

Skierniewice, 28 sierpnia 2025 r.

Dr hab. Agnieszka Marasek-Ciołakowska, prof. IO
Zakład Biologii Stosowanej
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
Ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Dany Trunovej pt. „Repetitive DNA sequences
and the evolution of the *Brachypodium* genus”**

Podstawa opracowania recenzji

Rada Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, na posiedzeniu w dniu 27.06.2025 r. powołała mnie na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr Dany Trunovej – pismo z dnia 30.06.2025r. podpisane przez Zastępcę Dyrektora Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych dr hab. Urszulę Guzik, prof. UŚ. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, pod kierunkiem naukowym dr hab. Bożeny Kolano, prof. UŚ oraz promotora pomocniczego dr Natalii Borowskiej-Żuchowskiej.

Praca doktorska została wykonana w ramach projektu badawczego finansowego ze środków Narodowego Centrum Nauki (2020/39/O/NZ8/00184) w latach 2021–2025.

Ocena formalna pracy

Praca doktorska zgłoszona do recenzji przez mgr Danę Trunovą została przygotowana w formie monografii naukowej. Rozprawa liczy 102 strony, nie licząc 31 rycin wraz z ich opisami oraz materiałów uzupełniających. Struktura pracy odpowiada typowemu schematowi prac doktorskich i obejmuje rozdziały takie jak: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenia w języku angielskim i polskim, Bibliografia oraz Materiały uzupełniające. Część wyników badań przedstawionych w pracy została opublikowana w artykule naukowym:

Trunova, D., Borowska-Zuchowska, N., Mykhailik, S., Xia, K., Zhu, Y., Sancho, R., Rojek-Jelonek, M., Garcia, S., Wang, K., Catalan, P., Kovarik, A., Hasterok, R., Kolano, B. (2024). ‘Does time matter? Intraspecific diversity of ribosomal RNA genes in lineages of the allopolyploid model grass *Brachypodium hybridum* with different evolutionary ages’. *BMC Plant Biology* 24, 981. doi: 10.1186/s12870-024-05658-5.

Artykuł został umieszczony w materiałach uzupełniających wraz z oświadczeniami współautorów publikacji, w których podany jest ich indywidualny wkład w powstanie pracy.

Układ rozprawy jest przejrzysty, prezentuje pełne i spójne opracowanie naukowe. Uważam, że wykazu skrótów, który - gdyby został zamieszczony jako osobny rozdział - ułatwiłby analizę pracy. Pomimo tego drobnego uchybienia, formalna ocena rozprawy jest satysfakcjonująca.

Ocena merytoryczna pracy

Rodzaj *Brachypodium* pełni kluczową rolę jako modelowy organizm w badaniach nad ewolucją traw i funkcjonowaniem genomów roślin jednoliściennych. Sekwencje powtarzalne są istotnym elementem kształtującym strukturę genomu, jego plastyczność i adaptacyjne zmiany ewolucyjne. Zrozumienie rozmieszczenia, dynamiki i funkcji tych sekwencji w obrębie *Brachypodium* może znacząco przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów różnicowania się gatunków oraz ewolucji genomu roślin. Przedstawiona do recenzji monografia przedstawia kompleksową analizę organizacji i ewolucji sekwencji powtarzalnych w genomach *Brachypodium*, koncentrując się na krytycznym omówieniu relacji filogenetycznych, ewolucji podstawowej liczby chromosomów, organizacji sekwencji powtarzalnych oraz kierunkach ewolucji powtarzalnego DNA. Temat pracy wpisuje się w aktualne trendy badawcze w dziedzinie genomiki ewolucyjnej i ma potencjał do poszerzenia wiedzy na temat podstaw procesów poliploidyzacji i specjacji roślin.

