

Prof. dr hab. Marcin Nobis
Instytut Botaniki, Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa 3, 30-387 Kraków
m.nobis@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Burzackiej-Hinz
Zatytułowanej „Klasyfikacja i filogeneza rodzaju
***Dendrobium* Sw. sekcja *Dendrobium* (Orchidaceae)”**

Promotor: prof. dr hab. Dariusz L. Szlachetko
Promotor pomocniczy: dr Magdalena Dudek

1. Tematyka i wartość naukowa rozprawy

Storczykowate (Orchidaceae) to jedna z najliczniejszych w gatunki rodzin roślin naczyniowych na świecie. Wedle szacunków liczy ona ponad 30 000 gatunków, przy czym wspomnieć należy także, że pomimo iż każdego roku opisywane są dziesiątki nowych gatunków reprezentujących tę rodzinę, to zdecydowanie więcej każdego roku zanika w skutek kurczenia się powierzchni ich matecznika, czyli tropikalnych lasów. Jednym z reprezentantów tej grupy roślin, jest liczący ponad 1600 gatunków rodzaj *Dendrobium*, występujący przede wszystkim w południowo-wschodniej, Azji, Australii i Oceanii. Jak nietrudno się domyśleć, taksonomia oraz klasyfikacja gatunków w tak nieprawdopodobnie licznym gatunkowo rodzaju jest niezmiernie trudna, ale również niezmiernie potrzebna dla określenia prawdziwej różnorodności oraz relacji filogenetycznych w tym rodzaju, odznaczającym się niezwykle różnorodnością morfologiczną oraz możliwościami adaptacyjnymi do różnych warunków klimatycznych. W związku z powyższym, podjęcie próby ustalenia relacji filogenetycznych w obrębie tego rodzaju przez Panią Aleksandrę Burzycką-Hinz jest niezmiernie potrzebne i wpisuje się w światowy trend badań nad biogeografią molekularną i rekonstrukcją procesów ewolucyjnych w obrębie rodziny Orchidaceae.

Tematyka rozprawy koncentruje się na rekonstrukcji pokrewieństwa i wewnątrz-sekcyjnej kompozycji gatunkowej w obrębie sekcji nominalnej, z gruntownym odniesieniem do wielu reprezentantów innych wyróżnianych w obrębie rodzaju *Dendrobium* sekcji. Stworzyło to solidne podstawy do przeprowadzenia modyfikacji w ordynacji wewnątrzrodzajowej, jak również układzie gatunków w wyróżnianych sekcjach. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem technik elektronowej mikroskopii skaningowej (analizy struktur mikromorfologicznych na warżkach kwiatowych), metod molekularnych (PCR, sekwencjonowanie DNA), analiz makromorfologicznych oraz filogenetycznych.

Wiedza i samodzielność Doktorantki

Dołączone do rozprawy oświadczenia wszystkich współautorów potwierdzają zdecydowanie dominujący udział mgr Aleksandry Burzyckiej-Hinz na każdym etapie przygotowywania publikacji będących podstawą jej dysertacji doktorskiej. W każdej z trzech prac wchodzących w skład rozprawy, Pani Aleksandra pełni rolę autora wiodącego (pierwszego), a w jednej pracy jest także współautorem korespondencyjnym. Dwie pierwsze 3-4-autorowe prace, opublikowane zostały odpowiednio w International Journal of Molecular Sciences (Q1, wydawnictwo MDPI; IF=4.9) oraz w Acta Societatis Botanicorum Poloniae (Q3,

wydawnictwo Polskie Towarzystwo Botaniczne; IF=1.1). W trzeciej, 5-autorowej, załączonej do rozprawy pracy w formie manuskryptu wysłanego do druku w czasopiśmie BMC in Plant Biology (Q1, wydawnictwo Springer; IF=4.3), jest również pierwszym autorem. Na uwagę zasługuje imponująca liczba materiałów dokumentacyjnych i przeprowadzonych analiz. Doktorantka przedstawiła również, potwierdzony przez pozostałych współautorów, swój merytoryczny udział w każdej z załączonych do dysertacji prac, włącznie z zaprojektowaniem badań i koncepcją prac. Z oświadczenia wynika, że prowadziła badania laboratoryjne, brała ona udział w większości przeprowadzonych analiz, przygotowywała ryciny i tabele, analizowała i interpretowała uzyskane dane, prowadziła konsultacje z poszczególnymi współautorami oraz przygotowywała manuskrypty każdej z tych prac, oczywiście przy częściowym współudziale i akceptacji ostatecznej wersji przez wszystkich współautorów. Jest to dowodem nie tylko dużej samodzielności naukowej Doktorantki w pracy z danymi ale również potwierdzeniem jej umiejętności w zakresie prawidłowego doboru metod statystycznych przy rozwiązywaniu problemów badawczych oraz umiejętności odpowiedniego interpretowania uzyskanych wyników.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

