



Prof. dr hab. Elżbieta Kuta
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ
Zakład Cytologii i Embriologii Roślin
Instytut Botaniki
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
Tel: 12 664 5020
e-mail: elzbieta.kuta@uj.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Wróblewskiej pt.: „**Mechanizmy i przejawy zmienności fenotypowej u wybranych przedstawicieli rodzaju *Magnolia***”

Przedstawiona do recenzji praca porusza bardzo interesujące zagadnienia dotyczące znaczenia wybranych cech organów generatywnych i wegetatywnych u kilku gatunków rodzaju *Magnolia* do wykazania zmienności wewnątrz- i międzygatunkowej, użyteczności tych cech w taksonomii i filogenezie rodzaju oraz mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowaną zmienność. Rozprawa włącza się w nurt aktualnych badań światowych z zakresu evo-devo czyli gałęzi biologii badającej powiązania między ewolucją a rozwojem różnych organizmów. Aktualne badania nad procesami różnicowania roślin są oparte, w większości, na analizie wzorów ekspresji genów, roli mikro-RNA, liczne dotyczą budowy kwiatu roślin okrytonasiennych. Modelem roślinnym jest *Arabidopsis* chociaż, analizując prace z ostatnich kilku lat, genetyczne podłoże budowy kwiatu u wielu gatunków z różnych rodzin roślin jedno- i dwuliściennych jest w dużej mierze poznane. Szczególnie ważne są badania nad roślinami pierwotnymi (basal angiosperms) określanymi jako ANITA grade. Badania podłoża genetycznego zmienności cech organów roślinnych muszą być powiązane z analizą morfologiczno-anatomiczną. Oceniana praca doktorska reprezentuje takie podejście – modelem badawczym są gatunki z rodzaju *Magnolia*, należącego do prymitywnej gałęzi roślin okrytonasiennych, do analizy zmienności cech wykorzystano metody analizy ekspresji genów i cechy morfologiczno-anatomiczne.

Zanim przejdę do oceny rozprawy muszę jasno określić na jakim materiale się opierałam i jakie kryteria przyjąłam. Problem polegał na tym, że jako rozprawę dokorską otrzymałam opracowanie w formie wydruku maszynowego z materiałem ilustracyjnym, tabelami i załącznikami. Równocześnie, Autorka na końcu spisu literatury przedstawiła spis publikacji własnych czyli 3 prace. W dwóch była jedynym autorem w jednej współautorem. Dwie oryginalne prace zawierają całość wyników dotyczących zmienności w budowie kwiatu i genetycznego podłoża tej zmienności oraz zmienności w budowie elementów drewna, głównie typu perforacji i zgrubień naczyń, które są przedstawione w przedłożonej do oceny rozprawie:

- 1) Wróblewska M. 2015. The progressive and ancestral traits of the secondary xylem within *Magnolia* clad-the early diverging lineage of flowering plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 84(1): 87-96.
- 2) Wróblewska M, Dołzbłasz A, Zagórska-Marek B. 2015. The role of ABC genes in shaping perianth phenotype in the basal angiosperm *Magnolia*. *Plant Biology* 18(2): 230-238.

Trzecia praca jest przeglądowym artykułem o genetycznym podłożu budowy kwiatu roślin okrytonasiennych. Informacje w niej zawarte są również we Wstępie i Dyskusji w rozprawie przesłanej do oceny.

Turczyn M. 2011. ABC architektury kwiatu. *Postępy Biologii Komórki* 38(4):673-684.

Nowymi w recenzowanej rozprawie są wyniki wewnątrzgatunkowej zmienności wzorów filotaktycznych szupkowiec.

W mojej ocenie te dwie oryginalne prace byłyby wystarczające jako zestaw prac przedstawionych w postępowaniu o uzyskanie stopnia doktora. Część uwag, które zawarłam w recenzji po przeczytaniu rozprawy, zostały już uwzględnione w wydrukowanych pracach. To jest niewątpliwie wielki sukces Doktorantki. Przy swoich uwagach do rozprawy odniosę się do opublikowanych już dwóch prac.

