UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
Wydział Biologii
ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738-8383, -8414, -8416 • e-mail: biologia.dziekanat@uwb.edu.pl

Białystok, 2024.05.09

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Angeliki Marii Gomolińskiej

pt.: Zmienność genomów organellowych i wybranych genów jądrowych gatunków z rodzaju *Erica*
(The variability of the organellar genomes and selected nuclear genes of the genus *Erica*)

Formalny aspekt rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Angeliki Marii Gomolińskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jakuba Sawickiego w Katedrze Botaniki i Ekologii Ewolucyjnej, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Stanowi ona jednorodne tematycznie opracowanie naukowe o charakterze monografii naukowej. Obejmuje łącznie 358 stron maszynopisu i składa się z oświadczenia promotora oraz autorki pracy, podziękowań, streszczenia w języku polskim i angielskim, spisu treści oraz z 6 rozdziałów tj. wstępu, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków oraz spisu literatury. Dobór literatury, obejmujący 291 pozycji będącymi klasyką oraz najnowszymi pracami opublikowanymi w czasopismach międzynarodowych z zakresu podejmowanej problematyki badawczej, jest właściwy i sposób odpowiedni zacytowany w tekście. Dodatkowo rozprawa zawiera spisy rycin, tabel, fotografii i suplementy. Maszynopis został przygotowany względnie starannie, a tabele i rycin są czytelnie zredagowane. Układ rozprawy doktorskiej jest konsekwentnym poszerzaniem i uszczegółowianiem badań z zastosowaniem odpowiednich narzędzi do analiz genomowych, pozwalających na odpowiedzi na postawione hipotezy i pytania. Dlatego uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr A. Gomolińskiej spełnia warunki formalne.

Ocena merytoryczna

Pani mgr Angelika Maria Gomolińska podjęła się analizy i opisu wyjątkowo obszernego zagadnienia dotyczącego genomu plastydowego, oraz sekwencji jądrowych NOR w rodzaju *Erica* wykorzystując je do rekonstrukcji filogenetycznej w rodzinie *Ericaceae*. Doktorantka skupiła się na sekwencjonowaniu genomu plastydowego *Erica arborea* i *E. versicolor,* a następnie odniosła wyniki badań do pozostałych sześciu analizowanych gatunków *Erica*. W szczegółowy sposób podeszła do wyszukiwania sekwencji w cpDNA i rDNA, tak aby uzyskać jak najbardziej odpowiednie i uniwersalne markery molekularne do analiz filogenetycznych w obrębie rodzaju. Uzyskany olbrzymi zakres danych posłużył do wyróżnienia genów oraz regionów międzygenowych najbardziej zmiennych, które mogłyby być wykorzystane w przyszłości do analiz filogenetycznych, w tym charakterystyki historii ewolucyjnej *Erica*. Genomy plastydowe *E. arborea* i *E. versicolor* oraz sekwencje klasterów genów rDNA zostały również zdeponowane w banku genów NCBI już na etapie powstawania niniejszej rozprawy co stanowi istotny wkład Doktorantki w zagadnienia genomiki *Ericaceae*. Uważam, że tytuł rozprawy doktorskiej odzwierciedla zakres zagadnień w niej zawarty.

Streszczenie pracy stanowi bardzo krótki i w dużym stopniu ogólny fragment pracy skupiający się na przedstawieniu zrealizowanych celów badawczych, co oczywiście jest nieodłącznym elementem takich rozdziałów. Powinien być on jednak wzbogacony o ogólne konkluzje wynikające z otrzymanych wyników badań, aby dopełnić i pokazać jakie istotne osiągnięcia naukowe wniosła Doktorantka do danej dyscypliny. Streszczenie jest jednym z pierwszych elementów rozprawy doktorskiej i pozwala na zapoznanie się z zawartością pracy, a w przypadku niniejszej rozprawy należałoby jeszcze ten paragraf znacząco dopracować.

