



**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Julii Zaborowskiej**

**pt.: Population history and selection in closely related mountain pine species
(genus *Pinus*) in Europe**

(Historia populacji i procesy selekcyjne blisko spokrewnionych gatunków sosen górskich
(rodzaj *Pinus*) w Europie)

Formalny aspekt rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr Julii Zaborowskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Witolda Wachowiaka w Pracowni Biologii Ewolucyjnej oraz Zakładzie Ekologii Roślin i Ochrony Środowiska, Instytutu Biologii Środowiska, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Rozprawa obejmuje stronę tytułową, podziękowania, źródło finansowania badań Doktorantki (krajowe i międzynarodowe) streszczenie w języku angielskim i polskim ze słowami kluczowymi, spis treści, wprowadzenie do tematyki i zagadnień rozprawy doktorskiej, współautorskie prace naukowe włączone w rozprawę doktorską oraz oświadczenia promotora i autora pracy, oświadczenia pozostałych współautorów. Podstawą rozprawy doktorskiej są trzy współautorskie prace naukowe merytorycznie i logicznie ze sobą powiązane, w języku angielskim, które ukazały się w 2019 r. i 2022 r. w *Journal of Systematics and Evolution* oraz w 2021 r. w *International Journal of Molecular Science*. W tych pracach Doktorantka jest korespondencyjnym i pierwszym autorem. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopiśmie z listy JCR. W przypadku każdego artykułu wkład pracy doktorantki został opisany ze szczególną dokładnością, potwierdzając jej wiodącą rolę w prowadzonych badaniach i przy powstawaniu poszczególnych publikacji. Zgodnie z zamieszczonymi w dalszej części pracy oświadczeniami, jej udział w procesie tworzenia tych publikacji wynosił od 65% do 75%. Wkład wszystkich pozostałych osób w powstawanie rozprawy nie wykraczał poza standardową współpracę naukową, która jest realizowana w czasie przygotowania doktoratu. W zakres tej współpracy wchodzi

oczywiście rola pełniona przez promotora w trakcie przygotowania prac, oraz korzystanie z pomocy pozostałych współautorów w zakresie obserwacji, analiz laboratoryjnych i statystycznych oraz konsultacji merytorycznych w trakcie pisania i korekty artykułów. Nie mam wątpliwości, że mgr Julia Zaborowska spełnia wymogi samodzielności w przygotowaniu rozprawy doktorskiej.

Układ rozprawy doktorskiej jest konsekwentnym poszerzaniem i uszczegółowianiem badań z zastosowaniem odpowiednich narzędzi do analiz z zakresu genetyki i genomiki roślin, pozwalających na odpowiedzi na postawione pytania oraz weryfikację hipotezy. Kończąc formalną część oceny uważam, że rozprawa doktorska mgr Julii Zaborowskiej spełnia warunki formalne.

Ocena merytoryczna

Poruszane przez mgr Julię Zaborowską, w rozprawie doktorskiej, zagadnienie badawcze nadal są uważane za ważne w literaturze światowej, w kontekście badań filogenetycznych, filogeograficznych i ekspresji genów u gatunków roślin drzewiastych, w tym rodzaju *Pinus*. We wstępie Doktorantka przedstawiła po krótko najważniejsze zagadnienia z zakresu ekologii ewolucyjnej wprowadzając czytelnika w tematykę adaptacji oraz kształtowania się zasięgu populacji roślin wysokogórskich. Przedmiot badań, a dokładnie dwa gatunki sosny *Pinus mugo* i *P. uncinata*, zostały tutaj syntetycznie opisane pod kątem dotychczasowej wiedzy o ich pochodzeniu, przynależności oraz pozycji taksonomicznej, morfologii oraz zasięgu geograficznym i procesach genetycznych w populacjach zachodzących w jego skali.

Należy podkreślić, że doktorantka słusznie wskazała na potrzebę badań adaptacji na poziomie genomu u tych gatunków. Miałyby one wykazać w jaki sposób dwa wspomniane gatunki drzew z rodzaju *Pinus* przystosowują się do panujących warunków siedliskowych na stanowiskach górskich i jakie geny mogą być odpowiedzialne za ich adaptacje. Przedstawione cele badań i 4 hipotezy wpisują się w zakres zagadnień rozpatrywanych w 3 publikacjach stanowiących rozprawę doktorską. Nawiązując do wstępu rozprawy, Doktorantka przedstawiła w wyczerpujący sposób jej największe osiągnięcia badawcze zawarte w publikacjach. Wstęp został napisany względnie klarownym językiem polskim i naukowym, chociaż tutaj Doktorantka nie ustrzegła się skrótów myślowych i bezpośrednich tłumaczeń z języka angielskiego na język polski (np. str. 3 ... charakterystyk populacji drzew leśnych w wyniku selekcji do lokalnych warunków środowiska, str. 11 ... segregującą w nich zmienność ancestralną; str. 17 ...pozwoliła na rozróżnienie grup genetycznych wśród przebadanych

osobników i populacji, które blisko odpowiadały wcześniej fenotypowej identyfikacji, ... niemalże utrwalonej; str. 18 ... uśrednionych częstości tła genetycznego, itd.). Wszystkie z 3 publikacji stanowią w rozprawie doktorskiej logiczną kontynuację badań i rozwijanie wątku dotyczącego procesów selekcji naturalnej zachodzących u spokrewnionych gatunków sosen występujących na obszarach górskich. We wstępie, Doktorantka wskazała hipotezy, które weryfikowała w każdej z publikacji oraz nakreśliła najważniejsze wnioski płynące z wykonanych analiz genetycznych i genomowych.

