

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Edyta Jermakowicz

**Filogeografia, różnorodność genetyczna i demografia borealno – górskiego storczyka
Malaxis monophyllos (L.) Sw.**

Historia kształtowania się geograficznych zasięgów roślin jest jednym z ważniejszych zagadnień biologii ewolucyjnej. W dobie zachodzących zmian klimatycznych i siedliskowych, dostarcza również istotnych informacji przy planowaniu strategii ochrony gatunków. Większość doniesień dotyczących reakcji roślin na zachodzące zmiany, prezentuje osobno podejście demograficzne i genetyczne. Natomiast pełna wiedza na temat dynamiki zasięgów gatunków w przestrzeni i czasie, wymaga uwzględniania zarówno geograficznego rozmieszczenia zmienności genetycznej, jak również historycznych i współczesnych procesów demograficznych mających miejsce w populacjach.

Obraz genetycznej struktury populacji roślin w zasięgu geograficznym może pomóc zinterpretować szereg zachodzących procesów takich jak mutacje, przepływ genów, selekcję czy dryf genetyczny. W ostatnich latach ważnym celem badań nad rozmieszczeniem genetycznej różnorodności jest również identyfikacja centrów (ang. hotspots) genetycznej różnorodności, które mogą mieć różne pochodzenie (związane m.in. z lokalizacją refugium lub/i populacjami reliktowymi czy stref wtórnego kontaktu). Mimo dużego zróżnicowania struktury genetycznej wśród roślin, zarysowują się często wyraźne wzorce filogeograficzne charakterystyczne dla poszczególnych grup. Dotyczą one m.in. obszarów refugialnych, kierunków i barier dla przepływu genów oraz stref kontaktu różnych linii ewolucyjnych. Wzorce te najlepiej poznano dla roślin o dysjunktywnym zasięgu, w szczególności z grupy gatunków arktyczno–alpejskich. Gatunki o podzielonym zasięgu obejmują również taksony borealno–górskie, związane z łagodniejszym klimatem i szerzej rozprzestrzenione niż gatunki arktyczno – alpejskie. Mimo wzrastającej liczby prac filogeograficznych, wiedza na temat gatunków borealno–górskich jest w dalszym ciągu ograniczona i wiele problemów wymaga wyjaśnienia. Dostępne dane, wskazują na znaczne różnice między gatunkami arktyczno–alpejskimi i borealno–górskimi. Dotyczą one przede wszystkim słabo zarysowującej się struktury filogeograficznej w przypadku tej drugiej grupy. Z kolei podobieństwa między tymi grupami, obejmują m.in. niską różnorodność genetyczną utrzymującą się na poziomie gatunku oraz lokalizację ich refugium, w tym refugium azjatyckich (Beringa, Azja Centralna), oraz europejskich makrorefugium

(Alpy, Bałkany) i mikrorefugiów (Karpaty, Masyw Czeski). Słabo zarysowująca się struktura filogeograficzna jest szczególnie trudna w interpretacji, ze względu na wiele czynników, które mogą na nią wpływać, tj.: 1) post-glacialna kolonizacja z wielu źródeł, 2) wielokierunkowy przepływ genów, 3) niekompletne rozdzielenie linii filogenetycznych, czy 4) właściwości gatunku oraz historia poszczególnych populacji. Ten ostatni czynnik jest często podkreślany, jako wyjątkowo istotny w kształtowaniu genetycznych wzorców u roślin. Ponadto, modele klimatyczne dla Europy pokazują, że przyszłe zmiany będą obejmowały głównie wzrost temperatur oraz zmniejszenia się ilości opadów. Taki scenariusz może być szczególnie dotkliwy dla gatunków o zasięgu północnym, zarówno w kontekście liczebności ich populacji, cech biologii, jak i zmian zasięgów, które mogą się zmniejszać i przesunąć w kierunku północnym. Niektórzy autorzy proponują również koncepcję „warm-stage refuges” dla gatunków górskich, czyli chłodnych ostoi, w kontekście globalnego ocieplenia klimatu. Koncepcja ta może mieć znaczący wpływ na obecnie obserwowane wzorce różnorodności genetycznej tej grupy roślin.

