



Warszawa, 04.08.2022 r.

Prof. dr hab. Tadeusz Malewski

Pracownia Technik Molekularnych i Biometrycznych

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Marii Krocak  
pt. „Struktura i ewolucja genomów mitochondrialnych na przykładzie wybranych  
rzędów ptaków“**

Ze względu na wysoką odporność na degradację wynikającą z kolistej struktury, dużej ilości kopii w komórce, dziedziczenia matczynego i rzadko zachodzącej rekombinacji mitochondrialny DNA jest szeroko wykorzystywany w filogenetyce, genetyce populacyjnej, ekologii molekularnej czy też filogeografii. Najczęściej wykorzystywane są sekwencje podjednostek genów 16S i 12S rybosomalnego RNA dla taksonów na poziomie rodziny, oksydazy cytochromowej i cytochromu b - na poziomie gatunku lub region kontrolny - w obrębie gatunku i blisko spokrewnionych taksonów.

W odróżnieniu od sekwencji analiza ułożenia genów mitochondrialnych jest tematem nielicznych badań. U ptaków sekwencję pierwszego kompletnego mitogenomu uzyskano dla kury. Kolejność genów *nd5/cytb/tRNA-Thr/tRNA-Pro/nd6/tRNA-Glu/CR/tRNA-Phe* w tym genomie jest inna niż u ssaków. Ten porządek genów w mitogenomach ptaków występuje najczęściej i został przyjęty jako standardowy. Oprócz niego opisano jeszcze dwa układy zawierające duplikację pomiędzy genem *cytb*, a *tRNA-Phe*. Podobnie rzadko podejmowanym tematem badań jest heteroplazmia mitochondrialnego DNA.

Niedostateczna znajomość procesów prowadzących do duplikacji, rearanzacji i heteroplazmii może być przyczyną niezgodności drzew genowych i drzew gatunków ponieważ sekwencje paralogów mogą być bardziej podobne do siebie niż ortologów.

W związku z tym wybór tematu rozprawy doktorskiej należy uznać za trafny i merytorycznie uzasadniony.

Założenia i cele zostały jasno i precyzyjnie sformułowane. Doktorantka postawiła przed sobą cztery cele badań:

1. analizę częstotliwości występowania duplikacji i ułożenia genów w mitochondrium ptaków;
2. określenia czy duplikacje i rearanżacje występują niezależnie w poszczególnych liniach ewolucyjnych czy też zostały odziedziczone po wspólnym przodku;
3. analizę częstotliwości występowania heteroplazmii w mitochondrialnym DNA u ptaków;
4. wyjaśnienia w jaki sposób ewoluowały zduplikowane elementy w genomie mitochondrialnym.

Wstęp stanowi zwięzłą i logicznie syntezę wiadomości dotyczących ułożenia genów i ich rearanżacji w genomach mitochondrialnych kręgowców, heteroplazmii i ewolucji mitochondrialnego genomu i doskonale wprowadza do badań prezentowanych w dalszej części pracy. Literatura jest dobrana prawidłowo, ponadto jest zróżnicowana i bogata. Na podkreślenie zasługuje umiejętność wykorzystywania najnowszej literatury przedmiotu i liczne odwołania do najnowszych badań światowych w podjętej tematyce.

Mocną stroną pracy jest metodyka. Autorka szczegółowo opisuje pochodzenie prób i sposoby izolacji DNA. Doktorantka opracowała nową strategię identyfikacji duplikacji opartą o amplifikację wybranych fragmentów diagnostycznych. Pełną sekwencję genomu mitochondrialnego uzyskiwała poprzez amplifikację od czterech do sześciu nachodzących na siebie fragmentów i sekwencjonowania metodą primer walking, która jest odpowiedniejsza dla sekwencjonowania genomów o nieznanym aranżacji genów oraz obecności zduplikowanych fragmentów. Rekonstrukcje drzew filogenetyczne zostały starannie przeprowadzone z zastosowaniem metody Bayesowskiej, największej wiarygodności oraz największej parsymonii.