Przedstawione studium oparte jest na wieloaspektowych morfologicznych i molekularnych analizach gatunków nominalnej sekcji rodzaju *Dendrobium*. W trzech pracach, stanowiących podstawę dysertacji, Doktorantka starała się łączyć wyniki badań mikro- i makromorfologicznych z analizami molekularnymi, wykorzystując do tego celu techniki mikroskopii skaningowej, ilościowe i jakościowe cechy makromorfologiczne oraz uzyskane w trakcie jej badań lub pobrane z *GeneBank* dostępne sekwencje jądrowego DNA (sekwencje nrITS), plastydowego DNA (oparte na dwóch regionach: *matK* i *trnL-trnF*) oraz niskokopijnego genu jądrowego DNA – *Xdh* (xanthine dehydrogenase), wykorzystując do ich analizy zróżnicowanych metod numerycznych i filogenetycznych. Daje się zauważyć, że Doktorantka stopniowo i z przemyślanym doбором metod i analizowanych danych, stara się ustalić skład oraz relacje filogenetyczne zarówno w obrębie gatunków zaliczanych do sekcji *Dendrobium*, jak również w stosunku do reprezentantów innych sekcji należących do tego interesującego rodzaju.

W pierwszej z przedstawionych prac, Autorka analizuje cechy mikromorfologiczne, badając przy użyciu technik mikroskopii elektronowej 21 warżek kwiatowych reprezentantów *Dendrobium* z czego 7 należało do sekcji nominalnej. Reszta była reprezentantami 12 innych sekcji. Ponadto przeprowadziła także analizy filogenetyczne dla zrozumienia uzyskanej zmienności mikromorfologicznej i jej przestrzennej organizacji w korelacji z uzyskanymi drzewami filogenetycznymi bazującymi na 44 sekwencjach ITS. Na warżkach u wszystkich taksonów z sekcji *Dendrobium* zaobserwowała dwa typy struktur: cylindryczne i stożkowate włoski oraz stożkowate i półkoliste brodawki. U gatunków z pozostałych sekcji poza tymi strukturami obecne były także elipsoidalne włoski i półkoliste brodawki. Natomiast u pięciu gatunków nie zaobserwowała obecności żadnych z analizowanych struktur. Doktorantka sugeruje, że obecność i brak struktur na warżkach nie wynika z genetycznego pokrewieństwa gatunków lecz z ich konwergencji i dostosowania do występujących w danym obszarze zapylaczy.

W drugiej pracy, doktorantka stara się zrekonstruować relacje filogenetyczne, koncentrując się przede wszystkim na gatunkach reprezentujących sekcję *Dendrobium*, a wykorzystując do tego celu sekwencje jądrowego DNA (nrITS), plastydowego DNA (regiony *matK*, oraz *trnL*-

trnF) jak również niskokopijnego genu jądrowego *Xdh* (warto tu podkreślić, że użycie tego genu w rekonstrukcji filogenezy innych rodzajów z rodziny Orchidaceae, przyniosło bardzo pozytywne wyniki). W wyniku przeprowadzonych testów z użyciem trzech metod, tj. największej oszczędności (ang. *maximum parsimony*), największej wiarygodności (ang. *maximum likelihood*) i wnioskowania Bayesowskiego (ang. *Bayesian inference*), okazało się, że oba markery jądrowe były bardziej wartościowe niż regiony plastydowe. Ponadto informacje uzyskane w oparciu o analizy danych jądrowych dowodzą, że dla zrekonstruowania filogenezy rodzaju *Dendrobium* lepiej sprawdzają się markery wielokopijne ITS1-5.8S-ITS2, niż gen o niskiej liczbie kopii *Xdh* (tym samym nie potwierdzono jego, jak początkowo się wydawało, skuteczności w badaniach filogenetycznych, przynajmniej w rodzaju *Dendrobium*)