Rozprawa doktorska została starannie skonstruowana, z precyzyjnie sformułowanym tytułem. Rozdział wprowadzający, obejmujący 22 strony, przedstawia szeroki kontekst historyczny i ewolucyjny rodziny traw (Poaceae), podkreślając ich znaczenie gospodarcze oraz rolę rodzaju *Brachypodium* jako modelowego organizmu. Autorka szczegółowo omawia różne klasy sekwencji powtarzalnych w genomach roślinnych, koncentrując się na ich ewolucji, mechanizmach zmienności oraz potencjalnych funkcjach w kształtowaniu fenotypu roślin. W końcowej części rozdziału została scharakteryzowana obecność i znaczenie sekwencji powtarzalnych w genomach *Brachypodium*, w kontekście ich ewolucji i funkcji. Doktorantka podkreśliła, że obecna wiedza na temat organizacji i ewolucji sekwencji powtarzalnych w *Brachypodium* jest wciąż ograniczona, głównie do *B. distachyon* i *B. hybridum*, co uzasadnia wybór tematu badawczego. Przegląd literatury jest wyczerpujący i aktualny, uwzględniając najnowsze doniesienia naukowe w tej dziedzinie.

W kolejnym rozdziale Doktorantka sformułowała hipotezy badawcze, które koncentrują się na trzech głównych aspektach: (i) korelacji między składem i organizacją powtarzalnego DNA a filogenezą *Brachypodium*; (ii) reorganizacji sekwencji powtarzalnego DNA po hybrydyzacji i poliploidyzacji; (iii) zróżnicowanym tempie i wzorcach ewolucji różnych linii powtórzeń. Doktorantka szczegółowo określiła cztery zadania badawcze, które umożliwiły weryfikację hipotez. Cel badań został sformułowany prawidłowo.

Rozdział trzeci dotyczący materiałów i metod został opracowany w sposób szczegółowy i logiczny. Rozpoczyna się od schematycznego przedstawienia (Rysunek 7) procesu badawczego, co ułatwia zrozumienie struktury oraz kolejności przeprowadzonych analiz. W Tabeli 2 Doktorantka scharakteryzowała materiał badawczy - 18 genotypów dwunastu gatunków *Brachypodium*. Ujęto kluczowe cechy: liczbę chromosomów, rozmiary genomów, poziom ploidalności oraz źródło pochodzenia nasion. Dobór metod – od izolacji DNA, przez metody bioinformatyczne, po klasyczne techniki molekularne i cytogenetyczne-

jest trafny i dobrze dopasowany do celu badań. Opisy poszczególnych etapów są wystarczająco szczegółowe, by zapewnić powtarzalność procedur. Jednocześnie chciałabym zwrócić uwagę na szeroki zakres badań oraz zaawansowane metody i techniki badawcze, które zostały wykorzystane przez Doktorantkę. Mam jedynie drobną uwagę do tytułu podrozdziału 3.3 Genomic DNA isolation and Illumina sequencing, w którym umieszczono jedynie szczegółowy opis izolacji DNA, natomiast informację o sekwencjonowaniu nowej generacji zamieszczono w podpunkcie 3.4.1 NGS data. Przeniesienie odpowiednich informacji o sekwencjonowaniu Illumina do podrozdziału 3.3, lepiej odzwierciedlałoby jego tytuł.

Rozdział „Wyniki” przedstawia szczegółową analizę frakcji powtarzalnego DNA w obrębie gatunków *Brachypodium*, oferując bogaty zestaw danych eksperymentalnych oraz kompleksowy przegląd zagadnienia. Struktura rozdziału, podzielona na cztery logicznie powiązane podsekcje, zwiększa jego przejrzystość i spójność. Podrozdział 4.1 koncentruje się na analizie filogenetycznej gatunków *Brachypodium*, wykorzystując sekwencje jądrowego genu *Gigantea* (GI). Analiza ta ujawnia wyraźne rozróżnienie między gatunkami jednorocznymi i bylinami, z dalszymi podziałami w każdej z tych grup. Uwzględnienie zarówno gatunków diploidalnych, jak i poliploidalnych w badaniu podkreśla złożone relacje ewolucyjne w obrębie rodzaju *Brachypodium*, dostarczając cennych informacji na temat procesów jego różnicowania i adaptacji.