Wstęp pracy został opracowany dosyć syntetycznie. Doktorantka zawarła w nim najważniejsze informacje dotyczące podejścia w klasyfikacji taksonów z rodzaju *Erica* z wykorzystaniem biologii, morfologii i genetyki na przestrzeni kilkunastu lat badań, oraz wyodrębnienia prawdopodobnego przodka tego rodzaju. Wskazała ona również jakie aspekty, tj. analiza pełnych genomów plastydowych, wymagają jeszcze opracowania. Zwróciła przy tym uwagę, że jej badania będą stanowiły właśnie to uzupełnienie. Rozdział ten jest szczególnie interesujący, a jednocześnie napisany w sposób wyczerpujący pod kątem zastosowania sekwencji kodujących w genetyce konserwatorskiej, opisu historii analiz genomu plastydowego i wykorzystania jego cech jako pełnych sekwencji roślinnych barkodów w ochronie roślin. Doktorantka zwraca uwagę jakie dodatkowe sekwencje (czułe markery zmian ewolucyjnych), mogą być wzięte pod uwagę (np. obszar jąderkotwórczy, NOR) oraz dopełnić

informację filogenetyczną, przy jednoczesnym stosowaniu genomów plastydowych. Podrozdział opisujący rodzaj *Erica* jest kluczowym dla niniejszej rozprawy. Właśnie w nim Doktorantka skupiła się na ewolucji i różnorodności gatunkowej *Erica* do tej pory opisywanych w literaturze, jednocześnie wskazujących potencjalne źródło hot-spotu. Zawarte informacje we wstępie stanowią odpowiedni punkt wyjścia do dalszych rozważań i wniosków w rozdziale Dyskusja.

Cele pracy i hipotezy zostały sformułowane poprawnie naukowo i są klarowne. Ponadto zostały one zrealizowane oraz zweryfikowane z zastosowaniem najnowszych metod i technik molekularnych oraz przedyskutowane w świetle najnowszej literatury tematu. Głównym celem badań podjętych przez Doktorantkę było wyjaśnienie pochodzenia i historii ewolucyjnej wrzośców opartych na sekwencjonowaniu genomów plastydowych i rDNA wybranych ośmiu taksonów *Erica*. Magister A. Gomolińska postawiła sobie pięć zasadniczych celów dotyczących opisu zasobów zmienności genomowej i powiązała je z pięcioma hipotezami wzbogacając o listę zawierającą kolejność poszczególnych badań. Niewątpliwie taki opis ułatwia śledzenie etapów pracy.

Przedmiot badań, jako osiem gatunków z rodzaju *Erica*, został tutaj zaprezentowany w sposób standardowy pod kątem dotychczasowej wiedzy o ich biologii, statucie zagrożenia lub nawet wykorzystaniu w gospodarce człowieka. Skupiając się na ich opisie, Doktorantka nie przedstawiła argumentów związanych z wyborem tych taksonów do badań. Czym kierowała się w selekcji ośmiu gatunków do analiz, czy był on losowy? Czy może były przygotowane kryteria wyboru? Uważam, że jest to istotne, wstępne założenie w badaniach filogenezy *Erica*, które wymaga wyjaśnienia na początku tego rozdziału rozprawy doktorskiej. Opis metod i technik badawczych został wzbogacony w zdjęcia, tabele, oraz ryciny, które doskonale uzupełniają informacje tekstowe. Dobór metod i eksperymentów jest adekwatny w odniesieniu do zdefiniowanych przez Doktorantkę hipotez. W przypadku techniki molekularnych opisanych w rozprawie doktorskiej, sposób przedstawienia procedury izolacji i analiz genomowych jest obszerny oraz nie budzi moich wątpliwości, jeśli chodzi o ich wykonanie. Chociaż w tym punkcie miałabym pytanie do Doktorantki o wykorzystanie sekwencjonowania na dwóch platformach Illumina Miseq 600v3 oraz HiSeq 2000 do badanych gatunków. Czym był podyktowany ten wybór w analizach w przypadku dwóch gatunków *Erica*, które później były porównywane ze sobą? Ponadto opis analiz statystycznych, podstawowych parametrów genetycznych oraz wykorzystanie programów do analiz genetycznych w oparciu o dostępne oprogramowanie online jest obecnie standardową procedurą.

