

Prof. dr hab. Dariusz Iwan
Muzeum i Instytut Zoologii PAN
00-679 Warszawa
ul. Wilcza 64

Warszawa, 7.09.2015

**Ocena rozprawy doktorskiej magistra Jana Jakuba Pomorskiego
pt. Molekularna charakterystyka oksydazy cytochromowej 1 (COI) oraz jej wkład
w bioenergetyczną adaptację organizmu do środowiska**

Oksydaza cytochromowa jest białkiem mitochondrialnym, ostatnim ogniwem łańcucha oddechowego biorącym udział w oddychaniu tlenowym na poziomie komórkowym. Odkrycie związków zwanych cytochromami i roli jaką pełni oksydaza cytochromowa zawdzięczamy Dawidowi Keilinowi, wybitnemu entomologowi badającemu adaptacje larw pasożytniczych muchówek. Keilin do 17 roku życia mieszkał w Warszawie (jego rodzice byli Polakami), natomiast karierę naukową zaczynał we Francji w 1906 roku, a następnie kontynuował w Anglii, gdzie w latach 20-tych XX wieku rozpoczął badania eksperymentalne w dziedzinie biochemii. Od czasu ukazania się jego pierwszej publikacji (1925 rok) do dnia dzisiejszego minęło niespełna 90 lat.

O roli jaką pełni oksydaza cytochromowa świadczy liczba opracowań naukowych i popularno-naukowych. W wyszukiwarkach internetowych można znaleźć blisko 7 milionów stron zawierających opracowania na ten temat, w tym liczne pliki graficzne i filmy. Niewątpliwie przyczyniło się do tego opracowanie i opublikowanie w 2003 roku przez Heberta i współautorów metody identyfikacji gatunkowej osobników na podstawie ich sekwencji DNA tzw. barkodingu DNA. W metodzie tej wykorzystuje się fragment genu pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej (COI). Rozwój technik analiz molekularnych i obniżenie ich kosztów oraz rozwój profesjonalnych baz danych dostępnych poprzez sieć internetową ułatwił pozyskanie informacji o sekwencjach COI obejmujących świat organizmów żywych.

Ponad 5 milionów sekwencji COI zgromadzonych w bazie BOLD, to zbiór zweryfikowanych wiarygodnych danych umożliwiających przeprowadzanie analiz statystycznych, które pozwalają zarówno na formułowanie, jak i rozwiązywanie oryginalnych

problemów badawczych. Z takiej sposobności skorzystał Doktorant przedstawiając do oceny rozprawę dotyczącą molekularnej charakterystyki COI. Dodatkowo próbował rozwiązać problem związany z potencjalnym wkładem COI w bioenergetyczną adaptację organizmów do środowiska.

Przedstawiona do oceny praca liczy ogółem 146 stron, w tym 122 strony tekstu zawierające 24 ryciny i 19 tabel. Na pozostałych 24 stronach znajduje się 15 załączników oznaczonych literami od A do N. Do pracy dołączona jest płyta CD z plikami zawierającymi rozprawę oraz dodatkowo listy gatunków użytych do analiz miejsc funkcjonalnych i zmienności domen oraz modeli białek. Struktura pracy jest typowa dla rozpraw doktorskich: Wstęp, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura.

Obszerny wstęp w punkcie pierwszym zawiera dokładny opis budowy i funkcjonowania oksydazy cytochromowej. Punkt drugi zatytułowany jest trochę na wyrost „Bioenergetyka i adaptacja organizmów do środowiska”. Zawiera on szereg luźnych informacji i wyników badań na temat powiązań: tempo metabolizmu, a funkcjonowanie oksydazy cytochromowej na poziomie komórkowym oraz organizmalnym. Wydzielony w tym punkcie podpunkt „Charakterystyka genomu mitochondrialnego” jest również zbiorem cytowań publikacji obejmującym cały świat organizmów żywych, kładącym akcent na informacjach dotyczących tempa mutacji. Są też przytoczone dane o tempie ewolucji (strona 15). Czy Doktorant uważa, że pojęcia te są tożsame? W punkcie trzecim została scharakteryzowana metoda barkodingu DNA. Uważam, że w pracy naukowej sensowne jest przedstawianie argumentów naukowych, niezależnie czy są za, czy przeciw prezentowanym hipotezom i teoriom. Wprowadzanie argumentów i sformułowań z innych dziedzin życia społecznego jest zbędnym balastem. Cytowanie pracy (Mora i inni 2011), która prezentuje wyniki oparte na ankiecie przeprowadzonej wśród taksonomów jest takim właśnie przykładem. Jaki sens naukowy mają szacunkowe wyliczenia, że koszt opisanie nowego gatunku wynosi 48 500 US\$, stąd trzeba przeznaczyć 364 bilionów US\$, 1 200 lat pracy 303 000 klasycznych taksonomów, aby poznać bioróżnorodność Ziemi, której obecną znajomość autorzy szacują na 14% (liczba również dyskusyjna)? Czy jest to jedyny argument za wprowadzeniem metody barkodingu? Doktorant pisze „sytuacja zmieniła się w roku 2003 wraz z powstaniem idei barkodingu DNA”. Dalej czytamy, że zarejestrowanych jest w bazie BOLD (luty 2015 rok) ponad 5 mln sekwencji dla 229 945 gatunków roślin, grzybów, zwierząt i Protista (czyli przez 12 lat funkcjonowania metody). Jeżeli zgodzimy się z polaryzowaną przez autora publikacji (Mora i inni 2011) liczbą

