UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANI
Wydział Biologii

Poznań, 03.08.2023 r

Dr hab., prof. UAM Katarzyna Buczkowska-Chmielewska
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Recenzja

Rozprawy Doktorskiej pana dr. Kamila Szandara

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

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 15 czerwca 2023 r zgodnie z wymogami określonymi w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023.742 ze zm.).

Formalny opis rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska wykonana została pod kierunkiem naukowym pani dr hab. Moniki Szczecińskiej, prof. UWM, promotora oraz pani dr Katarzyny Krawczyk, promotora pomocniczego, na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Temat rozprawy doskonale wpisuje się w problematykę badawczą wokół której koncentrują się prace zespołu kierowanego przez panią promotor, dr hab. Prof. UWM Monikę Szczecińską.

Podstawą rozprawy doktorskiej są dwa artykuły naukowe. Oba artykuły są pracami eksperymentalnymi, które zostały opublikowane w języku angielskim w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Ponadto rozprawa obejmuje opracowanie w formie manuskryptu liczącego 29 stron, które zawiera informację o źródle finansowania badań, Streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, Wstęp, który pozwala na umiejscowienie kontekstu wykonanych badań na tle dotychczasowej wiedzy z zakresu genomiki, jak również rozdziały Materiał i Metody, Wyniki, Podsumowanie a także obszerne zestawienie Literatury. Ważnym elementem powyższego opracowania jest przedstawienie hipotez badawczych i szczegółowych celów pracy. Ta część rozprawy napisana jest interesująco i przejrzyście, należy

stwierdzić, że Doktorant wykazał się dobrą znajomością badanych zagadnień i umiejętnie wprowadził czytelnika w problematykę rozprawy doktorskiej. Do dokumentacji zostały dołączone oświadczenia Autora rozprawy, promotora i pozostałych współautorów publikacji, potwierdzające wkład Doktoranta w przygotowanie manuskryptów. Po przeanalizowaniu zamieszczonej dokumentacji uważam, że rozprawa doktorska pana dr. Kamila Szandara spełnia wymogi formalne.

Temat rozprawy i cel badań

Obiektem badań jest *Pulsatilla patens*, gatunek rzadki i ginący, nie tylko w Polsce ale także w całej Europie. Gatunek ten jest jednym z najbardziej zagrożonych gatunków roślin w Europie, jego obecny zasięg jest rozdrobniony. Populacje sasanki otwartej podlegają obecnie licznym zagrożeniom wynikającym zarówno z naturalnych zmian szaty roślinnej, jak również przekształceń antropogenicznych siedlisk, dlatego też wielkość populacji stale spada. Poznanie zasobów genowych istniejących populacji oraz rozpoznanie procesów genetycznych je kształtujących odgrywa istotną rolę w podejmowaniu skutecznej ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem. Informacje płynące z badań genetycznych pozwalają spojrzeć z nowej perspektywy na działania dotyczące aktywnej ochrony wielu rzadkich i zagrożonych gatunków. Rozprawa doktorska pana dr. Kamila Szandara mieści się w tym bardzo ważnym nurcie badań mającym na celu poznanie zasobów genomowych zagrożonych gatunków, na poziomie całych genomów organellowych, w celu ochrony najcenniejszych populacji.

Celem badań podjętych przez pana Kamila Szandara w ramach rozprawy doktorskiej jest analiza efektywności genomów organellowych w badaniach zmienności i struktury genetycznej populacji sasanki otwartej. Doktorant postawił 5 hipotez badawczych i aby je zweryfikować wyznaczył następujące cele szczegółowe: 1) Zsekwencjonowanie, złożenie i opisanie genomu mitochondrialnego *Pulsatilla patens*; 2) Wytypowanie regionów genomu mitochondrialnego użytecznych w badaniach filogenetycznych sasanki otwartej; 3) Scharakteryzowanie zmienności genomów organellowych na poziomie wewnątrz i międzypopulacyjnym; 4) Sprawdzenie, czy genomy mitochondrialne podobnie jak chloroplastowe mogą okazać się użytecznymi narzędziami w analizie genomiki populacyjnej i filogeografii roślin.