Recenzję przeprowadzę stosując następujące kryteria oceny: 1) wymogi formalne, redakcyjne, dotyczące układu rozprawy; 2) jasność sprecyzowanych celów badawczych i spójność tematyki badawczej oraz stawiane hipotezy; 3) nowatorskość tematyki badawczej i znaczenie badań dla dziedziny; 4) zgodność omawianych zagadnień we Wstępie z tematyką pracy; 5) poprawność wyboru i opisu metod stosowanych i wykorzystywanych w rozprawie; 6) sposób prezentacji wyników, dobór materiału ilustracyjnego i najważniejsze wyniki, uwagi; 7) dyskusja jako odniesienie się do danych literaturowych, a nie powtórzenie wyników; 8) Podsumowanie i wnioski jako synteza problemu badawczego.

Ad. 1) Wymogi formalne. Rozprawa spełnia wszystkie formalne wymogi. Pod względem redakcyjnym składa się z następujących rozdziałów: Streszczenia (w j. polskim i angielskim), Wstępu, Celu pracy, Materiałów, Metod, Wyników, Dyskusji, Podsumowania, Wykazu skrótów, Literatury w tym spisu własnych publikacji oraz Załączników. Rozprawa Liczy 187 stron tekstu łącznie z materiałem ilustracyjnym i spisem literatury, zawiera 6 tabel, 7 wykresów, 5 schematów, 1 mapkę, 15 plansz z fotografiami oraz 6 załączników. Spis literatury obejmuje 203 pozycje.

Ad. 2) Cele pracy. Cel nadrzędny został jasno sprecyzowany - wykazanie zmienności fenotypowej u kilku gatunków *Magnolia* jako cechy wskazującej na ewolucyjny progres w grupie magnoliidów czyli pierwotnych roślin okrytonasiennych. Cel ten był realizowany przez analizę zmienności cech kwiatu i genetycznego podłoża tej zmienności w tym budowy okwiatu i generatywnej filotaksji oraz zróżnicowania w budowie elementów ksylemu wtórnego. Nie postawiono natomiast hipotez badawczych, które były łatwe do sprecyzowania analizując cele badawcze.

Ad. 3) Nowatorskość tematyki badawczej. Tematyka rozprawy, co prawda, nie jest nowatorska bowiem genetyczne podłożo zmienności architektury kwiatów jest obiektem badań od co najmniej 16 lat, czyli od znanej pracy Coena i Meyerowitza z 1991 r. W kolejnych latach, badania obejmowały rośliny o różnych wzorach kwiatowych, w tym również niektóre gatunki magnolii. Podobnie, jest wiele prac nad zmiennością generatywną filotaksji, w tym również nad przedstawicielami rodzaju *Magnolia* oraz nad zmiennością cech budowy drewna i znaczeniu tych

cech w taksonomii. Natomiast oceniając znaczenie wyników badań przedstawionych w rozprawie, uważam że dostarczają nowych danych bądź są potwierdzeniem hipotez stawianych we wcześniejszych pracach opartych na bardzo skąym materiale roślinnym oraz bez potwierdzenia analizami morfologiczno-anatomicznymi i genetycznymi z wykorzystaniem genów tożsamości modelu ABC. Zatem, jeżeli dostarczają nowych informacji i potwierdzają zakładane hipotezy, to ich znaczenie dla wiedzy nad zmiennością fenotypową, jej podłożem i użytecznością tych cech dla systematyki i filogenezy rodzaju *Magnolia* jest niezaprzeczalne.