gatunków żyjących na Ziemi (ca. 11 mln) i opisanych (1,2 mln), to należy stwierdzić, że przy zastosowaniu metody barkodingu scharakteryzujemy gatunki już opisane za 6 lat, a wszystkie żyjące za kolejnych 50 lat. Oczywiście zakładając, że wszystkie przeżyją i nie bierzemy pod uwagę już wcześniej wymarłych. A jeżeli gatunków jest 100 mln. (są takie szacunki), to trzeba będzie jeszcze 600 lat. Wiarygodność tych polaryzacji jest tak niska jak zaprezentowanych w pracy Mora i inni (2011). Kolejnym argumentem paranaukowym jest cytowanie artykułu zawierającego zapis rozmowy dziennikarza z naukowcami opublikowanego w „Conservation in Practice” (Holloway 2006). Dotyczy on lobbingu na rzecz projektu zastosowania barkodingu do badań bioróżnorodności obszaru „Area de Conservación Guanacaste” na Kostaryce. Doktorant cytuje zarzuty przeciwników stosowania metody barkodingu i odrzuca je pisząc „... celem tej [barkodingu] inicjatywy jest próba uzdrowienia taksonomii oraz zdemokratyzowanie dostępu do bioróżnorodności i taksonomii” - są to tezy zaczerpnięte bezpośrednio z publikacji Hollowaya (2006). Wolałbym, aby w stosunku do metody barkodingu były używane pojęcia „teoria” i „hipoteza” niż „idea” lub inicjatywa”. Doktorant uniknąłby również sformułowań, których dzisiaj nawet klasyczny taksonom nie odważyłby się zastosować w stosunku do przyszłości barkodingu: „Można go [„barkoding”] bowiem traktować jako system diagnostyczny dla gatunków żyjących na Ziemi, ponieważ nawet jeśli nie przyporządkuje danego organizmu do gatunku, to będzie w stanie zidentyfikować wyższy takson, do którego on należy. Wówczas można przeanalizować inny gen ... lub przekazać okaz do taksonoma w celu ostatecznej identyfikacji czy też opisu diagnostycznego”. Wartościowe w tej części Wstępu jest klarowne przedstawienie podstaw genetycznych i taksonomicznych stosowania metody barkodingu oraz stwierdzenie, że „nie można odrzucać potencjału, jaki ze sobą [barkoding] niesie”.

Wstęp, mimo podania dużej liczby luźno powiązanych informacji obejmujących szeroki zakres tematyczny, napisany jest językiem zrozumiałym dla przeciętnego biologa, w sposób klarowny i uporządkowany. Doktorant wykazuje się znajomością najnowszej literatury oraz poprawnie formułuje cele pracy. Zasadniczy, pierwszy cel, dotyczy zastosowania wskaźników zmienności sekwencji nukleotydowej genu COI do badań taksonomicznych związanych z wyznaczaniem taksonów szczebla gatunkowego i rodzajowego oraz wyższych jednostek. Drugi zasadniczy cel pracy (pkt 5) dotyczy określenia potencjalnego wkładu COI w bioenergetyczną adaptację organizmów do środowiska. Cele pozostałe (pkt 2-4) związane są z opisem molekularnej charakterystyki COI. Sprawie barkodingu i taksonomii (pkt 1. w rozdziale Cel

