

Recenzja

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

wykonanej w Katedrze Taksonomii Roślin i Ochrony Przyrody Uniwersytetu Gdańskiego.

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

Oceny rozprawy dokonałam na podstawie przesłanego mi w dniu 4 listopada b.r. przez Biuro Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego dostępu do elektronicznej wersji dysertacji, a także opracowanej wersji papierowej przesłanej mi pocztą dwa tygodnie później. Rozprawa liczy 138 stron i zawiera poza stroną tytułową: streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie i cele pracy, omówienie wyników, podsumowanie, wykaz literatury, oświadczenia doktorantki i współautorów, a także kopie artykułów i manuskryptu tj. [1] “Micromorphology of labellum in selected *Dendrobium* Sw. (Orchidaceae, Dendrobieae)”, [2] “Potential use of low-copy nuclear gene *Xdh* at lower taxonomic levels based on phylogenetic analysis of the nominal section of *Dendrobium*”, [3] “Evolution of morphological traits of *Dendrobium* sensu lato - an attempt to resolve phylogenetic relationships in nominal and morphologically convergent sections”. Jest to zbiór opublikowanych/w trakcie procesu wydawniczego, oryginalnych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Stwierdzam, że pod względem formalnym rozprawa spełnia wymagania art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”.

Założenia i koncepcje rozprawy są bardzo ambitne i ciekawe. Doktorantka zajęła się rodzajem *Dendrobium* Sw. szeroko rozpowszechnionym pod względem geograficznym. Jest to jeden z największych rodzajów w rodzinie storczykowatych, obejmujący ponad 1000 gatunków, występuje na szerokim obszarze, od Chin, Indii, Japonii, przez Malaje, Indonezję, aż po Nową Gwineę, Australię, Nową Zelandię i wyspy Pacyfiku. *Dendrobium* zajmuje ważną pozycję w przemyśle kwiatów ciętych storczyków ozdobnych, a większość gatunków z sekcji nominalnej jest ważnym surowcem w chińskiej medycynie ziołowej. Pod względem taksonomicznym istnieje jednak niejednorodność w traktowaniu granic sekcji lub rodzaju oraz taksonomii kompleksu gatunkowego na dużym obszarze jego zasięgu.

Identyfikacja gatunków *Dendrobium* jest zatem bardzo trudna. Prawdopodobnie wynika to z wysokiego poziomu polimorfizmu, bardzo dużej liczby gatunków, szerokiego zakresu występowania

oraz zróżnicowania geograficznego. Próby klasyfikacji tego rodzaju podejmowano już od XIX wieku, początkowo na podstawie cech morfologicznych, a w ostatnich latach na podstawie analiz filogenetycznych. Do tej pory nie ma spójnej klasyfikacji *Dendrobium* i jednoznacznego traktowania taksonomicznego, ani w obrębie gatunków tego rodzaju, ani w obrębie poszczególnych sekcji. Wielu orchideologów uważa, że ustalenie spójnej klasyfikacji *Dendrobium* stanowi jedno z największych wyzwań wśród storczykowatych.

Wobec powyższego, podjęcie celów recenzowanej rozprawy, którymi są: rekonstrukcja filogenezy i klasyfikacja rodzaju *Dendrobium* ze szczególnym uwzględnieniem sekcji nominalnej w oparciu o szerokie spektrum cech morfologicznych, mikromorfologicznych i genetycznych oceniam bardzo wysoko. Jak pisałam wyżej, doktorantka przedstawiła wyniki swoich badań w dwóch artykułach i jednym manuskrypcie.

Pierwszy artykuł pt. **“Micromorphology of labellum in selected *Dendrobium* Sw. (Orchidaceae, Dendrobieae)”** autorstwa Aleksandry Burzackiej-Hinz, Magdaleny Narajczyk, Magdaleny Dudek i Dariusza Szlachetko został opublikowany w International Journal of Molecular Sciences z wydawnictwa MDPI w dniu 24 sierpnia 2022 r. Jedną z kluczowych struktur, często wystarczającą do identyfikacji na poziomie gatunku w omawianym rodzaju, jest warżka (labellum), która u wielu gatunków *Dendrobium* posiada różne typy włosków i brodawek. Celem pracy było zidentyfikowanie i opisanie struktur obecnych na powierzchni warżki u 21 gatunków *Dendrobium*, reprezentujących 13 sekcji, określenie ich rozmieszczenia i gęstości, a także sprawdzenie, czy uzyskane dane mają wartość taksonomiczną. Badania mikromorfologiczne przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Jest to pierwsza analiza w rodzaju *Dendrobium*, która koncentruje się typowo na mikromorfologii. Badania wykazały obecność zarówno jedno-, jak i wielokomórkowych struktur na powierzchni warżki: trzy typy włosków oraz trzy typy brodawek. Sporządzono również diagramy przedstawiające rozmieszczenie i gęstość struktur na warżce. Na podstawie uzyskanych wyników mikromorfologicznych oraz przeprowadzonych analiz filogenetycznych autorzy sugerują, że obecność i brak struktur na warżkach wynika z konwergencji, a zjawisko to jest ściśle związane z presją wywieraną przez zapylacze.

