UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
Wydział Biologii
ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738-8383, -8414, -8416 • e-mail: biologia.dziekanat@uwb.edu.pl

Białystok, 2023.08.23

Dr hab. Ada Wróblewska, prof. UwB
adabot@uwb.edu.pl
tel. 85 738 84 24

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Kamila Szandara

pt.: Analiza efektywności genomów organellowych w badaniach zmienności i struktury genetycznej populacji rzadkiego i zagrożonego gatunku *Pulsatilla patens* (L.) Mill.

Formalny aspekt rozprawy

Rozprawa doktorska Pana mgr Kamila Szandara została wykonana pod kierunkiem dr hab. Moniki Szczecińskiej, prof. UWM oraz promotora pomocniczego dr Katarzyny Krawczyk w Katedrze Botaniki i Ochrony Przyrody, Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. Rozprawa obejmuje stronę tytułową, źródło finansowania badań Doktoranta, spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, informacje bibliometryczne współautorskich prac naukowych włączonych w rozprawę doktorską, wprowadzenie do tematyki i zagadnień rozprawy doktorskiej, załączone dwie oryginalne prace naukowe oraz oświadczania promotora, autora pracy i oświadczenia współautorów. Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnych tematycznie dwóch współautorskich, anglojęzycznych oryginalnych prac naukowych merytorycznie ze sobą powiązanych, które ukazały się w 2022 r. i 2023 r. w BMC Plant Biology i Genes. Łączna liczba punktów MEiN z tych publikacji wynosi 240, a impact factor 9,401. W tych pracach Doktorant jest pierwszym autorem oraz jednym z korespondencyjnych autorów w pierwszej z nich. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR. W przypadku każdego artykułu wkład pracy Doktoranta został opisany bardzo dokładnie, potwierdzając jego wiodącą rolę w prowadzonych badaniach i przy przygotowaniu poszczególnych publikacji. Wkład wszystkich pozostałych osób w powstawanie rozprawy doktorskiej mieści się w ramach

współpracy naukowej, która wpisuje się w standardowe przygotowanie doktoratu. W zakres współpracy chodzi zwyczajowo rola pełniona przez promotora w trakcie przygotowania prac, promotora pomocniczego oraz korzystanie z pomocy w zakresie analiz terenowych i laboratoryjnych oraz statystycznych, która jest naturalnym zjawiskiem. Nie mam wątpliwości, że wkład mgr Kamila Szandara spełnia wymogi samodzielności w przygotowaniu rozprawy doktorskiej.

Układ rozprawy doktorskiej jest konsekwentnym poszerzaniem i uszczegółowianiem badań z zastosowaniem odpowiednich narzędzi do analiz, pozwalających na weryfikację hipotez oraz odpowiedzi na postawione pytania. Podsumowując uważam, że rozprawa doktorska mgr Kamila Szandara spełnia warunki formalne.

Ocena merytoryczna

W pierwszych rozdziałach rozprawy doktorskiej, mgr Kamil Szandar wprowadził czytelnika w tematykę badawczą przedstawiając syntetycznie wszystkie potrzebne zagadnienia związane z tematem pracy. Główny cel badań oraz hipotezy zostały przedstawione szczegółowo i rzeczowo, pozwalając w konsekwencji śledzić je i weryfikować w poszczególnych publikacjach. Przedstawiono finansowanie badań przez NCN w ramach konkursu MINIATURA 3 oraz ze źródeł Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020. Poruszane, przez mgr Kamila Szandara, w rozprawie doktorskiej zagadnienie badawcze skoncentrowały się na sekwencjonowaniu i określeniu struktury mtDNA i cpDNA, transferu sekwencji cpDNA do mtDNA oraz wykorzystaniu zmiennych sekwencji do określenia różnic wewnątrz – i międzypopulacyjnych u *Pulsatilla patens*. Należy podkreślić, że Doktorant słusznie wskazał na potrzebę badań na poziomie mitogenomu u Angiospermae, w szczególności do weryfikacji filogenezy tej grupy roślin oraz możliwości identyfikacji osobników w sensie genetycznym. Zagadnienie filogenezy w oparciu o mtDNA u okrytonasiennych jest jeszcze słabo zbadane, a niewątpliwie niesie za sobą potencjał naukowy. Analiza statystyczna otrzymanych wyników w publikacjach została przeprowadzona i opisana wyczerpująco oraz poprawnie, a do rekonstrukcji mitogenomu wykorzystano dwa podejścia w sekwencjonowaniu. We wprowadzeniu do rozprawy doktorskiej mgr. K. Szandara obecnych jest kilka zagadnień, na które chciałabym zwrócić uwagę i według mnie wymagają one dodatkowego wyjaśnienia. W przypadku dwóch z nich chciałaby się skupić w tym miejscu recenzji, a pozostałe omówię przy dwóch publikacji. Doktorant ocenił, że transfer genów plastydowych do mitogenomu był raczej wielokrotny na pierwszych etapach różnicowania się Angiospermae, stąd moje pytanie o podstawy (dowody) tego typu wnioskowania. Czy w