pracy) Doktorant poświęcił blisko połowę swojej dysertacji, jednak nie zaznaczył tego w temacie pracy. Wydaje się, że oceniana rozprawa doktorska zawiera trzy tematy badawcze, które z powodzeniem mogłyby zostać zrealizowane jako trzy odrębne prace: 1) charakterystyka molekularna COI (przy tak szerokim potraktowaniu problemu nie bałbym się, że miałyby charakter opisowy, ponieważ powiązanie wielu faktów na różnych poziomach budowy i funkcjonowania COI stanowi oryginalny wkład do nauki), 2) zagadnienia związane z barkodingiem, 3) wkład COI w bioenergetyczną adaptację organizmu do środowiska (oczywiście organizmu zwierzęcego, może tak właśnie należałoby uściślić temat obecnej dysertacji).

Rozdział „Materiał i metody” zawiera opis analiz, w których stosowane są poszczególne ciągi procedur według schematu: 1) zestawienie zbioru danych (taksony/sekwencje), 2) zastosowane oprogramowanie, 3) założenia metodyczne przeprowadzonych analiz. Przeprowadzono cztery analizy: 1) analiza dystrybucji zmienności sekwencji nukleotydowej we fragmencie genu COI stosowanym w projekcie barkodingu DNA – dla porównania sekwencji nukleotydowych użyty został program ClustalW wchodzący w skład MEGA6, który wykorzystywany był również w pozostałych analizach, 2) analiza zmienności nukleotydowej i aminokwasowej w domenach białkowych COI we fragmencie stosowanym w projekcie barkodingu DNA oraz analiza presji selekcyjnej – wykorzystano program TMHMM do lokalizowania potencjalnych domen oraz program PAST do analizy rozkładu danych oraz testów Shapiro-Wilk, 3) analiza dystrybucji zmienności sekwencji nukleotydowej w kompletnych sekwencjach COI – użyto programów MEGA6 i TMHMM, 4) charakterystyka trójwymiarowej struktury COI – przy pomocy programu I-Tasser tworzono trójwymiarowe modele białek, których struktury porównywano z wykorzystaniem programu LGA, właściwości fizykochemiczne i ich porównanie określone były przy użyciu programów ProtParam, Tool, PROPKA3.1, H++, ProteinStability, PoPMusic 2.1, mCSM, Deep-ViW/Swiss-Pdb Viewer, VMD, BeAtMusic, wizualizacja struktur uzyskanych modeli białek wykonana była przy wykorzystaniu programów Jalview i PRALINE. Doktorant korzystał z następujących baz danych: BOLD (pobrane były sekwencje nukleotydowe stanowiące część genu COI, przepisywane były również na sekwencje aminokwasowe, użyte w analizie 1 i 2), GenBank (pobrane były sekwencje COI z bazy białek, użyte w analizie 3); UniProt dla porównania otrzymanych wyników zlokalizowanych domen białkowych (analiza 2); na podstawie danych z bazy Conserved Domains Database ustalane były lokalizacje wszystkich analizowanych

aminokwasów, baza RCSB Protein Data Bank dla danych do programu PoPMusic 2.1 (analiza 4). Niestety w przypadku pierwszych dwóch analiz Doktorant nie podał jakie sekwencje jakich gatunków zostały wykorzystane do badań, w przypadku trzeciej analizy dane zostały załączone na płycie CD, natomiast czwarta analiza oparta była na 15 gatunkach (taka liczba widnieje w tekście na stronie 26) jednak tabela 3 zawiera jedynie wykaz 14 gatunków, w tym *Bos taurus* (gatunek referencyjny, którego struktura trzeciorzędowa COI została eksperymentalnie określona). *Bos taurus* czyli tur europejski jest to nazwa nadana przez Linneusza, najczęściej interpretowana jako nazwa zbiorcza wszystkich ras bydła domowego. Czy jest to takson jednorodny genetycznie, szczególnie jeśli chodzi o COI?

Wyniki i Dyskusja przedstawione są w trzech głównych punktach: 1) analiza zmienności pierwszej podjednostki genu COI, 2) analiza zmienności nukleotydowej i aminokwasowej w domenach COI, 3) analiza COI u wybranych gatunków zwierząt pod względem strukturalnym oraz funkcjonalnym.