W podrozdziale 4.2 zostały przedstawione kompleksowe i dobrze udokumentowane wyniki analiz porównawczych sekwencji powtarzalnych DNA dla dwóch genotypów naturalnego allotetraploida *B. hybridum*, różniących się czasem powstania oraz ich domniemanych diploidalnych przodków *B. distachyon* i *B. stacei*. Doktorantka wykorzystwała różnorodne metody badawcze, w tym analizy *in silico*, PCR, hybrydyzację metodą Southerna oraz fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH), co jest niewątpliwie mocną stroną przedstawionej pracy. Badanie ujawniło, że, chociaż występuje pewna subgenomowa stałość w *B. hybridum*, to także zauważalne są zmiany w specyficznych rodzinach powtórzeń. Zmiany te wydają się kumulować stopniowo, z bardziej wyraźną reorganizacją w starszej linii (Bhyb26). Wiele rozproszonych rodzin powtórzeń wykazuje dziedziczenie addytywne z obu ancestralnych subgenomów. Jednak wzorce nieaddytywne są obserwowane w rDNA, satelitarnym DNA i w pewnych liniach elementów transpozycyjnych (TE), co sugeruje specyficzne dla powtórzeń wydarzenia reorganizacyjne. Najbardziej znacząca reorganizacja została zaobserwowana w rDNA. Badanie donosi o stopniowej eliminacji wyciszonego 35S rDNA subgenomu S i złożonych zmianach w 5S rDNA, w tym eliminacji locus i powstawaniu nowych wariantów.

W podrozdziale 4.3 Doktorantka przeprowadziła szczegółową charakterystykę sekwencji powtarzalnych DNA w diploidalnych i allopoliploidalnych gatunkach. Prezentacja wyników została podzielona na kilka podsekcji, które obejmują charakterystykę DNA satelitarnego, analizę porównawczą 5S rDNA, skład retrotranspozonów LTR oraz porównanie kompozycji sekwencji powtarzalnych w badanych genomach. Analiza zawartości sekwencji powtarzalnych DNA w rodzaju *Brachypodium* ujawniła kilka istotnych wzorców. Retrotranspozony LTR, szczególnie rodzina Ty3/Gypsy, były najliczniej reprezentowaną rodziną powtórzeń we wszystkich badanych gatunkach. Zaobserwowano różnice pomiędzy

gatunkami jednorocznymi a wieloletnimi, przy czym te ostatnie wykazywały zazwyczaj wyższą ogólną zawartość powtórzeń. Największe zróżnicowanie między gatunkami wykazywały rodziny satelitarnego DNA; niektóre z nich, jak CentBp oraz rodzina 360 bp, występowały głównie u gatunków wieloletnich. Gatunki poliploidalne, zwłaszcza alloheksaploidy, miały tendencję do zwiększonej amplifikacji wybranych rodzin powtórzeń w porównaniu z diploidami. Allotetraploid *B. mexicanum* wyróżniał się odmiennym profilem powtórzeń, ze znaczną amplifikacją określonych rodzajów retrotranspozonów LTR oraz unikalnymi rodzinami satelitarnego DNA. Przedstawione wyniki dostarczyły istotnych informacji na temat roli powtarzalnego DNA w ewolucji i adaptacji gatunków *Brachypodium*.