Ogromne zróżnicowanie rodziny *Orchidaceae* sprzyja rozpatrywaniu problemów ewolucyjnych, ekologicznych, jak również związanych z ochroną gatunkową. Łączny efekt cech historii życiowych storczyków (kiełkowanie zależne od dostępności grzyba, owocowanie uzależnione od obecności zapylaczy), sprawia, że są one ważnymi wskaźnikami zmian zachodzących w siedliskach oraz stanowią jedną z najbardziej zagrożonych globalnie grup organizmów. Często obserwowana, negatywna reakcja storczyków na zmiany siedliskowe sprzyja ich niskiej odporności na przyszłe zmiany klimatyczne. Ponadto, w małych i izolowanych populacjach storczyków, na skutek nielosowego kojarzenia, może dochodzić do dryfu genetycznego, a w konsekwencji spadku różnorodności genetycznej i możliwości adaptacji gatunku do zmian środowiskowych. Genetyczne zubożenie małych populacji nie może być jednak przyjmowane *a priori*, a powinno być określane dla każdego gatunku oddzielnie, z uwzględnieniem jego historii oraz cech biologii.

Malaxis monophyllos (L.) Sw. (wyblin jednolistny) można uznać za gatunek modelowy do rozpatrywania prezentowanych zagadnień. Jego zasięg geograficzny charakteryzujący się fragmentacją, obejmuje obszar pokrywający się z zasięgiem lasów mieszanych strefy borealnej oraz z zasięgiem regla dolnego masywów górskich południowej i centralnej Europy. Jako przedstawiciel rodziny *Orchidaceae*, odznacza się specyficznymi cechami biologii, a jako gatunek związany z zanikającymi siedliskami jest uznany za zagrożony wyginięciem w wielu europejskich krajach. Wybór tego gatunku pozwolił również na analizowanie różnorodności genetycznej i demograficznej, w kontekście zróżnicowania siedliskowego, włączając w to rolę

siedlisk antropogenicznych w kształtowaniu wzorców zmienności gatunku. Ta ostatnia kwestia dotyczy działalności człowieka, która oprócz niszczenia naturalnych siedlisk, prowadzi też do tworzenia nowych, oraz do powstawania ekologicznej heterogeniczności, która może różnorodności sprzyjać. Nowopowstałe populacje stwarzają możliwości do zachodzenia zmian adaptacyjnych, powodowanych rozszerzaniem się nisz ekologicznych. Mogą one również spełniać rolę pomostów lub źródeł, które wspierają przepływ genów między izolowanymi populacjami. Problem roli populacji na siedliskach antropogenicznych w kształtowaniu demograficznej i genetycznej struktury na poziomie gatunku jest bardzo słabo poznany.

Biorąc pod uwagę wyżej opisane problemy, **głównym celem mojej rozprawy doktorskiej było ustalenie genetycznych i demograficznych wzorców zmienności dla borealno - górskiego storczyka *Malaxis monophyllos* (L.) Sw., w jego podzielonym zasięgu geograficznym.** Spodziewałam się, że wzorce różnorodności genetycznej *M. monophyllos* będą kształtowane, przede wszystkim, przez czynniki historyczne, związane z przesuwaniem i kurczeniem się jego zasięgu podczas czwartorzędu, co wpływało na przepływ genów między populacjami i ich podział. Biorąc pod uwagę znane fakty, postawiłam również hipotezę, że wzorce te są w dużej mierze zależne od biologii gatunku, w szczególności możliwości dyspersji oraz wielkość populacji. Ponadto założyłam, że obserwowana fragmentacja zasięgu *M. monophyllos* w Europie oraz wyraźne różnice siedliskowe między regionami, wskazują na izolację populacji i w związku z tym, na wyraźne regionalne wzorce demograficzne. Chciałam również sprawdzić, czy zróżnicowanie warunków między siedliskami naturalnymi i antropogenicznymi oraz ich odmienna historia, dodatkowo sprzyjają powstawaniu różnic między populacjami, na poziomie genetycznym i demograficznym.