Moje uwagi do trzech publikacji można potraktować jako wskazówki do uzupełnienia analiz, sugestie aby móc uzyskać bardziej szczegółowe wyniki. Bynajmniej, nie wynikają one z popełnionych błędów przez Doktorantkę, raczej z mojej dociekliwości naukowej.

Pierwsza publikacja Zaborowska Julia, Łabiszak Bartosz i Wachowiak Witold. 2019. Population history of European mountain pines *Pinus mugo* and *Pinus uncinata* revealed by mitochondrial DNA markers. Journal of Systematics and Evolution 58 (4): 474-486, jest punktem wyjścia do badań odrębności genetycznej dwóch analizowanych górskich gatunków sosen. Należy podkreślić, jako istotne osiągnięcie, opracowanie przez Doktorantkę 15 nowych, markerów DNA mitochondrialnego (mtDNA) i przeanalizowanie pod kątem filogenetycznym 31 mitotypów badanych sosen górskich. Do analiz została wybrana również znacząca liczba 27 populacji reprezentatywna dla zasięgu geograficznego obu gatunków sosen oraz 17 markerów mtDNA. Wskazano ponadto dwa loci Pr13 oraz nad1, które można uznać za diagnostyczne, istotnie różnicujące badane gatunki sosen. Opisano tutaj prawdopodobne drogi kolonizacji z Alp, obszaru Apenin, region Bałkanów do centralnej Europy (w tym Sudetów i Karpat) przez *P. mugo*. Pokusiłabym się w pracy o przygotowanie drzewa ukorzenionego z outgrupą, np. *P. sylvestris*, ażeby sprawdzić czy populacje M1-M3 nie grupują się z populacjami *P. sylvestris*, pod względem podobieństwa haplotypów mtDNA. Wówczas jak wskazuje Doktorantka, trzy wspomniane populacje *P. mugo* mogłyby być utworzone przez osobniki będące hybrydami *P. mugo* i *P. sylvestris*.

Odnalazłam w tekście dosłownie kilka nieścisłości np. w Tabeli 1 jest podane 11 miejsc segregujących w populacji M2, a w tekście jest wspomniana populacja M3 (str. 6). W Tabeli 1 liczba haplotypów 'prywatnych' mtDNA lub wyłącznie występujących w populacjach nie zgadza się z sumą przedstawioną dla każdego gatunku – *P. mugo* są podane 23 haplotypy, a powinno być raczej 12 oraz *P. uncinata* jest 7 a powinno być 4.

W drugim z artykułów, Zaborowska Julia, Łabiszak Bartosz, Perry Annika, Cavers Stephen, Witold Wachowiak. 2021. Candidate genes for the high-altitude adaptation of two mountain pine taxa. International Journal of Molecular Science 22: 3477, Doktorantka

wykazała za pomocą 6003 SNPów polimorficznych (DNA jądrowe) i ostatecznie 438 prób z trzech gatunków sosen (*P. mugo*, *P. uncinata* i *P. sylvestris*) wzorce ich różnorodności genetycznej oraz wyszczególnili potencjalnie SNP-y 'outlier', które mogłyby wskazać na geny związane z adaptacjami do warunków wysokogórskich u *P. mugo* i *P. uncinata*. We wstępie pracy w sposób przekrojowy przeanalizowała biologię i ekologię drzew w kontekście ich adaptacji do warunków środowiska. Wyjaśniła wagę badań na *P. mugo* i *P. uncinata* ze względu na wiele podobieństw w budowie genomu oraz właściwości ekologiczne gatunków.

