Warszawa, 22.05.2024

Prof. dr hab. Wojciech Pląder

Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Eryki Milarskiej

pt. „Genetyczna charakterystyka wybranych alpejskich i arktyczno-alpejskich gatunków z rodzaju *Cerastium* L. (Caryophyllaceae)"

Niniejsza ocena została wykonana na podstawie zlecenia prof. dr hab. Niny Smolińskiej, przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, zgodnego z uchwałą o powołaniu recenzentów w przewodzie doktorskim mgr inż. Sylwii Eryki Milarskiej oraz art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 ze zm.).

Struktura pracy

Zasadniczą część dysertacji stanowią dwa artykuły naukowe w języku angielskim, opublikowane w roku 2022 i 2023 w czasopismach naukowych z dziedziny nauk o życiu, tj. Poland Journal of Applied Genetics IF_{2022} – 2.400; MEiN – 140 pkt. oraz Scientific Reports IF_{2022} – 4.600; MEiN – 140 pkt.

Rozprawa została uzupełniona o ogólne STRESZCZENIA w języku polskim i angielskim; WSTĘP, skrótowo przedstawiający aktualny stan wiedzy; HIPOTEZY I ZADANIA BADAWCZE, określające obszar i założenia pracy; MATERIAŁY I METODY, charakteryzujące wykorzystane w badaniach materiały roślinne oraz krótko podsumowujące zastosowane procedury badawcze; OMÓWIENIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ, opisowo przedstawiające najważniejsze osiągnięcia pracy; PODSUMOWANIE I WNIOSKI, gdzie w 7 punktach przedstawiono te, dotyczące zmienności genetycznej *C. alpinum* z Babiej Góry oraz w 5

punktach te, dotyczące charakterystyki i analizie porównawczej genomów chloroplastowych *C. alpinum*, *C. arcticum* i *C. nigrescens*.

Streszczenia właściwie podsumowują zakres prac oraz najważniejsze obserwacje poczynione przez Autorkę.

Wstęp przedstawia podstawowe zagadnienia związane z podjętym przez Autorkę problemem i stanowi wprowadzenie w tematykę badawczą realizowaną w pracy doktorskiej. Autorka przedstawiła Rodzaj *Cerastium* należący do rodziny goździkowatych (Caryophyllaceae) z około 200 przedstawicielami, do których należy *C. alpinum* (jeden z 17 gatunków tego rodzaju występujący w Polsce), uważany za gatunek krytycznie zagrożony, wpisany do Polskiej Czerwonej Księgi Roślin, a którego jedyne stanowiska znajdują się na Babiej Górze (Beskid Żywiecki, Karpaty Zachodnie) na obszarze Babiogórskiego Parku Narodowego. Autorka zaznaczyła, że dotychczasowa wiedza na temat różnorodności genetycznej poszczególnych gatunków z rodzaju *Cerastium* jest bardzo ograniczona i opiera się na niewielkiej liczbie badań. Opierały się one głównie na technikach molekularnych, takich jak: AFLP, RAPD, SCAR, analizy polimorfizmu izoenzymatycznego, badania cytogenetyczne czy badania w oparciu o sekwencje trzech niekodujących regionów plastydowego DNA. Doktorantka scharakteryzowała system markerów iPBS (ang. inter primer binding sites) – ich wcześniejsze zastosowanie do analizy zmienności genetycznej wielu gatunków roślin jak również, w oparciu o własne doświadczenia zespołu, sugestię, że mogą one stanowić odpowiednie narzędzie do poznania zmienności genetycznej *C. alpinum*.

W końcowe części wstępu Autorka skupiła się na opisaniu sekwencjonowania genomów chloroplastowych oraz ich wykorzystywaniu w badaniach porównawczych, biotechnologii, identyfikacji gatunków czy w analizach filogenetycznych. W tym miejscu zaznaczyła, że w bazie NCBI dostępne są tylko dwie sekwencje genomów chloroplastowych dla rodzaju *Cerastium*, w tym jedna niekompletna, co stanowi o wysokim potencjale użycia tej metody w prowadzonych badaniach.