Trzecia z zamieszczonych prac (przedstawiona w dysertacji jako manuskrypt) koncentruje się na dwóch aspektach – morfologicznym i filogenetycznym. Głównym celem prowadzonych badań było zestawienie i przedyskutowanie danych otrzymanych z analiz fenetycznych, filogenetycznych oraz geograficznych w kontekście klasyfikacji wewnątrzrodzajowej. Rekonstrukcja filogenezy przeprowadzona została z wykorzystaniem markera ITS. Natomiast analizy fenetyczne wykonano dla zestawu 14 istotnych w taksonomii rodzaju cech, obejmujących zarówno organy wegetatywne jak i generatywne. W manuskrypcie przedyskutowano przynależność systematyczną wybranych gatunków, a zwłaszcza ich kompozycji w sekcji nominalnej. Doktorantka stwierdziła, że z uwagi na to, że wiele cech kwiatowych ewoluowało niezależnie wiele razy, nie uzyskano jasnej odpowiedzi na pytanie, jak sklasyfikować poszczególne gatunki w obrębie całego rodzaju. Natomiast stwierdza, że w sekcji nominalnej, warto zachować tylko te gatunki, które na podstawie zestawu cech morfologicznych nie pozostawiają żadnych wątpliwości. Konwergentna ewolucja, jaką stwierdziła w obrębie rodzaju *Dendrobium*, może wynikać zatem z dostosowania do zapylaczy. Możliwe także, że trudności w tej klasyfikacji mogą być wynikiem hybrydyzacji, dość powszechnej u roślin. Ten mający ogromne znaczenie w ewolucji proces, może znacznie utrudniać ustanowienie spójnego systemu wewnątrzrodzajowej organizacji.

Oprócz głównego tematu pracy, koncentrującego się na organizacji gatunkowej wewnątrz sekcji *Dendrobium*, Doktorantka w swoich pracach kładzie solidne podstawy dla poznania i klasyfikacji wewnątrzrodzajowej tego ogromnego rodzaju jakim jest *Dendrobium*. Ponadto prace cechuje odpowiedni dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, ich krytyczna analiza jak również umiejętność ich interpretacji na tle bardzo solidnie przedstawionej i przedyskutowanej literatury przedmiotu.

Uważam, że przeprowadzone badania naukowe są znaczące i prezentują dużą wartość dla badań nad rodzajem *Dendrobium*. Stanowią też punkt odniesienia dla dalszych badań filogenetycznych z użyciem nowoczesnych metod sekwencjonowania całogenomowego oraz analiz integratywnych dla potwierdzenia częstości i intensywności przypadków hybrydyzacji pomiędzy poszczególnymi gatunkami analizowanego rodzaju.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa doktorska, poza załączonymi artykułami, jest napisana poprawnym językiem (polskim i angielskim), została zastosowana w niej odpowiednia nomenklatura biologiczna, jest czytelna i w większości przemyślana i dopracowana pod kątem merytorycznym i stylistycznym. Rozprawa obejmuje również streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy i krótkie streszczenia poszczególnych artykułów stanowiących podstawę

doktoratu przedstawione również w języku polskim oraz 3 zasadnicze rozdziały odnoszące się do opublikowanych lub wysłanych do druku prac. Zaprezentowane artykuły naukowe zaopatrzone są w bardzo czytelne ryciny, tabele, zdjęcia obrazujące cechy morfologiczne kwiatów oraz zdjęcia spod mikroskopu elektronowego, obrazujące mikromorfologiczne struktury warżek kwiatowych (te ostatnie zamieszczone są w pierwszym artykule). Ponadto, Doktorantka zamieściła liczne ryciny obrazujące drzewa filogenetycznych relacji pomiędzy badanymi gatunkami. Dodatkowo, praca jest zaopatrzona w liczne załączniki uzupełniające wyniki przedstawione w każdym z trzech artykułów stanowiących podstawę dysertacji. Drobne uwagi krytyczne dotyczą metody przedstawiania drzew filogenetycznych, które ze względu na ich wielkość rozdzielone są na kilka stron manuskryptu, bez zamieszczenia na danej stronie minidrzewa z zaznaczonym fragmentem, który aktualnie jest przedstawiany. Trochę utrudnia to czytanie i interpretację przedstawionych wyników.