W ostatnim podrozdziale wyników (4.4) Doktorantka przeprowadziła analizę porównawczą sekwencji powtarzalnych DNA w różnych gatunkach *Brachypodium*, koncentrując się na ewolucji wielkości genomu oraz dynamice satelitarnego DNA (satDNA). Uzyskane wyniki ujawniły złożony wzorzec zmian wielkości genomu, w którym jednoroczne gatunki diploidalne wykazują tendencję do zmniejszania się genomu, natomiast wieloletnie gatunki diploidalne do jego powiększania podczas dywersyfikacji. Analiza rodzin satelitarnego DNA wykazała ich istotną rolę w kształtowaniu różnorodności genomowej. Badanie to koreluje zmiany wielkości genomu z określonymi wydarzeniami amplifikacji i eliminacji satelitarnego DNA (satDNA). U wspólnego przodka gatunków jednorocznych (*B. distachyon* i *B. stacei*) doszło do amplifikacji dwóch rodzin satDNA (CentBd oraz 1800 bp), natomiast u wspólnego przodka gatunków wieloletnich powieleniu uległy rodziny CentBp oraz 360 bp. Wyniki te podkreślają znaczenie uwzględniania zarówno wielkości genomu, jak i składu powtarzalnych sekwencji DNA podczas badania ewolucji i specjacji genomów roślin.

Dyskusja wyników (rozdział 5) została przeprowadzona została w sposób rzeczowy i spójny w trzech logicznie wyodrębnionych podrozdziałach, obejmujących zarówno zagadnienia filogenezy i podstawowej liczby chromosomów, organizacji sekwencji powtarzalnych w allotetraploidalnym *B. hybridum*, jak i ewolucyjnych trajektorii tych sekwencji w obrębie rodzaju *Brachypodium*. Doktorantka porównuje swoje wyniki z wcześniejszymi badaniami, potwierdzając tym samym wiarygodność swoich wniosków dotyczących relacji filogenetycznych w obrębie rodzaju *Brachypodium*. Dyskusja na temat zróżnicowania liczby chromosomów w gatunkach *Brachypodium* oraz jej implikacji dla poliploidii i ewolucji gatunków jest wyczerpująca.

W podrozdziale 5.2 została przedstawiona ocena reorganizacji powtarzalnych sekwencji DNA po hybrydyzacji i poliploidyacji w *B. hybridum*. Uzyskane przez Autorkę wyniki mają kilka ważnych implikacji dla zrozumienia ewolucji genomu w gatunkach poliploidalnych. Bardziej wyraźne zmiany zaobserwowane w starszej linii *B. hybridum* (Bhyb26) w porównaniu z młodszą (ABR113) sugerują, że reorganizacja genomowa w allopoliploidalnych może następować stopniowo w czasie, zamiast wyłącznie przez szybki „szok genomowy”. Wyniki badań wskazują, że różne rodziny powtórzeń mogą mieć odmienne trajektorie ewolucyjne w ramach tego samego poliploidalnego genomu. Ponadto, obserwowane zmiany w organizacji rDNA, szczególnie stopniowa eliminacja jednej formy rodzicielskiej, dostarczają informacji na temat procesu diploidyacji u poliploidów, co wspiera ideę, że poliploidy mają tendencję do redukcji zbędnego materiału genetycznego w czasie. Badania ujawniły również, że nawet w ramach tego samego gatunku (*B. hybridum*), różne linie mogą wykazywać różne wzory

ewolucji powtórzeń. To podkreśla znaczenie uwzględnienia wielu linii lub akcesji przy badaniu ewolucji genomu poliploidalnego. Ponadto odkrycia dotyczące rDNA, szczególnie zróżnicowanej utraty rDNA 35S i 5S z różnych subgenomów w starszej linii, ukazują skomplikowane mechanizmy regulacyjne kształtujące ekspresję genów rRNA w genomach poliploidalnych. Autorka podkreśla, że ewolucja genomu w gatunkach poliploidalnych jest złożonym, dynamicznym procesem obejmującym różne mechanizmy reorganizacji powtórzeń, interakcji subgenomowych i diploidyacji. Dlatego w badaniu ewolucji genomu poliploidalnego należy stosować podejście kompleksowe uwzględniając czynniki takie jak typ powtórzenia, wiek ewolucyjny i wzory specyficzne dla linii.