Drugi artykuł pt. **„Potential use of low-copy nuclear gene *Xdh* at lower taxonomic levels based on phylogenetic analysis of the nominal section of *Dendrobium*”** jest autorstwa doktorantki, Magdaleny Dudek i Dariusza Szlachetko i został opublikowany w periodyku Acta Societatis Botanicorum Poloniae 29 lutego 2024r. Celem pracy było przetestowanie przydatności genu o niskiej liczbie kopii *Xdh* do rekonstrukcji filogenezy na poziomie sekcji, w oparciu o nominalną sekcję rodzaju *Dendrobium*. Przesłanką do podjęcia badań był fakt, że w ostatnich dekadach wykorzystanie niskokopijnych genów jądrowych wydaje się być przełomem w rekonstrukcji przebiegu filogenezy, ponieważ wiele z nich

zawiera dużą liczbę miejsc informatywnych, a ponadto są dziedziczone dwurodzicielsko i często wykazują szybkie tempo ewolucji. Do testów wybrano wszystkie gatunki, które kiedykolwiek zostały zaklasyfikowane do sekcji *Dendrobium*, a materiał roślinny użyty w badaniach pochodził ze zbiorów Katedry Taksonomii Roślin i Ochrony Przyrody Uniwersytetu Gdańskiego. Autorzy przeprowadzili analizy filogenetyczne, wykorzystując zarówno gen niskokopijny *Xdh*, jak i wcześniej i częściej wykorzystywane sekwencje ITS, *trnL-trnF* oraz *matK*. Zebrano dane ilościowe dla wymienionych markerów, określając długość sekwencji, liczbę miejsc stałych i zmiennych oraz liczbę miejsc informatywnych. Wyniki wzbogaciły bazę GenBank o nowe sekwencje markera *Xdh*, który do tej pory był rzadko tam reprezentowany. Do rekonstrukcji filogenezy użyto metod: maximum parsimony, maximum likelihood i wnioskowanie Bayesowskie. Wyniki wskazały, że markery jądrowe okazały się bardziej wartościowe do rozwiązywania relacji filogenetycznych w omawianym rodzaju niż fragmenty plastydowe. Ani *matK*, ani *trnL-trnF* nie dały zadowalających wyników. Dowiedziono również, że jądrowy marker wielokopijowy (ITS) jest bardziej wartościowy do badania rodzaju *Dendrobium* niż gen o niskiej liczbie kopii (*Xdh*) oraz regiony plastydowe.

Trzecia część rozprawy to manuskrypt „**Evolution of morphological traits of *Dendrobium sensu lato* - an attempt to resolve phylogenetic relationships in nominal and morphologically convergent sections.**” autorstwa Aleksandry Burzackiej-Hinz, Magdaleny Dudek, Natalii Olędrzyńskiej, Aleksandra Naczki i Dariusza Szlachetko. Złożony został do czasopisma BMC Plant Biology i obecnie jest w trakcie procesu wydawniczego.

Celem omawianego manuskryptu była analiza rodzaju *Dendrobium* z wykorzystaniem wszystkich dostępnych sekwencji DNA, zintegrowana z danymi morfologicznymi, ze szczególnym uwzględnieniem cech kwiatowych. Jako kluczowy marker zastosowano ITS jądrowy, który został uznany wcześniej (patrz: artykuł drugi w rozprawie doktorskiej) za najbardziej niezawodny. Metodyka zamierzonych badań w była w pełni zgodna z standardami:

Materiały i sekwencje DNA: dane DNA *Dendrobium sensu lato* i grupy zewnętrznej pobrano z bazy NCBI GenBank; wybrano markery molekularne oraz wyselekcjonowano przedstawicieli sekcji, aby uprościć analizę filogenetyczną. Analizy molekularne: sekwencje wyrównano oraz dopasowano odpowiedni model ewolucji molekularnej (substytucji) za pomocą standardowych narzędzi bioinformatycznych, w analizach zastosowano wnioskowanie Bayesowskie (Bayesian Inference) i metodę największej wiarygodności (Maximum Likelihood); drzewo ITS wybrano do dalszych analiz ze względu na większą liczbę próbek.

Analiza morfologiczna: zbadano 318 taksonów, kodując 14 cech (np. pseudobulwy, liście, kwiaty).

Przeprowadzono analizę klastrową, analizę głównych składowych, skalowanie wielowymiarowe oraz analizę SIMPER w celu oceny zróżnicowania. Dodatkowe analizy pięciu cech kwiatowych wykonano metodą grupowania metodą Warda, aby zidentyfikować istotne grupy.