4. Uwagi krytyczne i inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy pracy

Wydział Biologii

O ile załączone w rozprawie prace opublikowane już w czasopiśmie naukowych są bardzo dobrze dopracowane, z należytą dbałością o styl i przekaz, to ostatnia z przedstawionych prac, zamieszczona w formie manuskryptu, wymaga jeszcze dopracowania. Na manuskrypcie zazaczyłem szereg uwag, które mogę przekazać Doktorantce, być może niektóre z nich będą mogły być uwzględnione po pierwszych recenzjach już przesłanej do czasopisma BMC in Plant Biology pracy. Tu podaję tylko kilka z nich:

Instytut Botaniki

- Chociaż we wstępie Doktorantka pisze, że analizy oparto głównie (a tak naprawdę wyłącznie) na sekwencjach ITS, ponieważ inne metody, co udowodniła we wcześniejszych pracach, nie dają odpowiednich rezultatów, to w metodyce wymienia analizy chloroplastowego DNA i niskokopijnego genu *Xdh*. Analizy te, uznaje jednak (powołując się na własną wcześniej opublikowaną pracę) za nieinformatywne i skutkujące uzyskaniem politomicznych drzew filogenetycznych. Według mnie taka informacja powinna być zamieszczona we wstępie lub dyskusji, co skróciłoby pracę i ułatwiło jej odbiór, tym bardziej, że Doktorantka ani w pracy ani w materiałach uzupełniających, nie przedstawia żadnego z uzyskanych z tych analiz drzew;

- W pracy przedstawione są tzw. morfologiczne analizy przodka, ale niestety ani we wstępie ani w celach Autorka w ogóle tego zagadnienia nie podejmuje, ponadto również bardzo ogólnie wspomina tylko o tym w dyskusji. Powstaje zatem pytanie – w jakim celu te analizy zostały wykonane?

- W pracy przedstawione są trzy analizy morfologiczne, UPGMA, PCoA i NMDS bazujące na tym samym zestawie danych jakościowych, proponuję przemyślenie czy te dwie ostatnio wymienione analizy są niezbędne, tym bardziej że nie obrazują żadnych prawidłowości – co podkreślone jest również w tekście manuskryptu.

- Doktorantka przedstawiła moim zdaniem, bardzo interesującą analizę, w której skompilowała cechy morfologiczne z cechami geograficznego zasięgu gatunków. Jest to bardzo interesujące i szkoda, że tak mało miejsca zostało poświęcone na omówienie tego zagadnienia. Interesujące jest, czy rozejście się gatunków z obszaru źródłowego, czyli wyspowej części Azji, do poszczególnych regionów: Australii–Nowej Zelandii, Indii–Sri-lanki oraz wschodniej Azji obejmującej Chiny, Koreę i Japonię ma też odzwierciedlenie w filogenetycznym pokrewieństwie gatunków?

- Doktorantka wspomina, że pomimo iż w oparciu o analizy filogenetyczne niektóre gatunki występują w kladzie z gatunkami z sekcji nominalnej, to ich morfologia jest zupełnie inna i powinny być wyłączone z tej sekcji. Powstaje zatem pytanie, kiedy traktować gatunki za filogenetycznie bliskie i reprezentujące tą samą sekcję a kiedy nie? Ma to tym bardziej uzasadnienie, że Autorka wielokrotnie wspomina o konwergencji cech. Czy możliwe jest zatem, aby cechy tych gatunków też dostosowały się do warunków ekologicznych w których występują i dla tego są nieco inne od reszty reprezentantów sekcji *Dendrobium*?

- Autorka wspomina także o możliwych przypadkach hybrydyzacji, pomiędzy analizowanymi gatunkami, a czy analizując sekwencje ITS zaobserwowane zostały jakieś ku temu przesłanki?