Wyniki uzyskane podczas przeprowadzonych eksperymentów to najbardziej rozbudowana i zarówno najbardziej skomplikowana w interpretacji część rozprawy doktorskiej. Została ona zebrana w pięć podrozdziałów tematycznych i uszczegółowiona o kolejne podrozdziały. Niewątpliwie mgr A. Gomolińska wykazała się niezwykłą skrupulatnością i znajomością zagadnień z zakresu genomiki aby opisać i porównać przeanalizowane genomy roślin. Kody uzyskanych sekwencji zostały zamieszczone w GenBank oraz podane w tabelach. Wnioski można byłoby podsumować jako przedstawienie (1) struktury kompletnego genomu plastydowego *E. arborea* (MW338736) i *E. versicolor* (MW282955), (2) wyznaczenie liczby i lokalizacji powtórzeń tandemowych, (3) analizy regionów odwróconego powtórzenia, (4) porównanie plastomów między przedstawicielami rodziny *Ericaceae*, (5) określenie markera filogenetycznego IGS obejmujący 3'ETS i region NTS jako względnie obiecującego do weryfikacji filogenezy, (2) wybranych genów *atp*F, *ndh*F, *psb*B oraz *rpo*C2 wytypowanych do wskazania *E. arborea* jako prawdopodobnego gatunku ancestralnego. Jej badania powinno się uznać jako optymistyczny początek w opracowaniu filogenetycznym rodzaju *Erica* ze szczególnym uwzględnieniem regionów odwróconych powtórzeń świadczących o znaczącym rozwoju ewolucyjnym linii badanego rodzaju. Do tej części rozdziału mam jednak kilka pytań i wątpliwości, które poprosiłam o wyjaśnienie tj.:

1. Na jakiej podstawie wybrano *Actinidia arguta* jako grupę zewnętrzną?
2. Na ryc. 8 przedstawiono drzewo MP czy ML?
3. Ryc. 1, co oznaczają bloki w kolorze zielonym, czerwonym i białym.
4. Dlaczego w wizualizacji konsensusowej sieci filogenetycznej pomiędzy fotosyntetyzującymi przedstawicielami rodziny *Ericaceae* nie włączono gatunku siostrzanego (ryc. 22) przedstawiając drzewo jako nieukorzenione, natomiast na ryc. 23-28 został wprowadzony gatunek siostrzany *Ch. calyculata*. W tym przypadku trudno jest się odnieść do porównania drzew skonstruowanych na podstawie genomu plastydowego oraz pojedynczych genów chloroplastowych.

Rozdział Dyskusja stanowi jednolitą całość, w której Doktorantka weryfikuje wszystkie postawione przez siebie hipotezy oraz szeroko dyskutuje otrzymane wyniki z literaturą. Podział Dyskusji na trzy podrozdziały czyta się względnie dobrze. W poszczególnych akapitach została opisana wielkość oraz struktura genomu chloroplastowego z podziałem na jednostki oraz podobieństwa i różnice pod tym kątem, między przedstawicielami *Ericaceae*. Wyjaśniono ponadto przyczyny różnego typu mutacji w genach występujące z różnym nasileniem. Zasugerowałabym jednak, żeby tytuł rozdziału mógłby być znacząco skrócony np. Analizy struktury genomów chloroplastowych u gatunków fotosyntetyzujących z rodziny *Ericaceae*.