Doktorant przedstawił 8 wniosków. Pierwszy, może być traktowany jako przyszła hipoteza badawcza. Doktorant potwierdził „zasadę 10-krotności” w stosunku do grup szczebla rodzajowego (6 na 8 analizowanych grup). Zasada 10-krotności stosowana jest w barkodingu na poziomie gatunku – zmienność sekwencji pomiędzy gatunkami jest przynajmniej 10 razy większa niż wewnątrz gatunku, co umożliwia przypisanie danego osobnika do danego gatunku. Drugi i trzeci wniosek są bardzo szczegółowe i dotyczą charakterystyki COI (struktura domen oraz konserwatywność sekwencji COI), podobnie wniosek 5 (brak istotnego wpływu zmian aminokwasów na konformację i stabilność COI), wnioski 6 i 7 zawierają ciekawe informacje na temat nicieni, dotyczy zmienności aminokwasów tworzących kanały protonowe D i K oraz ścieżkę transportu elektronów. Rozwinięcia wymagałyby wniosek 4 dotyczący presji selekcyjnej na badane domeny oraz wniosek 8 dotyczący modyfikacji aminokwasów w specyficznych miejscach i ich znaczenia adaptacyjnego w przypadku interakcji COI z innymi podjednostkami. Przedstawione wnioski nawiązują przede wszystkim do problematyki badawczej sformułowanej w pierwszej części tematu dysertacji „Molekularna charakterystyka oksydazy cytochromowej 1 (COI)”.

W rozdziale „Literatura” znajduje się 285 pozycji piśmiennictwa opracowanych w sposób standardowy, blisko 30% prac zostało opublikowanych w ostatnich 6 latach, 9 w roku 2015. Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury, również tej najnowszej,

związanej z tematem badawczym. We właściwy sposób wykorzystał cytowania, zarówno we wstępie, przedstawianiu metod, jak i w dyskusji.

Praca napisana jest poprawną polszczyzną, z wykorzystaniem terminologii fachowej. Doktorant posiada umiejętności objaśniania trudnych problemów z zakresu genetyki molekularnej.

Układ treści i tekstu jest na ogół poprawny. Mankamentami, które nie miały istotnego wpływu na przedstawienie i zrozumienie zawartych treści były literówki i błędy w końcówkach (strona 9, 14, 17, 19, 28, 29, 53, 81, 83, 84, 94), powtórzenie części tekstu na stronie 34 (akapit zaczynający się „Na podstawie wykonanego przyrównania...”), niedokładne opisy w tabelach np. na stronie 40, 42 i 43 (ostatnia kolumna opisana jako „stosunek”, dopiero z tekstu można dowiedzieć się co to za relacja), tytuły załączników J, K i N zamieszczone są na końcu (czasami na 5 stronie danego załącznika).

Zanim przedstawię najważniejsze z moich zastrzeżeń odwołam się do cytatu doktoranta, który znalazł się na końcu dyskusji dotyczącej wykorzystania sekwencji COI w taksonomii (strony 77-83). Zaczyna się on następująco: „Wszystko to uwidacznia także, jak ważna jest w całej tej kwestii praca taksonów”. Pewnie doktorant miał na myśli „taksonomów”, jednak, pewnie przez przypadek, sformułował prawidłowy wniosek. W przedstawionych przez niego analizach nie procedury i algorytmy statystyczne, lecz taksony powinny „pracować”. To one „dają” sekwencje, czyli realną informację biologiczną. Zastrzeżenia moje budzi dobór danych do analiz. Doktorant sam odkrył, lecz niezbyt chętnie przyznał się, że popełnił błąd w przypadku przeprowadzenia analizy zmienności COI. Dane do tej analizy stanowił zbiór sekwencji podzielonych na 4 grupy zgodnie z klasyfikacją: motyle, chrząszcze, ślimaki i ptaki. Liczba sekwencji wynikała z dostępności danych (takie ograniczenie w doborze danych bardzo utrudniło przeprowadzenie również innych analiz) i wynosiła 81 dla każdej grupy zgodnie z zasadą 3 osobniki x 3 gatunki x 3 rodzaje x 3 rodziny. Jak już wspomniałem Doktorant nie podał wykazu taksonów i sekwencji. Wyniki przeprowadzonych porównań zmienności wewnątrz taksonu i między taksonami na poziomie gatunku, rodzaju i rodziny wykazały potwierdzenie zakresu statystycznej wystandaryzowanej przez założenia metody barkodingu zmienności tych taksonów z wyjątkiem chrząszczy. Duża zmienność wewnątrzgatunkowa tej grupy spowodowana była wykorzystaniem sekwencji trzech następujących gatunków: *Moneilema armatum*, *Liparthrum pilosum* i *Apanarthrum glabrum* (dopiero w rozdziałach Wyniki i Dyskusja Doktorant wymienia konkretne gatunki stanowiące

