

Recenzja pracy doktorskiej pana mgr **Grzegorza Migdałka** zatytułowanej:

**„Population genetic diversity and relationships between two closely related forest violets *V. reichenbachiana* Jordan ex Bor. and *V. riviniana* Rchb. (Violaceae) based on nuclear, plastid and AFLP markers ”.**

Polimorfizmu markerów genetycznych jest obecnie powszechnie wykorzystywany jako źródło informacji przy testowaniu różnorodnych hipotez w biologii ewolucyjnej, filogenetyce i taksonomii roślin.

Pierwsze markery genetyczne, zastosowane w badaniach na skalę populacyjną (takie jak allozymy), dzięki prostemu dziedziczeniu i kodominacji umożliwiły między innymi testowanie hipotez związanych z hybrydyzacją i introgresją. Badania polimorfizmu typu RFLP, z wykorzystaniem analizy restrykcyjnej dla oczyszczonych preparatów organellowego DNA, przyczyniły się do rozwoju biogeografii linii filogenetycznych, umożliwiając np. rekonstrukcję dróg kolonizacji roślin z obszarów refugialnych.

Drugi etap nastąpił po upowszechnieniu się analizy fragmentów DNA amplifikowanych *in vitro* w reakcji PCR. Możliwość uzyskania homologicznych fragmentów DNA dla dużej próby osobników przy pomocy starterów specyficznych dla różnych rejonów genomu, doprowadziło do eksplozji technik molekularnych. Użyteczność polimorfizmów takich jak AFLP, ISSR i SSR testowano początkowo u roślin uprawnych, później znalazły się one wśród najczęściej wykorzystywanych markerów genetycznych. Metody generowania tego typu markerów są stale rozwijane, a część z nich umożliwia profilowanie wielu loci jednocześnie. Do postępu badań przyczynił się również spadek kosztów sekwencjonowania i automatyzacja tej procedury.

Obecnie wchodzimy w trzeci etap rewolucji związanej z wykorzystaniem w badaniach populacyjnych masowych danych generowanych przez sekwenatory nowych generacji. Rozwija się genomika populacyjna i filogenetyka genomowa.

W recenzowanej pracy bada się przydatność dwóch klas markerów, AFLP oraz mutacji sekwencyjnych, do testowania hipotezy o introgresywnym pochodzeniu populacji allopoliploidalnego gatunku *Viola riviniana*, kolonizującego nowy typ środowisk powstałych w wyniku wydobywania rud metali ciężkich. Hipotezę tę przedstawiono we wcześniejszej publikacji, której doktorant jest jednym ze współautorów. Postulowano w niej, że odmienne fenotypowo populacje zasiedlające hałdy mogły powstać w wyniku wstecznego krzyżowania hexaploidalnych hybrydów F1 (*V. reichenbachiana* x *V. riviniana*) z *V. riviniana*.

W pracy na większą skalę wykorzystano polimorfizm AFLP. Jego zaletą jest możliwość jednoczesnej analizy wielu zmiennych loci, a głównym ograniczeniem jest dominujący

charakter generowanych prążków. Może sprawiać kłopoty interpretacyjne, szczególnie w przypadku allopoliploidalnych gatunków o zmiennym poziomie ploidalności. W recenzowanej pracy podjęto zatem próbę znalezienia dodatkowych specyficznych gatunkowo markerów, zarówno dla jednego rodzicielsko dziedzicznego genomu chloroplastowego, jak i genomu jądrowego.

W pracy zbadano dla większości populacji również polimorfizm sekwencyjny chloroplastowego rejonu międzygenowego (psbA- trnH). Rejon ten znany jest ze swojej zmienności, stąd proponowany jest jako dodatkowy „barkod” dla roślin lądowych. Dla wybranych prób sekwencjonowano również trzy inne regiony: fragmenty genów rbcL i matK z genomu chloroplastowego oraz sekwencje ITS1 i ITS2 (łącznie z genem 5.8s) z wielogenowej rodziny genów rDNA.

Praca poświęcona jest analizie zmienności tych markerów u dwóch blisko spokrewnionych gatunków z rodzaju *Viola*, z sekcji *Viola*, subsekcji *Rostratae*. Odmianą rolę w ewolucji tego rodzaju odegrała allopoliploidyzacja, która doprowadziła do powstania obecnego zróżnicowania taksonomicznego. Rodzaj obejmujący około 600 gatunków podzielonych na 16 sekcji, z czego tylko 20 gatunków z 4 sekcji występuje w Polsce. Szacuje się, że udział hybrydyzacji (w tym allopoliploidyzacji) w kształtowaniu różnorodności taksonomicznej w obrębie rodzaju jest jednym z najwyższych wśród roślin naczyniowych (67-88%).