Co do samej rozprawy doktorskiej Pani Aleksandry Burzyckiej-Hinz, uważam że została przedstawiona w sposób można by rzec dość skąpy. Poza ogólnym wprowadzeniem w temat, przedstawieniem celu i ogólnym jedno-stronicowym streszczeniem zamieszczonych w dysertacji prac, pewien niedosyt budzi brak w dysertacji wyraźnie wyodrębnionego rozdziału dotyczącego hipotez badawczych, które zostałyby w pracy zweryfikowane. Brakuje również dyskusji i wniosków dotyczących całości, czyli tzw. całościowego spojrzenia i podsumowania dysertacji doktorskiej wraz z przedstawieniem dalszych perspektyw badawczych. Zamiast tego, Autorka przedstawiła bardzo króciutkie (na ¼ strony) podsumowanie, choć według mnie nie jest to podsumowanie uzyskanych wyników (i nie można go traktować za równoważne z wnioskami pracy doktorskiej), gdyż są to jedynie dodatkowe wyjaśnienia dotyczące formy i konstrukcji przedstawionej dysertacji. Wyraźnie wskazuje to na fakt, że o ile prace wchodzące w tzw. pęczek doktoratu, były przygotowywane, poprawiane (zapewne wielokrotnie przez wszystkich współautorów, że nie wspomnę tu o recenzentach czasopism w których zostały one opublikowane), to sama praca doktorska przygotowywana już wyłącznie przez doktorantkę, nieco odbiega zarówno stylem, jak i dbałością o przekaz. Ponadto, zabrakło mi w pracach przedstawionych przez doktorantkę, systematycznej konkluzji, tj. zaproponowania nowego podziału sekcyjnego w obrębie *Dendrobium*, a już na pewno kompletnego wykazu gatunków sekcji nominalnej, który odpowiednio zamykałby podjęty przez doktorantkę trud badawczy. Chociaż być może będzie to tematem kolejnej pracy przygotowywanej przez Doktorantkę? Zdaję sobie sprawę z tego, że Autorka nie prowadziła badań terenowych, a jedynie laboratoryjne, jednakże dysponując takim przeglądem i wiedzą na temat wszystkich znanych jak dotąd gatunków wyróżniających się cechami typowymi dla sekcji *Dendrobium*, chciałbym prosić o krótkie wyjaśnienie, co było powodem braku niniejszego zagadnienia w przedstawionej dysertacji?

Warto byłoby w przyszłości rozważyć wykorzystanie innych metod w przypadku analiz filogenetycznych *Dendrobium*. W pracy, Doktorantka zamieściła informację, że kilkanaście gatunków reprezentujących rodzaj *Dendrobium* jest hodowane w szklarniach Uniwersytetu Gdańskiego, może zatem warto byłoby je wykorzystać dla sprawdzenia innych metod, jak chociażby szerokogenomowego sekwencjonowania i jego przydatności w rekonstrukcji relacji filogenetycznych. Bardzo często daje to lepsze wyniki niż używane osobno analizy wybranych regionów jądrowego i chloroplastowego DNA, a sekwencjonowanie to jest z roku na rok coraz tańsze przez co bardziej przystępne nawet dla naukowców nie dysponujących dużymi środkami finansowymi. Powyższe stwierdzenie jest moją propozycją na przyszłość, doceniając jednocześnie ogrom prac, które Doktorantka włożyła w przygotowanie poszczególnych prac w ramach rozprawy doktorskiej.

5. Ocena końcowa

Badania przeprowadzone w ramach studiów doktoranckich mgr Aleksandry Burzyckiej-Hinz, oferują cenne spostrzeżenia na temat mechanizmów i czynników leżących u podstaw kształtowania różnorodności genetycznej w grupie gatunków z rodzaju *Dendrobium*. Uzyskane wyniki reprezentują bardzo wysoki poziom naukowy w zakresie poznania relacji filogenetycznych analizowanego rodzaju, a przede wszystkim jego sekcji nominalnej. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w tym umiejętnością syntezy danych oraz konfrontowania wyników swoich analiz z aktualnym stanem wiedzy znanym z literatury. Kandydatka jest w stanie sprawnie przygotowywać publikacje naukowe a zakres prac potwierdza, że ma kompetencje w zakresie znajomości szerokiej gamy analiz statystycznych. Obejmują one przetwarzanie i analizowanie danych genetycznych, wykorzystywanie różnych metod filogenetycznych i analiz numerycznych opartych na cechach morfologicznych, a przedstawione uwagi krytyczne, mające raczej charakter dyskusji i w niczym nie obniżają mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy.

W związku z powyższym, ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Aleksandry Burzyckiej-Hinz, spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Aleksandry Burzyckiej-Hinz, do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

Biorąc pod uwagę jakość artykułów, znaczący wkład w pogłębianie naszej wiedzy na temat filogenezy gatunków tropikalnych z rodzaju *Dendrobium* oraz szerokie kompetencje zdobyte przez Doktorantkę w trakcie doktoratu, niniejszym wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Kraków, 01.12.2024 r.

prof. dr hab. Marcin Nobis