Ad. 4) Wstęp pracy. Wstęp jest bardzo obszerny, obejmuje całą problematykę rozprawy. Zajmuje 42 strony i niektóre jego podrozdziały, szczególnie podrozdział o zmienności fenotypowej i jej przyczynach oraz o budowie drewna oparte są na starej literaturze, głównie na podręcznikach. Szkoda, że nie wykorzystano nowszych podręczników akademickich np. „Ewolucja” Futuyma D.J. (2008) czy „Podstawy cytogenetyki roślin” Olszewska M. (2005). Szczególnie dotyczy to przyczyn zmienności wewnątrz- i międzygatunkowej. Nie uwzględniono znaczenia systemów rozmnażania, plastyczności fenotypowej jako efektu działania genów regulatorowych (z tego zakresu liczne prace M. Pigliucciego i współpracowników z ostatnich 10-ciu lat), hybrydyzacji w tym tzw. homoploidalnej mieszańcowej specjacji, introgresji, bardzo pobieżnie omówiono znaczenie poliploidyzacji (liczne prace np. Mallet, Rieseberg, Abbott, Arnold, Soltis). Bardzo szczegółowo i interesująco opisany jest model ABC tłumaczący genetyczne podstawy powstawania poszczególnych elementów kwiatu i jego modyfikacje, zawiera nowe prace i informacje w stosunku do pracy przeglądowej z 2011 autorstwa Doktorantki (pod panieńskim nazwiskiem Turczyn). Szkoda, że w rozprawie ani w opublikowanej pracy nie uwzględniono znaczenia roli microRNA w rozwoju kwiatu, a to zagadnienie było szeroko omawiane w ostatnich kilku latach (np. Luo et al. 2013 Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. *Developmental Biology* 380: 133-144 i inne). Zagadnienia dotyczące filotaksji, trudny temat, zostały przedstawione w sposób bardzo jasny i zrozumiały.

Ad. 5) Materiał i Metody. Doktorantka zastosowała różne techniki odpowiednie do celów badań. Materiał roślinny został również poprawnie dobrany. Wybrane gatunki z rodzaju *Magnolia* należały do różnych podrodzajów, sekcji i podsekcji, reprezentowały różny stopień pokrewieństwa i wiek. Dla łatwiejszej orientacji szkoda, że Autorka nie wprowadziła dodatkowej tabeli, w której byłyby wymienione wszystkie gatunki i ich przynależność taksonomiczna oraz badania jakie zostały dla danego gatunku przeprowadzone. Brakuje opisu stanowisk z wyszczególnieniem warunków w jakich poszczególne osobniki rosną (zagęszczenie, oświetlenie, wilgotność, typ gleby itp.). Takie informacje pojawiają się dopiero w rozdziale Dyskusja przy omawianiu ewentualnego wpływu środowiska na filotaksję.

Opis metod jest bardzo szczegółowy. Wystarczyło się powołać na odpowiednie procedury, a bardziej szczegółowo przedstawić tylko te, które były modyfikowane. W takiej formie są opisane w obu publikacjach. Na podkreślenie zasługuje różnorodność wykorzystanych technik, co świadczy o szerokiej znajomości warsztatu badań eksperymentalnych w tym skomplikowanych technik molekularnych użytych do badań nad ekspresją genów tożsamości elementów kwiatów. Poprawne są również wykorzystane testy do analiz statystycznych przy opracowywaniu wyników. Szkoda, że nie zostały włączone techniki skaningowej mikroskopii elektronowej do porównania epidermy elementów kwiatu oraz naczyń.

Ad. 6) Wyniki badań. Wyniki zostały szczegółowo opisane, zestawione w tabelach i prezentowane w formie graficznej, odpowiadając założeniom zawartym w celach pracy. Oparte

są na rzetelnej analizie i opracowane statystycznie. W mojej ocenie **za ważne** wyniki dla wykazania trendów ewolucyjnych u magnoliidów oraz dla celów diagnostycznych można uznać:

- 1) Potwierdzenie zróżnicowania okwiatu na działki kielicha i płatki korony u trzech badanych gatunków z rodzaju *Magnolia* (*M. acumulata*, *M. stellata*, *M. liliiflora*) z różnych podsekcji, należących do taksonów młodszych ewolucyjnie (~25 mln lat). Tożsamość okółka działek kielicha została potwierdzona porównawczą analizą morfologiczno-anatomiczną oraz ekspresją genu *AGL6* z klasy A modelu ABC a barkiem ekspresji *AP3/PI* z klasy B. Tym samym hipotezy o występowaniu zróżnicowanego okwiatu w rodzaju *Magnolia* zostały ewidentnie potwierdzone wynikami powyższych analiz. Ważna cecha, która powinna być dodana do klucza do oznaczania gatunków w rodzaju *Magnolia*.
- 2) Potwierdzenie płatkowego charakteru dodatkowych elementów rozmieszczonych spiralnie (a nie okółkowo) na osi kwiatu u *M. stellata* na podstawie cech anatomiczno-morfologicznych i ekspresji genów modelu ABC. Elementy te mogły mieć pochodzenie pręcikowe, na co wskazywało ich rozmieszczenie na spiralnej osi, lub płatkowe. Wykazanie genetycznego podłoża takiej zmienności na podstawie analizy wzoru ekspresji genów *AP3/PI* i *AGL6* ze wskazaniem modyfikacji modelu ABC – „sliding bondary” jest nowym doniesieniem.
- 3) Potwierdzenie istnienia dużej wewnątrzgatunkowej zmienności we wzorze filotaksji u *M. acuminata* a przede wszystkim znalezienie u jednego osobnika wzoru, który z teoretycznego punktu widzenia był niemożliwy do wystąpienia w naturze. Dodatkowo, potwierdzono jego występowanie w następnym roku u tego samego osobnika. Czyli nie był to błąd w obliczeniach, ale nowy „niezwykły” wzór, co może być kolejnym dowodem na istnienie zjawiska „odcisku palca”.
- 4) Wykazanie występowania zaawansowanych cech naczyń z prostymi płytami perforacyjnymi u kilku gatunków oraz ustalenie korelacji między zaawansowanym typem naczyń a wiekiem taksonów – u starszych taksonów naczynia o cechach prymitywnych z płytami perforacyjnymi drabinkowymi.
- 5) Analizując wszystkie wyniki ważną konkluzją jest adaptacyjna, ewolucyjnie korzystna rola takiej zmienności w grupie pierwotnych roślin.

Ad. 7) Dyskusja. Autorka ciekawie przeprowadziła dyskusję interpretując swoje wyniki i odnosząc je do danych literaturowych. Wykazała się znajomością literatury z tak szerokiego zakresu zagadnień.

Ad. 8) Posumowanie i Wnioski. Podsumowanie jest zwięzłym wypunktowaniem najważniejszych wyników. Wskazano kierunki dalszych badań natomiast nie zostały przedstawione wnioski.

Uwagi, pytania:

- a) Odnosnie porównawczej anatomii elementów kwiatu i liścia:
 - brak informacji o typie aparatów szparkowych występujących w epidermie poszczególnych elementów – jeden typ czy różne?
 - przy porównawczej analizie anatomicznej dodatkowych elementów płatko-podobnych ułożonych spiralnie w rejonie pręcikowia bark porównania z cechami pręcika. Takie porównanie znajduje się w opublikowanej pracy
 - do tabeli 1 powinny zostać włączone wyniki pomiarów *M. sieboldii*
 - zdjęcia przekrojów przez elementy kwiatu wszystkich gatunków nie są dobrej jakości. Układ komórek miękiszu jest podobny do gąbczastego w liściu na niektórych zdjęciach

(Rys. 7k,l; 12j, g,h), duże przestwory komórkowe przypominają kanały (Rys. 13j) mogą to być artefakty związane z metodyką (utrwalanie, przesycanie żywicą).