Temat, ze względu na ważną pozycję systematyczną *P. patens* oraz zagrożenie wyginięcia gatunku, jak również brak badań dotyczących zmienności genomów organellowych na poziomie międzypopulacyjnym i wewnątrzpopulacyjnym, uważam za aktualny i ważny. Uzyskane wyniki mają nie tylko wartość poznawczą, ale także mogą mieć istotne znaczenie

praktyczne w świadomym gospodarowaniu zasobami genowymi gatunku i będą pomocne dla lepszego zaplanowania programów ochronnych *P. patens*.

Konstrukcja rozprawy doktorskiej

Na ocenianą rozprawę doktorską pana dr. Kamila Szandara składają się następujące artykuły:

1. Szandar K., Krawczyk K., Myszczyński K. Ślipiko M., Sawicki J., Szczecińska M. 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 Biol 2022; 22, 109. https://doi.org/10.1186/s12870-022-03492-1
2. Szandar K., Sawicki J., Paukszto Ł., Krawczyk K., Szczecińska M. Are the organellar genomes useful for fine scale population structure analysis of endangered plants?—A case study of *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Genes. 2023; 14(1):67. https://doi.org/10.3390/genes14010067

Prace stanowiące rozprawę są wieloautorskie, jednak w obu pracach pan dr. Kamil Szandar jest pierwszym autorem i miał wkład w ich powstawanie, co potwierdzają załączone oświadczenia współautorów publikacji. Wkład Doktoranta i pozostałych autorów został opisany merytorycznie w sposób jednoznaczny. Analizując udział p. Kamila Szandara stwierdzam, że wymienione prace mogą być podstawą rozprawy doktorskiej. W obu publikacjach wkład p. dr. Kamila Szandara obejmował współudział w opracowaniu koncepcji badań, wykonanie doświadczeń laboratoryjnych, w tym izolacja DNA, współudział w sekwencjonowaniu nanoporowym (pierwsza praca) i w przygotowaniu bibliotek do sekwencjonowania Illumina (druga praca), przeprowadzenie analiz filogenetycznych i submisja sekwencji do Banku Genów (pierwsza praca) oraz wykonanie analiz bioinformatycznych (druga praca). W obu publikacjach Doktorant miał udział w przygotowaniu manuskryptu jak również w pracach na dalszych etapach ich procesu wydawniczego, a w pierwszej pracy jest jednym z autorów korespondencyjnych. Łączny IF załączonych publikacji z roku opublikowania wynosi 9,4, a pięcioletni 10,23. Sumaryczna liczba punktów wg MNiSZ wynosi 240, co w mojej ocenie, jest w zupełności wystarczające aby ubiegać się na ich podstawie o stopień doktora. Oba artykuły zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych z pierwszego i drugiego kwartyla (Q1: BMC Plant Biology; Q2: Genes). Warto zaznaczyć, że pierwsza praca ma już 4 cytacje bez autocytowań. W tych specjalistycznych czasopismach manuskrypty podlegały rygorystycznym procedurom recenzenckim przez ekspertów z dziedziny jakiej dotyczą badania, tak więc jakość i wartość naukowa przedstawionych wyników nie podlega dyskusji, nie ma zatem potrzeby ich

szczegółowego analizowania pod względem poprawności wykonanych badań, sposobu ich prezentacji, oraz ogólnej wartości merytorycznej.

Merytoryczna ocena rozprawy

Przedłożony do oceny zestaw artykułów jest starannie przemyślany i tematycznie spójny, dotyczy aktualnych zagadnień badawczych z zakresu genomiki porównawczej roślin. Zaplanowane badania posłużyły do weryfikacji 5 hipotez badawczych.