W pierwszej części moich badań określiłam strukturę filogeograficzną *M. monophyllos* w euroazjatyckiej części jego zasięgu. W tym celu pozyskałam próby z 51 europejskich populacji z borealnej, wyżynnej i górskiej części zasięgu oraz z 17 lokalizacji azjatyckich. Próby przeanalizowałam przy użyciu czterech, polimorficznych sekwencji chloroplastowego DNA (cpDNA: *trnL*, *trnL-trnF*, *rps16*, oraz *accD-psaI*). Analizy te pokazały istnienie 19 haplotypów oraz względnie wysoką różnorodność haplotypową i nukleotydową cpDNA w europejskiej części zasięgu (**Chapter I**). Ujawniły również istnienie trzech centrów różnorodności genetycznej *M. monophyllos* w Europie (alpejskiego, północno-europejskiego oraz wschodnio-europejskiego). Te centra różnorodności mogą być zgodne z lokalizacjami refugium dla tego gatunku, włączając refugium alpejskie. Wysokie wartości różnorodności genetycznej oraz obecność rzadkich haplotypów cpDNA w populacjach z północnej i wschodniej Europy może wskazywać na bliskość mikrorefugium Europy Centralnej, skąd *M.*

monophyllos mógł się rozprzestrzenić w kierunku północnym i wschodnim, lub też kolonizację Europy z refugium wschodnich zlokalizowanych w Azji Centralnej. Wynik ten może również wskazywać na istnienie genetycznego tygla różnych linii ewolucyjnych w Europie północno-wschodniej (**Chapter I**). Mimo relatywnie wysokiej wewnątrzgatunkowej różnorodności, wykazałam brak wyraźnej struktury filogeograficznej *M. monophyllos* w Europie, przejawiający się szerokim rozprzestrzeniem pospolitych haplotypów cpDNA, jak również brakiem istotnych różnic między wartościami zróżnicowania międzypopulacyjnego ($N_{ST}=0,49$ i $G_{ST}=0,45$). Dlatego też, wyniki moich badań nie dowodzą odrębności borealnej i górskiej części zasięgu *M. monophyllos* w sensie genetycznym (**Chapter I**).

W kolejnym etapie pracy zastosowałam analizy AFLP, z użyciem dwóch kombinacji starterów (*EcoRI-ACG/MseI-CAT* oraz *EcoRI-AGC/MseI-CAC*), aby 1) zbadać genetyczną różnorodność wewnątrz oraz między populacjami *M. monophyllos* w Europie oraz 2) rozszerzyć i zweryfikować wyniki badań filogeograficznych uzyskanych metodą sekwencjonowania cpDNA. Populacje *M. monophyllos* w Europie charakteryzują się niską zmiennością genetyczną (zakresy wartości po procedurze resamplingu: $PPL_3=6,7 - 31,8\%$, $Hj_3 = 0,045 - 0,212$ i $DW_3 = 0,36 - 3,91$). Wyniki te wskazują na genetyczne zubożenie populacji, które miało miejsce w trakcie post-glacialnej kolonizacji, oraz na wpływ małej wielkości populacji i inbredu na genetyczną strukturę *M. monophyllos* (**Chapter II**). AFLP tylko częściowo potwierdziło wyniki analizy sekwencji cpDNA dotyczące istnienia trzech centrów różnorodności. Wykazały też wyższy poziom różnorodności genetycznej w borealnych populacjach w porównaniu do populacji górskich (**Chapter II**). Wyraźnie niższy poziom zmienności AFLP w górskich populacjach, może wynikać z globalnie obserwowanego spadku liczebności i genetycznej różnorodności populacji roślin w obszarach górskich. Analizy AFLP i cpDNA nie wskazały jednoznacznie na Alpy, Wschodnie Karpaty czy Masyw Czeski jako refugia (makro- lub mikrorefugia) dla *M. monophyllos* w Europie. Z kolei klimatyczne modele rozmieszczenia gatunku dla okresu ostatniego zlodowacenia, taką możliwość dopuszczają (**Chapter I**).