Tak skomplikowana mozaikowa budowa genomu współcześnie żyjących gatunków powoduje, że są one trudną grupą w badaniach populacyjnych opartych na markerach genetycznych. Gatunki różnią się poziomem ploidalności;  $2n=4x=20$  dla *V. reichenbachiana* i  $2n=8x=40$ , dla *V. riviniana*. Oba uważa się za allopoliploidy przy czym ten ostatni gatunek jest neo-allopoliploidem. Jednym z gatunków rodzicielskich dla oktoploiploida jest tetraploidalny *V. reichenbachiana* (genom A według Van der Hofa et al. 2008). Według pesymistycznej hipotezy „dawca” drugiego genomu (B) już wymarł. W kilku europejskich populacjach wykryto również hybrydy międzygatunkowe o pośredniej liczbie chromosomów ( $2n=3x=30$ ) charakteryzujące się obniżoną płodnością. W niektórych populacjach sugeruje się obecność introgresantów powstałych głównie przez krzyżowanie wsteczne w kierunku *V. riviniana*. Występowanie tego typu introgresantów postulowane jest w populacjach zasiedlających łąki pokopalniane.

Praca doktorska pana magistra Grzegorza Migdałka została wykonana w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Elżbiety Kuty, z udziałem dr Anety Słomki jako promotora pomocniczego. W zespole tym prowadzi się od dawna wszechstronne badania cytogenetyczne i biosystematyczne nad kilkoma rodzimymi gatunkami z tego rodzaju. Do repertuaru stosowanych metod postanowiono włączać markery genetyczne, co przyniosło już rezultaty publikacyjne. Recenzowana praca wpisuje się w ten nurt.

Praca napisana jest w sposób bardzo kompetentny, a kolejne jej fragmenty wykazują dużą wiedzę autora, zarówno co do problematyki związanej z analizą genetyczno-populacyjną jak i filogenetyką molekularną.

W rozdziale wstępnym wstępie autor wyczerpująco scharakteryzował biologię, taksonomię i rozmieszczenie geograficzne badanych taksonów, na tle całego rodzaju *Viola*. W osobnym rozdziale scharakteryzował rolę hybrydyzacji w ewolucji roślin naczyniowych, w oparciu o ostatnie prace przeglądowe. Na tym tle ukazana została ewolucja w rodzaju *Viola*. Kolejną część wstępu (wydzieloną jako podrozdziały 1.4 i 1.5) omawia wykorzystanie polimorfizmu sekwencyjnego (podrozdział 1.4) i polimorfizmu opartego na wykorzystaniu PCR w systematyce i filogenetyce roślin.

### **Cele pracy są zawarte są w trzech punktach**

- 1) Zbadanie przydatności organellowych i jądrowych (ITS) „sekwencji barkodowych” do identyfikacji *V. reichenbachiana* i *V. riviniana*.
- 2) Próba wykorzystania wykrytych mutacji do wyjaśnienia pochodzenia populacji *V. riviniana* kolonizujących łąki pokopalniane.
- 3) Porównanie zróżnicowania wewnątrz- i międzypopulacyjnego obu analizowanych gatunków, głównie z terenu Polski na podstawie markerów AFLP. Analiza ta miałaby być podstawą do oceny wpływu hybrydyzacji i introgresji na zmienność fenotypową obu gatunków.

Takie krótkie wypunktowanie celów badań jest moim zdaniem zbyt lakoniczne. Na wstępie tego rozdziału przydatne byłoby krótkie wyjaśnienie przyczyn dla których podjęto badania na rozszerzonym materiale oraz uzasadnienie tego, dlaczego potrzebne były dodatkowo właśnie takie markery?. Czy wynikało to jedynie z możliwości technicznych i finansowych, czy z innych powodów.? Co prawda, niektóre szczegóły można znaleźć w różnych fragmentach obszernego wstępu, jednak dla lepszego odbioru pracy warto byłoby je powtórzyć w rozdziale .