Uzyskane wyniki dla markera ITS pokazują, że *Dendrobium sensu latissimo* jest grupą monofiletyczną, natomiast sekcja nominalna, w tradycyjnym rozumieniu, nie jest monofiletyczna. Aby wyjaśnić tę sytuację, autorzy skoncentrowali się na dwóch głównych aspektach: zmienności morfologicznej i relacjach filogenetycznych. Pozwoliło to dokładniej przeanalizować gatunki sekcji nominalnej oraz pozostałych sekcji, w których przynależność taksonomiczna budziła wątpliwości. Bardzo interesująca i ważna, moimi zdaniem, jest tabela S6, gdzie przedstawiono gatunki przypisane do sekcji *Dendrobium* według różnych autorów i obecnie uzyskanych wyników oraz ryc. S4 p ilustrująca rozkład analizowanych gatunków *Dendrobium* na kladogramie razem z możliwą ewolucją cech kwiatowych. Pozwoliło to sprawdzić, czy morfologicznie podobne taksony występują w tych samych regionach geograficznych. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy wnioskują, że centrum różnorodności gatunków *Dendrobium* może znajdować się na wyspach Azji. Stamtąd *Dendrobium sensu lato* mogło migrować w trzech kierunkach: do Australii i Nowej Zelandii, Indii i Sri Lanki oraz Chin, Korei i Japonii.

Porównanie analiz podobieństw morfologicznych, rekonstrukcji stanów przodków oraz analiz filogenetycznych pokazało, że cechy wegetatywne są znacznie mniej zmienne niż cechy kwiatowe. Autorzy sugerują, że cechy kwiatowe ewoluowały u przedstawicieli *Dendrobium* kilkakrotnie niezależnie oraz, że rodzaj *Dendrobium* powinien być podzielony, jednak jest na to jeszcze zbyt wcześnie. Jest to rodzaj o skomplikowanej historii, w której można zaobserwować różne tempo ewolucji, utratę pewnych cech i pojawienie się innych w procesie migracji na nowe obszary oraz pod wpływem adaptacji do lokalnych zapylaczy, w tym epizody hybrydyzacji. Taksonomia tak dużej, różnorodnej grupy o szerokim zasięgu jest i musi być złożona i wymaga dalszych intensywnych prac.

Nie jestem orchidologiem, a zatem nie jestem w stanie podjąć dyskusji z doktorantką na temat stawianych hipotez i uzyskanych wyników, natomiast jako osoba zajmująca się szeroko ujętą geografią roślin uważam wyniki przedstawionej rozprawy za bardzo interesujące i potwierdzające to o czym sama nie raz przekonałam się w moich badaniach, że historia naturalna roślin naczyniowych jest o wiele bardziej skomplikowana, niż sądziliśmy przed powszechną możliwością stosowania mikroskopii SEM, analiz molekularnych czy analiz klastrowych.

Podsumowując: cel rozprawy został prawidłowo sformułowany i zgodny z tytułem, zastosowano właściwe metody badawcze i osiągnięto ważne, oryginalne i bardzo interesujące wyniki, o czym świadczy też ich opublikowanie w bardzo dobrych periodykach. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego – oczywiście o tyle na ile jest to obecnie możliwe. Wstęp i omówienie badań w

języku polskim oceniam dobrze, jest przejrzysty i zwarty. Zdziwiła mnie tylko wielka rozbieżność pomiędzy podawaną przypuszczalną liczbą gatunków rodzaju: ok. 1600 w części polskie rozprawy, ok. 1000 w artykule [1], 1100 w artykule [2], 1600 w manuskrypcie [3]. Rozumiem, że stopień zbadania tej grupy jest nie satysfakcjonujący, ale rozbieżność jest olbrzymia. Przygotowując się do napisania recenzji czytałam u innych autorów, że liczba jest między 800, a 1400 (?). Proszę Doktorantkę o odniesienie się do tego tematu podczas obrony.

Rozprawa ma charakter pracy zbiorowej, każdy z przedstawionych artykułów/manuskrypt ma od trzech do pięciu autorów. Doktorantka jest pierwszym autorem w każdej z nich, ale autorem korespondencyjnym tylko w pierwszym artykule. Dlaczego? Do rozprawy załączono oświadczenia o udziale poszczególnych autorów. W mojej opinii, ze względu na to, że dotyczą one prac wykonanych na stopień doktora powinny być bardziej szczegółowe, np. nie wiem jakie badania laboratoryjne wykonywała doktorantka przy artykule „Micromorphology of labellum (...)”, bo preparaty i zdjęcia SEM oraz analizy molekularne były wykonywane przez współautorów. Proszę aby w trakcie obrony doktorantka więcej powiedziała o swoim wkładzie w przygotowanie poszczególnych artykułów.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska pani mgr Aleksandry Burzackiej-Hinz w pełni spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2, Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję, o wyróżnienie rozprawy.

Agnieszka Popiele