W ostatniej części Dyskusji (5.3), mgr Trunova udowadnia hipotezę, że występujące w genomach *Brachypodium* rodziny sekwencji powtarzalnych cechują się różnym tempem oraz kierunkiem ewolucji. Dyskusja na temat roli repeatu w zmienności wielkości genomu jest dobrze przedstawiona. Analiza ewolucji powtarzalnego DNA w rodzaju *Brachypodium* ujawnia złożone wzorce, które w istotny sposób ukształtowały zmienność wielkości genomu pomiędzy gatunkami. Gatunki jednoroczne i wieloletnie wykazały istotne różnice w wielkości genomu i zawartości powtarzalnych sekwencji DNA, przy czym retrotranspozony LTR Ty3/Gypsy odegrały kluczową rolę w ekspansji genomu, szczególnie w przypadku *B. mexicanum*. To spostrzeżenie podkreśla istotną rolę transpozonów w kształtowaniu architektury genomu i zmienności jego wielkości wśród blisko spokrewnionych gatunków. Cennych informacji na temat historii ewolucyjnej rodzaju *Brachypodium* dostarczyła analiza rodzin satelitarnych DNA. Obecność wspólnych rodzin satelitarnych między gatunkami wspiera hipotezę biblioteki, podczas gdy pojawienie się wariantów specyficznych dla poszczególnych gatunków jest zgodne z modelem powstawania i zanikania powtórzeń (birth-and-death model). Ustalenia te sugerują, że podczas gdy niektóre sekwencje powtarzalne są konserwowane pomiędzy gatunkami, inne podlegają szybkim zmianom, przyczyniając się do różnorodności genomowej w obrębie rodzaju. Doktorantka zaznaczyła, że choć analiza powtarzalnych sekwencji genomu dostarczyła istotnych informacji na temat ewolucji rodzaju *Brachypodium*, wysoki stopień podobieństwa między gatunkami oraz złożona dynamika ewolucji powtórzeń utrudnia jednoznaczne prześledzenie pochodzenia genotypów poliploidalnych wyłącznie na podstawie sekwencji powtarzalnych DNA. Wskazuje to na konieczność integrowania analiz powtarzalnych sekwencji genomu z analizami filogenetycznymi oraz innymi podejściami genomowymi, aby wyjaśnić historię ewolucyjną gatunków z rodzaju *Brachypodium*.

W rozdziale 6, Doktorantka przedstawiła osiem syntetycznych wniosków, które jasno podsumowują główne rezultaty przeprowadzonych badań. Wnioski są logicznie uporządkowane i spójne z przedstawionymi wynikami.

Streszczenia w języku polskim i angielskim (rozdział 7 i 8) zostały poprawnie sformułowane, podkreślając zarówno cel pracy, jak i najważniejsze osiągnięcia. Po nim zamieszczono rozbudowany spis literatury (rozdział 9), obejmujący 346 pozycji literatury, co świadczy o dogłębnym przestudiowaniu omawianych zagadnień.

Uwagi do pracy

Rozprawa doktorska została przygotowana starannie, jednakże przy tak imponującej pracy, doktorantka nie uniknęła drobnych błędów edytorskich. W spisie treści pominięto podrozdział 5.3. Trajectories of repetitive DNA evolution in *Brachypodium* genus. W rozdziale 2. Aims of the thesis, niepotrzebne jest powtórzenie celu pracy w trzecim zadaniu badawczym. Podrozdział 3.9 Phylogenetic analysis opisuje tylko jeden aspekt - przygotowanie drzewa filogenetycznego, dlatego w tym przypadku nie ma uzasadnienia wprowadzenia dodatkowego podpunktu, a w podrozdziale 4.1. Phylogenetic relationships in *Brachypodium* genus błędnie wskazano 13 zamiast 12 analizowanych gatunków *Brachypodium*. Te drobne niedociągnięcia nie wpływają na bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy.