Na uwagę zasługuje skrupulatne przedstawienie przez Doktorantkę metod i wyników w oparciu o parametry stosowane w genetyce populacji i genomice, wykazanie różnic i podobieństw wewnątrz oraz między gatunkami na poziomie różnorodności genetycznej, wykorzystanie 3 metod w oszacowaniu SNP-ów, które podlegają selekcji naturalnej, omówienie struktury genetycznej określonej metodą Bayesa biorąc pod uwagę dwa kryteria. Do istotnych osiągnięć Doktorantki, w niniejszej publikacji, zaliczam na pewno określenie loci podlegających selekcji u *P. mugo* i *P. uncinata* i genów kandydackich, które w dalszych etapach badań mogłyby być wykorzystane do badań ekspresji genów. Wskazanie na najważniejsze geny, które mogłyby podlegać selekcji u tych gatunków górskich zostało rozszerzone o ich opis funkcjonowania u tych organizmów (związane z procesami oksydo-redukcyjnymi oraz w szlaku sygnałowym giberelin). Jest to jednocześnie wstęp do badań, które będą kontynuowane w trzeciej przedstawionej publikacji oraz jedno z bardziej interesujących wyników, które uważam, że zasługują na szerszą interpretację w przyszłych badaniach. Drugim aspektem jest wskazanie odrębności filogenetycznej tych dwóch spokrewnionych gatunków sosen górskich i przyczyn ich specjacji. Badania za pomocą SNP-ów pokazały niewątpliwie, podobnie jak markery mtDNA, wyraźne różnice genetyczne między dwoma badanymi gatunkami sosen. W tym punkcie nasuwa się pytanie, czy dalsze badania dotyczące genów wpływających na regulację biologicznych procesów, lub procesów komórkowych będą planowane w przyszłości? Drugie moje pytanie dotyczy rozszerzenia interpretacji analizy Bayesa w kontekście wystąpienia prawdopodobnych admiksji pul genowych między populacjami i między badanymi gatunkami. Czy obserwowana admiksja w różnych wariantach dla *K* oraz gatunków może być wynikiem hybrydyzacji, czy raczej niedawnej historii powstania gatunku i ich wspólnego przodka?

Trzecia publikacja Zaborowska Julia, Perry Annika, Caver Stephen, Wachowiak Wiltold. 2018. Evolutionary targets of gene expression divergence in a complex of closely related pine species. *Journal of Systematics and Evolution* 00: 00-00 (w druku) jest pracą, która podejmuje zagadnienie zróżnicowania gatunków *P. mugo* i *P. uncinata* oraz *P. sylvestris* na

poziomie ekspresji genów, wskazując tym samym prawdopodobne relacje między poziomem ekspresji genów a adaptacją do warunków środowiska, w tym właściwości drewna, poziomu stresu oksydacyjnego, odpowiedzi na czynniki środowiska jak zasolenie, susza i temperatura. Doktorantka i współautorzy gruntownie przeprowadzili analizę statystyczną biorąc pod uwagę serię modeli, co stanowi ważny aspekt tej pracy. Wymaga podkreślenia fakt, że Doktorantka określiła kilka nowych dla nauki, izoform transkryptów znanych genów, większość z nich w relacji gatunek-gatunek, oraz nowe geny określone dla *P. mugo* i *P. uncinata*, ale nie obecne u *P. sylvestris*. Zwrócono uwagę na kilka genów, które u gatunków górskich sosen, są zróżnicowane pod kątem aktywności ekspresji między kompleksem *P. mugo* i *P. sylvestris*, tj. metylotransferazy, oksydoreduktazy, związane z fotosystemem II lub cytochrom P450, który ma obniżoną aktywność u *P. mugo* i *P. uncinata* w stosunku do *P. sylvestris*. Część z nich okazuje się, że nie była stwierdzona wcześniej w literaturze u *P. sylvestris*. Wskazano istotne różnice w aktywności genów między gatunkami sosen górskich, co potwierdziło ostatecznie, biorąc pod uwagę dwie wcześniejsze publikacje, że różnice między *P. mugo* i *P. uncinata* są znaczące nie tylko na poziomie fenotypu, ale również zmienności genetycznej i ekspresji genów. W dyskusji Doktorantka wskazała, że niewątpliwie badania powinno rozszerzyć się m.in. o analizy epigenetyczne, co uzupełniłoby interpretację wyników w tej pracy. W dyskusji poziom ekspresji enzymów, białek jest bardzo szeroko opisany, ale raczej pod kątem ogólnych właściwości u poszczególnych gatunków roślin. Natomiast wątek wpływu aktywności wymienionych genów w rodzaju *Pinus* lub rodzinie *Pinaceae* został przedstawiony dosyć oszczędnie. Stąd moje pytanie do Doktorantki dotyczące właśnie tego zagadnienia, a dokładnie, czy wyższa ekspresja genów stwierdzona u dwóch gatunków sosen górskich była również analizowana w innych gatunkach z rodzaju sosna lub rodzinie sosnowatych w literaturze?

Podsumowanie

Fakt, że moja recenzja zawiera pewne uwagi krytyczne wynika głównie z obowiązku recenzenta. Niniejsze uwagi zupełnie nie umniejszają wartości rozprawy jako całości. Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr Julii Zaborowskiej oceniam bardzo pozytywnie oraz uważam, że jest kilkuaspektowym, wartościowym opracowaniem naukowym oraz 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 im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Julii Zaborowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, rekomendując jednocześnie wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Białystok, 11.10.2022


dr hab. Ada Wróblewska, prof. UwB