Słabo zarysowana struktura filogeograficzna *M. monophyllos* w Europie została potwierdzona w analizach AFLP, które pokazały niskie genetyczne zróżnicowanie między populacjami, jak również brak wyróżniających się genetycznych klastrów oraz wysoką admiksję różnych pól genowych w większości populacji (**Chapter II**). Wyniki te mogą być dowodem na istnienie wielokierunkowego przepływu genów między europejskimi populacjami *M. monophyllos*, kiedy zasięg gatunku był prawdopodobnie bardziej ciągły, a populacje mniej izolowane. Jest to zgodne z danymi paleobotanicznymi dla czwartorzędowej historii

europiejskiej flory, które wskazują na możliwość istnienia siedlisk dogodnych dla gatunków borealnych na terenie centralnej i wschodniej Europy, nawet podczas ostatniego zlodowacenia. W związku z tym, obecny zasięg *M. monophyllos* może być jedynie pozostałością po jego późno-glacialnym i wczesno-holoceniowym dużo szerszym zasięgu, który uległ fragmentacji w późniejszych okresach. Fragmentacja ta może postępować w dalszym ciągu, prowadząc do zwiększenia izolacji między populacjami. W konsekwencji, przepływ genów między populacjami będzie ograniczony, co może doprowadzić to do dysjunkcji zasięgu w przyszłości (**Chapter I, II**).

Przeprowadzone przeze mnie analizy demograficzne w 12 populacjach *M. monophyllos* z terenu Polski pokazały ich niezwykle dynamiczny charakter (w czasie i przestrzeni), związany między innymi z intensywną wymianą osobników (**Chapter III**). Efemeryczny charakter populacji jest spójny z koncepcją „klasycznej” metapopulacji, która dopuszcza wielokierunkowy przepływ genów między populacjami, mający odzwierciedlenie w genetycznej strukturze *M. monophyllos* w Europie (**Chapter I, II**). Mimo, że pod względem genetycznym populacje tego gatunku nie różnicują się regionalnie, możemy wyróżnić regionalne wzorce demograficzne, oparte głównie na cechach reprodukcyjnych (**Chapter III**). Analiza wzorców demograficznych wskazuje populacje z borealnej części zasięgu jako te, charakteryzujące się wyższym poziomem reprodukcji. Region borealny, z kolei, jako optymalny dla trwania tego gatunku w Europie, w warunkach przewidywanych zmian klimatycznych (**Chapter I, II, III**).

W kontekście wewnątrzgatunkowej różnorodności, populacje *M. monophyllos* z siedlisk antropogenicznych, mimo niższego potencjału reprodukcyjnego, i niestabilności liczebności w dłuższych okresach czasu (głównie na skutek sukcesji roślinności), utrzymują równą lub nawet wyższą różnorodność genetyczną niż niektóre populacje z siedlisk naturalnych (**Chapter I, II, III**). Na tej podstawie mogę wnioskować, że głównym mechanizmem kształtującym ich strukturę genetyczną jest bliskość i duża liczebność populacji źródłowych oraz szybki wzrost liczebności populacji w pierwszych latach kolonizacji nowych siedlisk. Populacje z siedlisk antropogenicznych ze względu na ich unikatowy, ekologiczny charakter i jako cenne elementy biorące udział w kształtowaniu się przyszłego zasięgu *M. monophyllos*, wymagają jednak specjalnego, konserwatorskiego podejścia.