Hipotezy i zadania badawcze zostały jasno zdefiniowane. Cel ogólny został doprecyzowany w postaci dwóch celów szczegółowych. Autorka sformułowała również, na podstawie danych literaturowych, dwie hipotezy badawcze. W celu weryfikacji postawionych hipotez zaplanowano zadania badawcze będące tematami dwóch zaprezentowanych publikacji.

Materiały i metody Autorka szczegółowo scharakteryzowała materiał biologiczny (4 lokalizacje, w sumie 133 osobniki) wykorzystany w badaniach, a także podsumowała zakres metod eksperymentalnych do których zaliczyć można izolację DNA, warunki reakcji PCR, szereg analiz statystycznych, przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie cpDNA oraz szerokie spektrum programów bioinformatycznych użytych do analiz. Pragnę zaznaczyć, że rozdział ten przygotowany został bardzo starannie, ułatwiając jego odbiór.

Spis literatury obejmuje ponad 50 pozycji, które stanowią najważniejsze artykuły naukowe z wiodących światowych czasopism (ponad 40% z ostatnich dziesięciu lat) oraz ważne prace opublikowane wcześniej.

Oświadczenia Autorów pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że udział Pani mgr inż. Sylwii Eryki Milarskiej w realizacji publikacji wchodzących w skład rozprawy był znaczący i w pełnym zakresie wypełnia sformułowane przez ustawodawcę, w odniesieniu do prac zbiorowych, kryterium indywidualnego wkładu kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników jak również na przygotowaniu tekstu manuskryptu i odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Omówienie publikacji stanowiących rozprawę doktorską

C. alpinum w Polsce, ze względu na ograniczony zasięg (jedynym miejscem jego występowania jest piętro alpejskie Babiej Góry) uznawany jest za gatunek krytycznie zagrożony.

W tym rozdziale Autorka osobno przedstawiła i omówiła wyniki dla każdej z prezentowanych publikacji.

W publikacji 1, w celu oceny kondycji genetycznej *C. alpinum* z Babiej Góry porównano zmienność genetyczną tego stanowiska (po podziale na cztery części, wyróżnione na podstawie ich przestrzennego rozmieszczenia oraz ukształtowania powierzchni) do populacji z innych regionów geograficznych: Szwecji, Norwegii oraz Szwajcarii. Użyte w badaniach markery iPBS dały pozytywne wyniki zarówno w ujawnianiu polimorfizmu genetycznego pomiędzy osobnikami z poszczególnych populacji, jak i pomiędzy nimi. Wykazano, że pomiędzy populacjami Szwajcarską i Szwedzką występuje wysokie podobieństwo, 4 populacje polskie tworzyły jedną, heterogeniczną grupę a najmniejszym podobieństwem do

pozostałych grup cechowała się populacja arktyczna. O ile populacje zagraniczne okazały się genetycznie jednorodne to wszystkie populacje krajowe wykazywały brak barier w przepływie genów pomiędzy nimi, co ze względu na ich bliskie skupienie przestrzenne nie powinno być zaskoczeniem, a znalazło potwierdzenie w analizie IBD (ang. isolation by distance).

Uzyskane dane mogą stanowić istotne źródło informacji niezbędnych do opracowania skutecznych strategii ochrony *C. alpinum* w Polsce oraz jego monitoringu.

Proszę o wyjaśnienie, skutkiem czego, w przypadku badanych populacji, jest powstanie efektu wąskiego gardła?

Czy istnieją metody, a jeżeli tak to jakie, przywrócenia różnorodności genetycznej?

W publikacji 2 wykonano sekwencjonowanie genomów chloroplastowych trzech gatunków należących do rodzaju *Cerastium*, w skład którego wchodzi kompleks *C. alpinum – C. arcticum*, w ramach którego część badaczy wyróżnia dwa odrębne taksony: *C. arcticum s. str. i C. nigrescens*. W ramach badań przeprowadzono szereg analiz mających na celu określenie struktury wymienionych genomów jak i analizy porównawcze i filogenetyczne. Zaznaczyć należy, że są to techniki powszechnie stosowane w pracach z tego zakresu. Z zastosowaniem odpowiednich programów bioinformatycznych określono: wielkość i procentowy skład genomów (A, C, G, T), liczbę genów, powtórzenia genomowe i sekwencje mikrosatelitarne, występowanie substytucji synonimicznych (Ks) i niesynonimicznych (Ka), określono poziom zróżnicowania porównywanych genomów, wyznaczono przewidywane miejsca redagowania RNA a także przeprowadzono szeroko zakrojone analizy filogenetyczne.