rozdziale 4.3 Analiza zmienności genów kodujących białka nie powinno być podane ... *39 porównywanych genów* ... ?

Publikacje włączone do rozprawy doktorskiej

Pierwsza publikacja Szandar K., Krawczyk K., Myszczyński K., Ślipko M., Sawicki J., i Szczecińska M. 2022. Breaking the limits - multichromosomal structure of an early eudicot *Pulsatilla patens* mitogenome reveals extensive RNA-editing, longest repeats and chloroplast derived regions among sequenced land plant mitogenomes. BMC Plant Biology 22: 109, podejmuje ważne wieloaspektowe zagadnienia związane z wyborem materiału genetycznego jakim jest DNA mitochondrialne względem chloroplastowego w analizach historii ewolucyjnej u Angiospermae. Analizę DNA mitochondrialnego jako alternatywę dla DNA chloroplastowego pod kątem wcześniej wspomnianych zagadnień, ale również badania transferu fragmentów cpDNA do mtDNA wykonano z użyciem dwóch technik Pacific Biosciences Sequel (PacBio) oraz sekwencjonowania nanoporowego w postaci długich fragmentów DNA jako technologii trzeciej generacji. DNA oraz RNA wyizolowano z materiału roślinnego pochodzącego z polskiej populacji Rudne. Ostatnia z molekularnych technik okazała się najbardziej efektywna w odczytaniu i złożeniu mitogenomu *P. patens*, który składa się z trzech kontigów (chMt1-chMt2). Tym samym po raz pierwszy w literaturze Doktorant i współautorzy przedstawili obecność liniowego mtDNA zbudowanego z trzech chromosomów i zweryfikowali hipotezę (H1) o wyłącznym istnieniu kolistego mtDNA w rodzinie Ranunculaceae. Należy uznać to za znaczący wkład autorów w analizę mitogenomu u okrytonasiennych, którzy dodatkowo szczegółowo opisali układ sekwencji mtDNA u *P. patens*, liczącego długość 986 613 pz. Istotnym wkładem Doktoranta i współautorów jest wskazanie na wykorzystanie 39 genów kodujących białka mtDNA do badań filogenetycznych (H2). Zapewne należałoby jeszcze szczegółowo je przetestować, aby ostatecznie wykazać ich uniwersalny charakter w badaniach u Ranunculaceae. Niemniej jednak wykorzystanie sekwencji kodujących białka rzuciło światło na wczesne rozejście się linii ewolucyjnych *Aconitum*, *Anemone* i *Pulsatilla*. Jest to interesująca alternatywa dla cpDNA, które jest bardziej konserwatywne pod kątem tych analiz. Z drugiej strony pozostały niewyjaśnione, czekające na kolejne wyzwania i badania pozycje genów *DNApol* i *RNApol* oraz ich możliwego znaczenia w filogenezie. Na analizy czeka również wyjaśnienie znaczenia transferu 26,7% sekwencji (z wyłączeniem kopi IR) cpDNA do mtDNA u *P. patens*.

W drugim z artykułów Szandar K., Sawicki J., Paukszto Ł., Krawczyk K. i Szczecińska M. 2022. Are the Organellar Genomes Useful for Fine Scale Population Structure Analysis of

