekwencjach chloroplastowych (*rpl32-trnL* i *psbE-petL*) pokazał nieco inne relacje pomiędzy taksonami, niż te przedstawione na markerach jądrowych. W tej analizie wyróżniono 4 kłady i grupę zewnętrzną reprezentowaną przez dwie sekwencje *R. sceleratus*. *R. trichophyllus* także okazał się taksonem zróżnicowanym, bowiem wykryto u niego 10 różnych haplotypów, które zaliczono do 5 grup (ryc. 5).

Relacje filogenetyczne na markerach jądrowy ITS i cpDNA były identyczne tylko w jednym kładzie (kład n-A = cp-A), w kładzie który tworzą trzy gatunki: *R. hederaceus*, *R. omiophyllus* i *R. tripartitus*. W dalszej części pracy Pani Magdalena Jopek wykazała, że drogi ewolucyjne tych ostatnio wymienionych gatunków wyraźnie były oddalone od dróg pozostałych taksonów i stanowią one ewolucyjnie najstarszą grupę spośród badanych taksonów.

Przedstawione zależności filogenetyczne taksonów na podstawie sekwencji ITS i na podstawie sekwencji chloroplastowych wykazywały znaczne różnice. Czym to można wytłumaczyć, czy to tylko kwestia nieodpowiednich markerów chloroplastowych, jak sugerowała Pani mgr Magdalena Jopek? Doktorantka pokazała, że przynależność do kładów wielu taksonów jest niepewna. W związku z tym nasuwa się pytanie, czy te relacje filogenetyczne należy traktować jako wynik roboczy i wymagający dalszych badań? Mam jeszcze jedno pytanie – czym można wytłumaczyć wyraźne różnice morfologiczne gatunków spokrewnionych, np. *R. circinatus* i *R. rionii*. Te dwa gatunki znalazły się w jednym kładzie (n-c i cp-B, odpowiednio na bazie markerów jądrowych i chloroplastowych), choć morfologicznie są różne.

Rozdział 'Dyskusja' zajmuje 18 stron. Początkowy jej fragment na temat znaczenia gatunków sekcji *Batrachium* w przyrodzie lepiej by pasował do wstępu. Podobnie pisanie o celu pracy jest tutaj zbędne.

Doktorantka poświęciła wiele miejsca definicji gatunku w sekcji *Batrachium*. Wymienia 5 najczęściej dyskutowanych koncepcji: biologiczną, ekologiczną, morfologiczną, filogenetyczną i genetyczną. Omówiła je szczegółowo na przykładzie badanych gatunków przytaczając bogatą literaturę. Ostatecznie biorąc pod uwagę specyfikę jaskrów wodnych, Autorka przyjęła, że gatunki w tej grupie roślin muszą różnić się pod względem ewolucyjnym, mieć ograniczony przepływ genów oraz powinny zachowywać cechy morfologiczne, które umożliwiają ich rozpoznanie. Dodałabym tutaj jeszcze o morfo-

anatomiczno-geograficznej koncepcji gatunku, bowiem tak samo wartościowe jak cechy morfologiczne są cechy anatomiczne i nie powinny być pomijane; bardzo często są to cechy o dużym znaczeniu diagnostycznym. Jak to wygląda u *Batrachium*, czy budowa anatomiczna była brana pod uwagę w oznaczaniu taksonów? Ponadto nie trzeba specjalnie podkreślać, że każdy opis gatunku wymaga także znajomości jego zasięgu.

Obecnie, do wielu trudnych spraw wykorzystuje się badania genetyczne, które dostarczają informacji na temat sekwencji nukleotydów DNA, tak jak mamy to w przypadku *Batrachium* w niniejszej rozprawie. Doktorantka udowodniła w swojej rozprawie, że zastosowanie markerów genetycznych jest bardzo pewnym sposobem do identyfikacji gatunku, zwłaszcza okazów mieszańcowego pochodzenia.

Podkreślić trzeba, że Autorka rozprawy wykazała bardzo interesujące zróżnicowanie genetyczne w obrębie *R. trichophyllus*, taksonu wspomnianego już wcześniej. Według Pani Magdaleny Jopek *R. trichophyllus* jest gatunkiem polifiletycznym, a wykazane jego zróżnicowanie genetyczne powstało przede wszystkim na drodze izolacji geograficznej i ekologicznej, przy czym nie ma ono przełożenia na zróżnicowanie morfologiczne.

Rozprawa kończy się 'Podsumowaniem', które stanowi końcowy fragment rozdziału 'Dyskusja'. Faktycznie jest to podsumowanie pracy doktorskiej, ale z licznymi elementami dyskusji. Tutaj też Pani mgr Jopek ustosunkowuje się do postawionych na początku rozprawy hipotez badawczych. Wydaje mi się, że tak skonstruowana rozprawa w tym fragmencie jest mało przejrzysta. Natomiast brakuje mi krótkiego rozdziału nazwanego 'Wnioski', w którym wypunktowane byłyby najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań.

Zamieszczona na końcu rozprawy bibliografia jest bardzo bogata, liczy 260 publikacji, większość są to prace genetyczne, ale wiele z nich dotyczy szeroko rozumianej biologii. Przeważają publikacje z ostatnich kilku lat, ale Pani Magdalena Jopek sięgnęła też do prac historycznych, np. Hierna z 1837. Prac, których przedmiotem badań są gatunki z sekcji *Batrachium* jest cytowanych przynajmniej kilkanaście, kilka najnowszych dotyczy taksonów wschodnioazjatyckich.

3. Poprawność redakcyjna i drobne uwagi

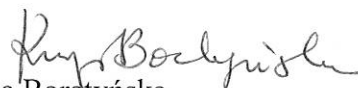
Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Jopek napisana jest językiem zrozumiałym i poprawnym. Tabele są jasne i czytelne, choć w przypadku trzech z nich, z uwagi na ich wielkość, nie są łatwe w obsłudze (tab. 1, 8, 12). Ryciny są czytelne i dobrze opisane, jedynie numeracja niektórych z nich jest pomyłona (Ryc. 4 i 5 powinny mieć numery 6 i 7)

4. Ocena końcowa

Podsumowując całość rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Jopek stwierdzam, że stanowi ona oryginalne osiągnięcie naukowe. Wprawdzie nie rozstrzygnięto wszystkich problemów taksonomicznych i filogenetycznych w badanej sekcji *Batrachium*, ale dostarczono wielu nowych wyników z zakresu wewnątrzgatunkowego zróżnicowania genetycznego badanych taksonów i relacji między nimi, co niewątpliwie przyczyni się do uściślenia wiedzy na temat tej grupy roślin.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Jopek spełnia warunki określone w art. 13.1 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 z późn. zmianami) i **wniosuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pani Magdaleny Jopek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Kórnik, 5.08.2020 roku


Krystyna Boratyńska