Nawiązując do tematyki badawczej będącej przedmiotem rozprawy mam następujące pytania:

1. W rozdziale „Metody”, brakuje mi wyjaśnienia jakimi kryteriami się kierowano przy wyborze narzędzi bioinformatycznych. Czy rozważano użycie technologii long-reads np. PacBio, które mogłoby lepiej uchwycić strukturę sekwencji powtarzalnych?
2. Wyniki przedstawione w pracy wskazują na ewolucyjną i potencjalnie adaptacyjną rolę różnych typów powtarzalnego DNA, szczególnie retrotranspozonów LTR. Czy prowadzone są badania dotyczące wpływu różnorodności powtarzalnego DNA na ekspresję genów, fenotyp, lub adaptację ekologiczną gatunków *Brachypodium*? / W jaki sposób zmiany w wielkości genomu i składzie repeatomu mogą wpływać na biologię lub ekologię tych gatunków?
3. W pracy szczegółowo opisano odmienny obraz organizacji sekwencji powtarzalnych dla różnych gatunków i poziomów ploidalności. Jakie mechanizmy (np. duplikacje genomowe, transpozycje, selekcja naturalna) najprawdopodobniej przyczyniły się do powstanie tej zmienności?
4. W pracy były stosowane różne techniki badawcze, w tym analiza RepeatExplorer2, hybrydyzacja metodą Southerna oraz fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). Proszę o omówienie ograniczeń użytych technik analitycznych, potencjalnych źródeł błędów, jak mogły one wpłynąć na wyniki, bądź w jaki sposób starano się potencjalne błędy wyeliminować?

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Dany Trunovej stanowi wartościowe i oryginalne opracowanie zagadnień związanych z ewolucją sekwencji powtarzalnych DNA w genomach diploidalnych i poliploidalnych rodzaju *Brachypodium*. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością metod badawczych z zakresu biologii molekularnej, bioinformatyki i cytogenetyki, umiejętnie łącząc analizy eksperymentalne z interpretacją w kontekście ewolucyjnym. Wyniki pracy mają istotne znaczenie poznawcze, dostarczając nowych informacji o procesach ewolucyjnych kształtujących genomy roślin, zwłaszcza w kontekście hybrydyzacji i poliploidyzacji. Najważniejsze osiągnięcia naukowe wynikające z badań prowadzonych przez Doktorantkę obejmują: (i) Identyfikacja stopniowej reorganizacji powtarzalnego DNA w allopoliploidalnym *B. hybridum*, co ma znaczące implikacje dla

zrozumienia mechanizmów ewolucji poliploidalnej; (ii) Obserwacja nieaddytywnych wzorców dziedziczenia sekwencji powtarzalnych u poliploidów; (iii) Wsparcie dla „hipotezy biblioteki” dotyczącej ewolucji DNA satelitarnego; (iv) Ujawnienie złożonej dynamiki ewolucyjnej rodzin satelitarnego DNA; (v) Wykazanie związku między zróżnicowaniem wielkości genomu a zawartością powtarzalnego DNA. Każde z tych osiągnięć wnosi istotny wkład w zrozumienie ewolucji powtarzalnego DNA oraz jego roli w kształtowaniu genomów w obrębie rodzaju *Brachypodium*. Wskazują one na złożoność i dynamikę ewolucji genomu, podkreślając potrzebę łączenia różnych metod badawczych, aby uzyskać pełniejszy obraz historii ewolucyjnej.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Dany Trunovej pt.: „Repetitive DNA sequences and the evolution of the *Brachypodium* genus” spełnia wymagania zawarte w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571). W związku z tym stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani Dany Trunovej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora. Ponadto, z uwagi na podjęcie bardzo złożonego problemu, wysoką wartość naukową pracy, oraz szeroki zakres metod wykorzystanych w badaniach, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Agnieszka Marasek-Ciołakowska

Agnieszka Marasek-Ciołakowska