Endangered Plants?—A Case Study of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Genes 14(1): 67, autorzy przedstawili wykorzystanie nowych referencyjnych sekwencji w DNA plastydowym i mitochondrialnym w analizując strukturę genetycznych *P. patens* na poziomie wewnątrz – i międzypopulacyjnym. Hipotezy H3, H4 oraz H5 postawione w rozprawie doktorskiej zakładające różnice w zmienności między dwoma typami DNA, określające możliwość identyfikacji haplotypów za ich pomocą oraz historię ewolucyjną tego gatunku, zostały tutaj zweryfikowane. We wstępie pracy autorzy wyjaśnili czynniki środowiskowe i antropogeniczne wpływające na zanikanie populacji tym samym możliwość wyginięcia tego gatunku, wzorce różnorodności genetycznej oraz strukturę filogeograficzną określoną, we wcześniejszej pracy autorstwa Szczecińska i in. (2016) za pomocą markerów mikrosatelitarnych. Syntetycznie opisano wyniki z pierwszej przedstawionej pracy przez Doktoranta i współautorów, dotyczące struktury DNA chloroplastowego i mitochondrialnego. Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym z wcześniej analizowanych pięciu polskich populacji, przygotowując biblioteki z pomocą TruSeq DNA kit oraz stosując techniki sekwencjonowania TruSeqX Illumina. Dane sekwencyjne uzyskane przy użyciu Illumina pozwoliły zmapować uzyskany chloroplastowy genom stosując referencyjny *P. patens* (KR297058.1) oraz genom mitochondrialny z pierwszej przedstawionej publikacji przez Doktoranta posłużył, również jako referencyjny, do odczytu.

Na uwagę zasługuje szczegółowe przedstawienie i porównanie efektywności tych dwóch genomów pod kątem zastosowania ich w analizie historii ewolucyjnej sasanki otwartej oraz zestawienie i porównanie z wynikami uzyskanymi za pomocą markerów mikrosatelitarnych. Daje to niewątpliwie alternatywę i nowe spojrzenie na badania ewolucyjne i pochodzenie gatunków, ale również na dokładniejszą, chociaż zapewne droższą i pracochłonną molekularną, identyfikację osobników. Ponadto wykorzystanie 14 konserwatywnych sekwencji mtDNA powyżej 10 kpz pozbawionych sekwencji cpDNA w wewnątrzgatunkowej analizie pozwoliło otrzymać nieco odmienne wyniki grupowania się haplotypów cpDNA i mtDNA. Do tego zagadnienia trzeba niewątpliwie podejść ostrożnie w interpretacji, pamiętając o sposobie dziedziczenia organelli u poszczególnych organizmów, tempie mutacji, wielkości tych genomów i ich zmianach w strukturze. Do istotnych osiągnięć Doktoranta, w niniejszej publikacji zaliczam próbę: (1) spojrzenia wieloaspektowego polegającego na porównaniu genomów organellowych, a tym samym zasobów genomowych *P. patens* oraz jej historii ewolucyjne, (2) określenie unikalnego dla sasanki otwartej układu genów plastydowych w mitogenomie, pozwalające na prześledzenie ewolucji transferu DNA chloroplastowego do mitochondrialnego. Jest to jednocześnie wstęp do dalszych badań zasobów genetycznej różnorodności na trzech poziomach organizacji genomowej u roślin w aspekcie DNA jądrowego, chloroplastowego i mitochondrialnego.

Sposób przedstawienia wyników i krytyczna ich analiza podlegały już ocenie przez recenzentów czasopism, w których zostały opublikowane dwa artykuły. Niemniej jednak pozostaje kilka pytań, które nie zostały do końca wyjaśnione, lub zostały omówione szczątkowo. Dlatego prosiłabym Doktoranta o odniesienie się do tych zagadnień, które przedstawiłam poniżej.

1. Jakie są możliwości wyjaśnienia licznych sekwencji genowych kodujących białka w mtDNA rodzaju *Pulsatilla*? W pierwszej publikacji główne wnioski skupiały się w rozdziale Dyskusja wyłącznie na porównaniu liczby tych genów między niektórymi rodzajami i gatunkami, dlatego warto byłoby wyjaśnić to zjawisko nie tylko poprzez wysoką różnorodność mtDNA.
2. Nieobecność genów *rps*10 oraz *sdh*3 nie zostały stwierdzone w mitogenomie *Pulsatilla*. W tym przypadku można byłoby pokusić się o wyjaśnienie ich znaczenia w ekspresji genów i odziaływaniu na fenotyp.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Kamila Szandara jest wieloaspektowym pod kątem genomu mitochondrialnego i chloroplastowego, interesującym opracowaniem naukowym. Chciałabym podkreślić, że pomimo kilku uwag wniesionych przeze mnie w niniejszej recenzji, moja ocena rozprawy doktorskiej jest pozytywna. Doktorant wykazał się on umiejętnością syntezy danych, zdolnością pracy w zespole, a jego prace wzbogacają badania dotyczące mitogenomiki u Angiospermae.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kamila Szandara spełnia wszelkie wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2023.742 t.j ze zm.). Z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego wniosek o dopuszczenie mgr Kamila Szandara do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, 23.08.2023

dr hab. Ada Wróblewska, prof. UwB