Tytuł drugiego rozdziału również mógłby być przedstawiony bardziej kompaktowo np. Analiza regionów powtórzeniowych oraz polimorfizmu genów w plastomach okrytonasiennych. Śledząc literaturę wykorzystaną przez Doktorantkę i wnioski w Dyskusji nasuwa się pytanie dlaczego w *Ericaceae* obserwujemy wiele unikalnych cech takich jak wysoka liczba powtórzeń SSR, drastyczna redukcja w małym regionie jednokopijnym czy prawdopodobna pseudogenizacja kilku ważnych genów. Czy na tym etapie badań i danych literaturowych jesteśmy w stanie odpowiedzieć na to pytanie?

W przypadku sekwencji IGS, które z sukcesem wykorzystano w filogenezie *Poaceae* i *Brassicaceae*, oraz rodzaju *Quercus*, Doktorantka wskazała ich przydatność również w rekonstrukcji filogenetycznej *Erica*. Niewątpliwie w tym przypadku należy podchodzić jeszcze z ostrożnością do wykorzystania tego regionu, tym bardziej, że nie otrzymano na drzewie filogenetycznym jednoznacznej odpowiedzi o *E. arborea* jako potencjalnym przodku rodzaju *Erica*, co oczywiście nie musi oznaczać wątpliwego jego charakteru jak barkodu. Inny region tj. IR w cpDNA został wytypowany do identyfikacji gatunków *Erica* ze wskazaniem, jego …*silnego rozwoju ewolucyjnego*…, a charakter plastomów określono jako wskazujący na … *tempo ewolucji*..., w opisie wniosków. Oba określenia są odpowiednie do interpretacji uzyskanych wyników, ale prosiłabym Doktorantkę o bardziej szczegółowe wyjaśnienie tych stwierdzeń.

Uważam, że Doktorantka wniosła znaczny wkład w rozwój dyscypliny poprzez opis historii ewolucyjnej wybranych gatunków *Erica* w kontekście opracowania po raz pierwszy kompletnych genomów plastydowych dwóch gatunków *E. arborea* i *E. versicolor* oraz sekwencji NOR oraz wytypowanie potencjalnych markerów do analiz taksonomicznych oraz filogenetycznych *Erica*. Na podstawie zastosowanych technik molekularnych, opisu wyników oraz dyskusji, mogę stwierdzić, że Doktorantka posiada ogólną wiedzę teoretyczną wpisującą się w zagadnienia genomiki, a właściwie trzeba podkreślić wiedzę i umiejętności wychodzące poza podstawowe jej ramy. Wskazuje to na duże doświadczenie i zaawansowany poziom w opanowaniu badań genomowych. Otrzymany wynik stanowi również aplikacyjne zastosowanie przy identyfikacji taksonomicznej problematycznych gatunków *Erica* oraz przy wykorzystaniu tych roślin w kontekście ekonomicznym.

Nieścisłości w rozprawie doktorskiej, które zostały odnalezione, z jednej strony stanowią nieznaczny problem w rozumieniu treści, a z drugiej strony wynikają z błędów stylistycznych czy interpunkcyjnych, w innych przypadkach są zbędnymi powtórzeniami. Wszystkie wymagają poprawy, a wybrane z nich przedstawiam poniżej, tj.:

1. Tabela 4 i tabela 6. Brak jest zamieszczonych pseudogenów określanych indeksem b.

2. Błąd w określeniu … *dryf ewolucyjny* (str. 104).
3. Nazwy polskie gatunków i rodzaju powinny być napisane małą literą.
4. Niepoprawne wyrażenia biologiczne, np. wybuch specjacji str. 12, przesunięcia między różnymi zespołami zapylania str. 34; utratą funkcji mutacji enzymu str. 35; zdrowego stanowiska danego typu roślinności str. 37; rozpierzchnięty gatunek str. 252,
5. W tytule trzeciego podrozdziału Dyskusji obecna jest literówka.

Podsumowanie

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa wnosi istotny wkład do wiedzy w zakresie genomiki *Ericaceae*, a wskazane wyżej krytyczne uwagi nie wpływają na ostateczną pozytywną jej ocenę. Niniejsza rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669). W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego wniosek o dopuszczenie mgr Angeliki Marii Gomolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Ada Wróblewska, prof. UwB