W moim mniemaniu, pomimo ogromu uzyskanych wyników, w pracy zabrakło tych, powstałych w oparciu o prace czysto laboratoryjne, mogące posłużyć w późniejszym czasie do łatwej identyfikacji badanych gatunków. O ile wyniki określenia polimorfizmów na podstawie analizy powtórzeń genomowych i sekwencji mikrosatelitarnych wydają się mało skomplikowane, mogące w przyszłości posłużyć w praktyce jako markery molekularne, to wyznaczenie miejsc redagowania w oparciu tylko na podstawie wyników użytego oprogramowania bioinformatycznego może budzić wątpliwości. Na podstawie literatury wykazano bowiem, że w obrębie rośli, należących zarówno do okrytonasiennych jak i nagonasiennych, liczba miejsc redagowania waha się od 21 (*Oryza sativa*) do 54 (*Gossypium hirsutum*) – wyjątek *Ginko biloba* (255 miejsc) (np.: He et al. BMC Plant Biology (2016)

16:257). Dodatkowo, nie zanotowano tam miejsc redagowania typu U-C, które są zarezerwowane dla glewików (*Anthocerotophyta)* czy paproci.

Na czym polega koncepcja sygnalizacji retrogradowej w komórce roślinnej?

Co to jest heteroplazmia cpDNA i w jakiej sytuacji może nastąpić szybki powrót do stanu homoplazmii?

Za najważniejsze osiągnięcia Pani mgr inż. Sylwii Milarskiej, będące wynikiem badań opisanych w rozprawie doktorskiej uważam te, opisane w postaci wniosków:

2. Dane molekularne ujawniły niski poziom wewnątrzpopulacyjnej zmienności *C. alpinum* przy jednoczesnym wysokim zróżnicowaniu genetycznym populacji.

4. Populacje *C. alpinum* z Babiej Góry stanowią odrębną, aczkolwiek niejednorodną grupę o generalnie większej zmienności genetycznej niż populacje z innych regionów.

7. Mimo izolacji geograficznej (...) *C. alpinum* z Babiej Góry nadal stanowi rezerwuar cennej zmienności genetycznej w ramach gatunku.

oraz

4. Uzyskane dane genomiczne dla genomów chloroplastowych *C. alpinum, C. arcticum* i *C. nigrescens* umożliwiły identyfikację cech unikalnych dla poszczególnych gatunków.

5. Ujawnione powiązania filogenetyczne w obrębie rodziny Caryophyllaceae były zgodne z pozycją taksonomiczną badanych gatunków, a w przypadku rodzaju *Cerastium* potwierdziły odrębny charakter każdego z badanych gatunków (w tym *C. alpinum, C. arcticum* i *C. nigrescens*).

Należy podkreślić, że nakład pracy wymagany do realizacji postawionych sobie przez Autorkę celów badawczych był znaczący.

Praca nad rozprawą wymagała opanowania szeregu technik eksperymentalnych oraz wielu procedur analizy danych. Doktorantka wykazał się umiejętnością prowadzenia badań i interpretacji ich wyników.

Drobne błędy edytorskie, jak np.: brak cytowania w tekście Brysting et al. 2011; Khapilina et al. 2021 w spisie literatury powinno być „a"; Parusel – w tekście jest 2012 (str. 19) a w spisie literatury są pozycje z 2001 i 2014 - nie mają wpływu na jakość ocenianej pracy.

Stwierdzam, że oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Pani mgr inż. Sylwia Milarska wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuję zatem, zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2023.742 ze zm.) do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Sylwii Milarskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na wielorakość oraz dużą różnorodność uzyskanych danych naukowych, na ich nowy charakter a w szczególności na zsekwencjonowanie i szerokie analizy bioinformatyczne genomów chloroplastowych u trzech dotąd nie opisanych wcześniej gatunków, tj. *C. alpinum*, *C. arcticum* i *C. nigrescens,* zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Sylwii Milarskiej.

Prof.dr hab. Wojciech Pląder