materiał badawczy). Po usunięciu danych tych gatunków średnia zmienność wewnątrzgatunkowa w grupie chrząszczy zmniejszyła się z 0,032 do 0,020 i osiągnęła oczekiwane wartości, czyli potwierdziła zasadę 10-krotności. Zasada ta została sformułowana na podstawie zbioru danych pochodzących z dotychczasowych badań COI (barkoding). Wysoka zmienność międzygatunkowa i jednocześnie niska wewnątrzgatunkowa umożliwiają ustalenie zakresu zmienności charakterystycznego dla danego gatunku, a co za tym idzie jego identyfikację. Wysoka zmienność wewnątrzgatunkowa przekraczająca 10% wskazuje na to, że „nie są to gatunki genetycznie jednorodne i wśród nich mogą występować gatunki kryptyczne” (cytat ze strony 36). Sekwencje wymienionych powyżej trzech gatunków umieszczone były w bazie danych po wykonaniu konkretnych badań opisanych w publikacjach: *Moneilema armatum* – Smith i Farrel (2005), *Liparthrum pilosum* – Jordal i inni (2004), *Apanarthrum glabrum* – Jordal i inni (2006). *Moneilema armatum* to bezskrzydły chrząszcz z rodziny kózkowatych zamieszkujący pustynne obszary pogranicza USA i Meksyku. Badania oparte na sekwencjach mitochondrialnych tego gatunku pozwoliły na przetestowanie hipotezy dotyczącej rozszerzania się jego zasięgu występowania w kierunku północnym w okresie postglacjalnym. Wcześniej gatunek ten tworzyły izolowane, małe populacje. Jest to klasyczny przykład występowania warunków sprzyjających takim zjawiskom jak inbred, czy też dryft genetyczny, co z kolei może doprowadzić do szybkiego zróżnicowania się populacji (lub jej wymarcia) i specjacji. Drugi przypadek dużej zmienności wewnątrzgatunkowej dotyczy *Liparthrum pilosum*, czyli kornika żerującego na roślinach z rodzaju *Euphorbia*. Jordal i inni (2004) przeprowadzili badania pokrewieństwa w obrębie rodzaju *Liparthrum* wykorzystując mitochondrialne i jądrowe DNA oraz cechy morfologiczne. Badane korniki to endemity zamieszkujące poszczególne obszary tzw. Makaronezji (są to wyspy u wybrzeża północno-zachodniej Afryki). Już badania wstępne wykazały duże zróżnicowanie wewnątrz populacji kilku gatunków, w tym jednego jeszcze formalnie nie opisanego, oznaczonego jako L. 'pilosum'. Wydzielono 3 linie o nazwach L. 'pilosum' A, L. 'pilosum' B i L. 'pilosum' C. Dalsze badania (konstruowanie drzewa filogenetycznego) dowiodły, że populacje te znalazły się w 3 różnych kładach. Autorzy za oznaczenie podziękowali specjalście dodając, że formalny opis został przez niego dokonany i jest w druku „Knizek, in press”. Do dnia dzisiejszego nazwa *L. pilosum* nie została opublikowana wraz z opisem gatunku, zgodnie z zasadami Międzynarodowego Kodeksu Nomenklatury Zoologicznej. Trzeci przypadek dotyczy kornika *Apanarthrum glabrum* żerującego na gałązkach roślin z rodzaju *Euphorbia*. Jordal i inni (2006)

w oparciu o badania mitochondrialnego i jądrowego DNA testowali hipotezę o sympatrycznej specjacji dwóch endemicznych taksonów: podgatunku *A. glabratum nudum* i gatunku *A. subglabrum* występujących na wyspie La Palma (Wyspy Kanaryjskie). Podgatunek *A. glabratum glabratum* nie występuje na La Palma, ma jednak szerszy zasięg (Teneryfa, El Hierro i La Gomera). Badania mDNA wskazały na bliższe pokrewieństwo *A. subglabrum* i *A. glabratum nudum*, co dowodziłoby jednorazowego skolonizowania wyspy La Palma i zajścia specjacji sympatrycznej. Jednak wyniki badań jądrowego DNA i budowy aparatów kopulacyjnych wskazują na bliższe pokrewieństwo *A. glabratum nudum* i *A. glabratum glabratum*, a to zakłada zajście wielokrotnej kolonizacji wyspy La Palma przy wcześniejszej specjacji allopatrycznej. Podobieństwo w budowie mDNA pomiędzy *A. glabratum* i *A. glabrum nudum* zostało wytłumaczone introgresją, która zaszła w wyniku hybrydyzacji; niedopasowanie genetyczne i/lub różnice w budowie aparatu kopulacyjnego tłumaczą sympatryczne występowanie tych dwóch taksonów. Ponadto gatunek *A. glabratum* ma dwa, wyraźnie zróżnicowane morfologicznie i genetycznie, podgatunki. Podobne problemy (duża zmienność wewnątrzgatunkowa) wystąpiły również w przypadku jednego gatunku ślimaka należącego do polifiletycznego taksonu Littorinimorpha. Brak wykazu gatunków, których sekwencje pozyskano do badań uniemożliwia określenie wpływu ich pokrewieństwa na uzyskane wyniki dotyczące porównania zmienności COI.