### **Materiał użyty w badaniach.**

Badania przeprowadzono dla próby roślin zebranych z 28 lokalizacji, głównie z terenu Polski (po 5-11 roślin na populację). Próby z 19 populacji zbadano pod względem polimorfizmu AFLP, uzupełniając dane uzyskane dla 9 populacji badanych poprzednio, których wyniki możemy znaleźć w pracy Kutny et al. (2014). Dla roślin 21 populacji analizowano polimorfizm sekwencyjny rejonu *psbA-trnH*, uzyskując łącznie 60 sekwencji. Pozostałe rodzaje markerów (*rbcl* i *matK* oraz *ITS*) badano w nielicznych próbach ( odpowiednio, 5 i 7 populacji).

Matryca danych jest zatem niejednorodna. Pełny zestaw markerów analizowano jedynie dla czterech populacji, po jednej dla każdego z czterech grup. Oprócz jednej populacji *V. reichenbachiana* i *V. riviniana* badano populacje uznane w całości za hybrydowe (Skała Kmity) lub introgresywne (Chrzanów- Sośnica). Wśród badanych populacji przeważały populacje *V. riviniana* (11) i *V. reichenbachiana* (10). W dwóch lokalizacjach postulowano sympatryczne występowanie hybrydów i *V. riviniana* (Czarniejewo, Tarnów) a w jednej (Skała Kmity) tylko hybrydów. Niejasne jest jednak czy populacje oznaczone jako **Vh** to hybrydy pokolenia F1. Warto byłoby również wyjaśnić, według jakich kryteriów dobrano materiał do badań, dlaczego dla różnych

markerów próba roślin jest różna, dlatego sięgnięto po próby z odległych geograficznie populacji (Albania, Anglia).

W pracy (Rozdział - Wyniki) znajdziemy również drzewa filogenetyczne dla *rbcl*, *matK*, *ITS* dla innych gatunków *Viola* z sekcji *Plagiostigma*, *Melanium*, *Chamaemelanium*. Sekwencje te pochodzą z ogólnodostępnej bazy NCBI, o czym wspomniano w opisie rysunków 9, 10, 15. Nie wyjaśniono jednak tego czy uzupełniono je sekwencjami autora?. Jeżeli nie to drzewa te powinny znaleźć we wstępie. Wykaz wykorzystanych sekwencji z podaniem numeru akcesyjnego powinien znaleźć się w pracy np. w formie dodatku.

### **Metody badania zmienności markerów DNA.**

Głównym typem markera użytym w pracy był polimorfizm AFLP. Wykorzystano go do analizy zmienności wewnątrzpopulacyjnej, zróżnicowania międzypopulacyjnego i międzygatunkowego badanych prób. Do opisu polimorfizmu użyto standardowych parametrów genetyczno- populacyjnych (P, H<sub>j</sub>, H<sub>t</sub>, H<sub>S</sub>, G<sub>st</sub>). Zastosowano również trzy metody grupowania – analizę głównych współrzędnych –PcOA (dla 114 roślin), analizę sieci NeighbourNet (dla większej próby 203 roślin oraz grupowanie bayesowskie korzystając z programu STRUCTURE. Przeprowadzono również analizę „wariancji molekularnej” (MANOVA), test Mantela oraz oszacowano współczynnik pokrewieństwa F (d) pomiędzy osobnikami. Dla danych sekwencyjnych wygenerowano drzewa filogenetyczne (Maximum Likelihood lub metodą parsymonii) oraz sieci obrazujące relacje filogenetyczne pomiędzy wykrytymi haplotypami *psbA-trnH*.

Nie mam większych uwag co do sposobu prezentacji danych z jednym wyjątkiem. Dotyczy to kolejności referowania wyników. Moim zdaniem bardziej odpowiedni byłby układ w którym najpełniej analizowany polimorfizm AFLP, omawiany byłby na początku. W następnej kolejności można byłoby dodać najpowszechniej zastosowany marker chloroplastowy (*psbA-trnH*), a dopiero na końcu sekwencje, które analizowano dla najmniejszej liczby prób.

Nie rozumiem również podwodów dlaczego omówienie polimorfizmu sekwencyjnego rejonu *psbA-trnH*, zostało podzielone na dwie części (stad np. dwa rysunki 12 i 17 co utrudnia porównanie holotypów ). Takie rozwiązanie powodują mozaikowość tekstu , co utrudnia śledzenie argumentacji autora.

W przypadku rejonu *psbA-trnH* miejsca polimorficzne podzielono na kilka klas: substytucje (3), indele oraz mikrosatelity (SSR). Mam wątpliwości, czy polinukleotydowe segmenty w pozycjach 12-26, 145-177 oraz 178 -202 to powtórzenia mikrosatelitarne. Według definicji to tandemowe powtórzenia motywu o długości od 1-5(6) nukleotydów. W rejonach tych występują raczej insercje-delecje segmentów 19 nukleotydowych złożonych z A i T.