Uzyskane przez doktorantkę wyniki zostały bardzo starannie udokumentowane i zaprezentowane na dobrej jakości rycinach. W mojej opinii szczególnie interesujące wyniki dotyczą duplikacji, rearanżacji i heteroplazmii mitogenomu ptaków. Dane te są bardzo nowatorskie, zostały one szeroko przedstawione i wnikliwie przeanalizowane. Doceniam ogrom włożonej pracy aby uzyskać takie dane. Doktorantka przeprowadziła badania na

imponującej liczbie 338 gatunków. Opracowana przez nią strategia amplifikacji fragmentów diagnostycznych okazała się bardzo skuteczną co pozwoliło Doktorantce stwierdzić duplikację u 261 gatunków, z czego u 198 gatunków duplikacja została stwierdzona po raz pierwszy przez Autorkę. Biorąc pod uwagę, że przed badaniami Doktorantki duplikacja była opisana tylko u 63 gatunków przedłożona praca doktorska jest najbardziej obszernym opracowaniem dotyczącym analizy duplikacji fragmentów mitochondrialnego DNA u ptaków.

Następnym etapem badań Doktorantki było sekwencjonowanie pełnych genomów mitochondrialnych. Połączenie wcześniej opracowanej strategii identyfikacji duplikacji z sekwencjonowaniem metodą primer walking pozwoliło Doktorantce zsekwencjonować mitogenom u 153 gatunków ptaków.

Dysponując sekwencją mitogenomów doktorantka przeszła do analizy ułożenia genów w rejonach zduplikowanych i stwierdziła obecność 41 różnych porządków ułożeń. Otrzymane wyniki otwierają właściwie nowy rozdział w genomice mitochondrialnego DNA u ptaków. Spośród wielu interesujących i cennych wyników otrzymanych przez Autorkę zwraca uwagę **wykrycie nieznanej wcześniej formy heteroplazmii** polegającej na występowaniu mitogenomów różniących się liczbą genów.

Dysponując danymi o sekwencjach mitogenomów, ułożeniu genów i heteroplazmii Autorka mogła przejść do wyjaśnienia w jaki sposób ewoluował mitogenom u ptaków. Wartość naukowa doktoratu jest imponująca. Niewątpliwie jest to jeden z najlepszych doktoratów jakie miałem przyjemność recenzować. Oryginalność tego doktoratu polega na analizie zmian zachodzących w mitogenomie w procesie ewolucji nie na podstawie substytucji nukleotydowej, a na podstawie porządku genów w zduplikowanych rejonach mitochondrialnego DNA.

Autorka rozprawy posiada duży dorobek publikacyjny. 16 prac zostało opublikowanych w dobrych lub bardzo dobrych czasopismach naukowych.

Podsumowując uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Aleksandry Marii Krocak, stanowi oryginalne dzieło naukowe, a uzyskane wyniki są dobrze uzasadnione rezultatami badań. Uważam, że rezultaty te są wiarygodne i oryginalne, w znaczący sposób stanowiące *novum* naukowe. Autorka wykazała zarówno wystarczające kompetencje w stosowaniu nowoczesnych narzędzi analizy danych genomicznych jak i profesjonalizm w znajomości genetyki, mitochondrialnego DNA oraz molekularnych mechanizmów ewolucji.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska mgr Aleksandry Marii Krocak „Struktura i ewolucja genomów mitochondrialnych na przykładzie wybranych rzędów ptaków“ spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w świetle art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 z późniejszymi zmianami i niniejszym **wnoszę o dopuszczenie mgr Aleksandry Marii Krocak do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Uważam, że przeprowadzone badania są pionierskie i unikatowe. Ponadto, biorąc pod uwagę zastosowane metody badawcze i ich znaczenie dla mitogenomiki **rekomenduję Radzie Naukowej jej wyróżnienie.**