Mniej istotne, ale kłopotliwe lub mylące dla czytelnika, jest stosowanie wymiennie w całym tekście nazw taksonów wyższych np. „chrząszcze Coleoptera”, „chrząszcze (Coleoptera)”, „chrząszcze”, „Coleoptera”, brak jednorodnego schematu tworzenia list taksonów (alfabetyczny lub systematyczny), albo używanie starego systemu klasyfikacji – „gromada Insecta” (obecnie podział na Ectognatha i Endognatha). Ważniejszym jednak mankamentem jest założenie, że ranga taksonu wyższego np. rodziny, rzędu, gromady w klasyfikacji linneuszowskiej jest wystandaryzowana i można porównywać taksony tych samych szczebli należące do ślimaków, owadów, ryb, ptaków i ssaków. Czy są to taksony naturalne? Uzyskane wyniki potwierdzają tezę o jałowości takich analiz. Jeżeli namawiałbym Doktoranta do porównań, to tylko na poziomie rodzaju, i to tylko dlatego, że można znaleźć jakieś teoretyczne podstawy mówiące, że rodzaj jest jednostką naturalną np. pojęcie „geniation”, czyli zjawiska tworzenia się rodzaju opisane przez Dubois (1988). Stąd za bardzo ciekawe uważam wnioskowanie Doktoranta dotyczące możliwości wykorzystania wskaźników zmienności drugiego nukleotydu i zmienności aminokwasów do grupowania gatunków w

rodzaje. Zachęcam do dalszych badań i udziału w dyskusji poruszającej problem czy rodzaj jest taksonem naturalnym. Namawiam do większej odwagi w budowaniu hipotez i interpretacji wyników.

Zgadzam się z Doktorantem, że „dobra baza jest kluczowym elementem identyfikacji gatunków. Bez niej, niezależnie od tego, dla ilu osobników zostanie zsekwencjonowany fragment genu COI, nie będzie możliwa żadna identyfikacja, czy to gatunków, czy to rodzajów. Dlatego tak ważna jest współpraca pomiędzy genetykami i taksonomami” (strona 83). W obecnej chwili nie trzeba udowadniać korzyści płynących z wprowadzenia metody barkodingu DNA, raczej należy podjąć działania nad jej dalszym testowaniem, wprowadzaniem nowych technik i szerszym wykorzystywaniem. Doktorant już to uczynił badając i wskazując na domeny konserwatywne umożliwiające zaprojektowanie uniwersalnych starterów do PCR przy wykorzystaniu do identyfikacji gatunkowej minibarkodów (są to krótkie sekwencje COI zawierające 100-200 pz) np. w przypadku okazów muzealnych lub materiału kopalnego. Uważam, że najbardziej wartościowa część badań i uzyskanych wyników dotyczy molekularnej charakterystyki COI. Doktorant udowodnił, że zna i potrafi posługiwać się nowoczesnymi technikami analizy danych w zakresie genetyki molekularnej.

Olbrzymia praca włożona przez Doktoranta w wykonane analizy oraz szeroki zakres tematyki badawczej sprawiły, że nabył On doświadczenie badawcze, które z pewnością zapoczątkuje w przyszłości. Jestem przekonany, że uzyskane w czasie realizowania doktoratu wyniki powinny być opracowywane i publikowane. Moje krytyczne uwagi traktuję jako dyskusję naukową, mając nadzieję, że zostanie wykorzystana i pomoże w tworzeniu przyszłych projektów badawczych Doktoranta.

Uważam, że przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie magistra Jana Jakuba Pomorskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Dariusz Iwan