## Jakie są główne wyniki uzyskane w pracy?

Wyniki pracy sugerują, że populacje zasiedlające hałdy pokopalniane nie są pochodzenia introgresywnego oraz że hybrydyzacja i introgresja nie odgrywają obecnie dużej roli w kształtowaniu zmienności fenotypowej badanych gatunków. Dotyczy to przynajmniej populacji z terenu Polski. Możliwe jednak, że na uzyskane wyniki wpływ mogą mieć ograniczenia związane z zastosowaniem głównie dominujących markerów AFLP u gatunków charakteryzujących się skomplikowanym składem genomowym. Próba znalezienia dodatkowych markerów nie przyniosła odkrycia specyficznych gatunkowo sekwencji. Nie jest to zaskakujące w sytuacji gdy oba taksony zawierają wspólny genom jądrowy (A) i prawdopodobnie wspólny genom chloroplastowy. Praca przynosi interesujący przykład możliwości (oraz ograniczeń) jak daje zastosowania markerów genetycznych dla kompleksu spokrewnionych taksonów powstałych w wyniku ewolucji retikularnej.

Ciekawa jest hipoteza o kilku obszarach refugialnych dla *V. riviniana* zaproponowana po analizie grupowania w populacji programie STRUCTURE. Zastanawiam się jednak na tym czy uzyskany obraz nie wynika z neo-allopoliploidalnego pochodzenia *V. riviniana*, który powinien stale zawierać zmienność obu gatunków rodzicielskich.

W ostatnim akapicie podsumowania autor przedstawia swoją wizję rozwoju badań stwierdzając, że konieczne byłoby przetestowanie kolejnych markerów, nie obciążonych wadami AFLP (dominacja) czy ITS (rodzina genowa ulegająca ewolucji zgodnej) dla wyszukania specyficznych gatunkowo mutacji. Kandydatami byłyby introny unikatowych sekwencji genowych wykorzystywanych ostatnio w filogenetyce roślin, takie jak GPI, SDH czy NRPD2. Proponuje również rozszerzenie badań o materiał pochodzący z całego zasięgu. Według autora przydatne byłyby również uzyskanie sztucznych hybrydów.

Trochę dziwne dla mnie jest całkowite pominięcie markerów chromosomowych, choćby zwykłego liczenia chromosomów, które pozwala wykryć heksaploidalne hybrydy międzygatunkowe. Nie wspomniano również o takich technikach jak genomowa hybrydyzacja in situ (GISH).

W pracy przyjęto podejście ekstensywne. Można zastanawiać się, czy nie lepszym podejściem dla wyjaśnienia pochodzenia populacji kolonizujących hałdy byłaby intensywna analiza populacji lokalnych sąsiadujących z populacjami *V. riviniana* tolerującymi zanieczyszczenie metalami ciężkimi. Wydaje mi się również, że bardziej jednoznaczne wyniki mogłoby przynieść dobrze zaplanowane zintegrowane podejście uwzględniające różnorodne źródła informacji, może również proste doświadczenia porównawcze oparte na doświadczeniu typu „common garden”. Może to być przedmiotem dyskusji podczas obrony pracy.

## Ocena pracy.

Recenzowana praca zawiera kompetentne omówienie wyników badań będących kontynuacją projektu związanego z wyjaśnieniem pochodzenia populacji V. riviniana kolonizujących nowy typ środowisk antropogenicznych.

Praca jest bardzo dobrze napisana, choć zastosowany układ podrozdziałów (ich kolejność we wstępie i kolejność omawianych markerów w wynikach) utrudniają jej odbiór dla czytelnika. Nie wpływa to na wysoką wartość merytoryczną pracy. Doceniam kompetencje warsztatowe autora wykazane przy realizacji projektu doktorskiego, jego dobre przygotowanie teoretyczne, wykazane zarówno w rozdziałach wstępnych jak i części dyskusyjnej pracy.

Podsumowując, mogę stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pana magistra Grzegorza Migdałka spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym..”. Zawiera oryginalną próbę rozwiązania problemu naukowego, wykazuje bardzo dobrą ogólną wiedzę kandydata w obrębie omawianej problematyki badawczej, oraz jego dobre przygotowanie do prowadzenia badań w europejskim środowisku naukowym.

Stawiam zatem wniosek o dopuszczenie pana mgr Grzegorza Migdałka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Ireneusz J. Odrzykoski