- b) Odnośnie modyfikacji modelu ABC w przypadku dodatkowych elementów:
Dla mnie bardziej pasuje do modyfikacji „fading borders” chociaż nie zaobserwowano u tego gatunku stopniowego przechodzenia jednych elementów okwiatu w drugie, ale mogło to wynikać ze słabej ekspresji. Szkoda, że nie potwierdzono tego typu modyfikacji u *M. obovata* lub *M. virginiana* o podobnych cechach kwiatu.
- c) Odnośnie generatywnej filotaksji: jak wynika z Rys. 17 u badanych okazów magnolii słupkowie wyraźnie różniły się wielkością. Nie jest dla mnie jasne na ile wzory filotaksji są skorelowane z długością słupkowie. Dlaczego nie dokonano takich korelacji? Z czego wynika tak duża rozpiętość wielkości słupkowie u osobników tego samego gatunku? Czy u jednego osobnika wielkość jest porównywalna u 100 analizowanych słupkowie?
- d) Odnośnie drewna badanych gatunków magnolii: porównanie drewna pnia i gałęzi bocznych u badanych gatunków dałoby odpowiedź czy istnieją różnice pomiędzy tymi organami. Nie jestem przekonana czy dodawanie zmiennej cechy do kluczy do oznaczania gatunków nie wprowadzi większego zamieszania. Informacja o progresie ewolucyjnym ujawniającym się w typach naczyń jest bardzo ważną informacją. Natomiast czy cechy naczyń mogą być rozstrzygające o przynależności do danego gatunku przy możliwości wykorzystania innych cech? W Tabeli 4 gatunki powinny być przypisane do sekcji oraz stanowiska. W opublikowanej pracy w ASBP takie informacje zostały dodane w tabeli (Tab. 1).
- e) Odnośnie terminologii: termin rośliny kwiatowe jest dyskusyjny w odniesieniu wyłącznie do roślin okrytonasiennych, a jak rozumiem Autorka stosowała ten termin dla określenia roślin okrytonasiennych.

Uwagi redakcyjne:

- 1) Materiał ilustracyjny w rozprawie jest oznaczany jako Rys. bez rozgraniczenia na wykresy, plansze ze zdjęciami itp.
- 2) W opisie Rys. 30 nie podano źródła na podstawie którego (których) zostało narysowane drzewo filogenetyczne
- 3) Literatura – cytacje w tekście i w spisie
Większość pozycji cytowanych w tekście zostało zamieszczone w spisie literatury. Poniżej są wymienione nieścisłości:
 - Frohlich 2006 cytowana w tekście; brak w spisie literatury
 - Xu 2006 cytowana w tekście; brak w spisie literatury
 - pozycje 42-44 oraz 142-144 w spisie literatury nie są w kolejności alfabetycznej
 - Niklas 1989 w tekście, w spisie literatury 1988
 - nieujednolicone piśmiennictwo nazw czasopism np. pozycja 148
 - nieujednolicone piśmiennictwo tytułów prac w czasopismach np. pozycje 24, 200
- 4) W tekście są nieliczne literówki

Podsumowanie

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam wysoko. Autorka wykazała się szeroką wiedzą z zakresu podjętej tematyki badawczej, umiejętnością planowania i przeprowadzania badań oraz interpretacji uzyskanych wyników. Cele postawione w pracy w pełni zrealizowała. Wyniki mają duże znaczenie dla zrozumienia mechanizmów zmienności fenotypowej w ważnej grupie pierwotnej linii roślin okrytonasiennych jakimi są magnoliidy, w obrębie której wykształciły się cechy zaawansowane. Wyniki dotyczące zmienności w budowie

kwiatów oraz drewna zostały już opublikowane w czasopismach indeksowanych w Web of Science, co świadczy o ich dużej wartości.

Proszę Doktorantkę o przygotowanie na obronę pisemnych deklaracji autorów o udziale w publikacji Wróblewska M, Dołzbłasz A, Zagórska-Marek B. 2015. The role of ABC genes in shaping perianth phenotype in the basal angiosperm *Magnolia*. Plant Biology 182: 230-238.

Wniosek końcowy

Po szczegółowej analizie i ocenie rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Wróblewskiej pt.: „Mechanizmy i przejawy zmienności fenotypowej u wybranych przedstawicieli rodzaju *Magnolia*” uważam, że praca spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z 14 marca 2003 r. (Dz. Ustaw 65/03, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Występuję z wnioskiem do Rady Wydziału Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Wrocławskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Wróblewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę zakres i poziom przeprowadzonych badań jak również ich wartość dla zrozumienia znaczenia zmienności fenotypowej w ewolucji i adaptacji przedstawicieli rodzaju *Magnolia*, ważnej grupy pierwotnych roślin okrytonasiennych, wnoszę o nagrodzenie rozprawy.

Kraków, 07 sierpnia 2016 r.

Prof. dr hab. Elżbieta Kuta