W pierwszej pracy celem było zsekwencjonowanie, złożenie i opisanie genomu mitochondrialnego, który dla *Pulsatilla patens* nie był do tej pory poznany. Zważywszy na fakt, że genomy mitochondrialne u roślin wyższych wykazują dużą zmienność wielkości jak również wysokie zróżnicowanie strukturalne cząsteczki, nawet u blisko spokrewnionych taksonów, to podjęte zadanie nie należało do łatwych i było możliwe dzięki zastosowaniu najnowszych technologii, w tym sekwencjonowaniania PacBio oraz Oxford Nanopore Technologies (ONT) w połączeniu z sekwencjonowaniem krótkich odcinków DNA i RNA. To ambitne zadanie zostało w pełni zrealizowane. Zastosowane tu techniki laboratoryjne, jak również przeprowadzone analizy bioinformatyczne wymagały od Doktoranta opanowania umiejętności laboratoryjnych i dużej wiedzy, a było to zapewne możliwe dzięki pracy w tak doświadczonym w tego typu badaniach zespole. Istotnym wynikiem badań było wykazanie, że genom mitochondrialny sasanki otwartej nie stanowi pojedynczej kolistej cząsteczki, lecz składa się z trzech cząsteczek liniowych, nazwanych tu chromosomami i oznaczonych chMt1-chMt3, które są zakończone przez odwrócone sekwencje powtórzone. Weryfikowana hipoteza (H1 w manuskrypcie), że genom mitochondrialny sasanki otwartej ma taką samą kolistą strukturę jak u wcześniej poznanych gatunków z rzędu *Ranunculales* (*Aconitum*, *Anemone*, *Nelumbo*) została odrzucona. Rząd jaskrowce jest najstarszą linią rozwojową dwuliściennych właściwych, tak więc wykazanie, że genom mitochondrialny *Pulsatilla patens* ma inną strukturę niż poznane dotąd gatunki tego rzędu jest bardzo ważnym głosem w dyskusji na temat ewolucyjnych zmian struktury cząsteczki mtDNA u roślin dwuliściennych. Zastosowane podejście metodyczne pozwoliło także na wykrycie genów polimerazy RNA i DNA, które rzadko występują w genomie mitochondrialnym roślin. Ponadto w genomie tym zidentyfikowano wiele regionów pochodzenia chloroplastowego. Analiza porównawcza genów mitochondrialnych trzech gatunków sasanki (*P. patens*, *P. alpina*, *P. pratensis*) wykazała podobny poziom zmienności pomiędzy gatunkami jak w kodujących fragmentach genomu chloroplastowego. Autorzy udowodnili, że pomimo skomplikowanej struktury, genom mitochondrialny może mieć zastosowanie w badaniach

filogenetycznych, filogeograficznych oraz w genetyce populacyjnej i wskazali 14 konserwatywnych regionów występujących w pojedynczej kopii w kodujących regionach, które mogą służyć jako markery w tym obszarze badań. Proszę Doktoranta o próbę oceny, czy informacje z uzyskanych wyników, będzie można wykorzystać w działaniach mających na celu ochronę zagrożonych gatunków?

W drugim artykule głównym celem było szczegółowe scharakteryzowanie zmienności genomów chloroplastowych i mitochondrialnych na poziomie wewnątrz- i międzypopulacyjnym. Jako istotne osiągnięcie należy podkreślić, uzyskanie nowych sekwencji referencyjnych obu genomów dla 16 osobników *P. patens* pochodzących z 5 populacji zlokalizowanych w północno-wschodniej Polsce, dla których następnie przeprowadzono analizy porównawcze. Należy też podkreślić, że analizę zmienności w genomie mitochondrialnym wykonano w oparciu o 14 regionów wyznaczonych w pierwszej pracy, jest to logiczna kontynuacja wcześniejszych badań i możliwość przetestowania hipotezy H3 i H4, które zostały sformułowane w załączonym do publikacji manuskrypcie. Postawione cele zostały z powodzeniem zrealizowane. Analiza porównawcza genomów chloroplastowych i mitochondrialnych u 16 analizowanych osobników wykazała niższą zmienność w genomie mitochondrialnym, jednak udowodniła, że dane z tego genomu umożliwiają molekularną identyfikację osobników *P. patens*, których nie można było rozpoznać w oparciu o dane z genomu chloroplastowego, tak wiec zapewniają dodatkową rozdzielczość w wykrywaniu haplotypów. Wykonane analizy pozwoliły wyróżnić wśród 16 badanych osobników 11 haplotypów, jednak haplotypy chloroplastowe i mitochondrialne nie są takie same. Podobnie, różne grupowanie w oparciu o te dwa zestawy danych otrzymano w analizie filogenetycznej. Zastanawiam się dlaczego do sieci haplotypów Doktorant nie włączył także osobnika P22-6 pochodzącego grupy genetycznej „southern", co mogłoby dać możliwość oceny, czy grupowanie haplotypów odzwierciedla pochodzenie geograficzne osobników, tym bardziej, że sekwencje genomu są, gdyż wykorzystano je do konstrukcji drzewa filogenetycznego. Proszę Doktoranta 1) o wyjaśnienie, w nawiązaniu do hipotezy H5, jak można wytłumaczyć powstałe rozbieżności. 2) Informacje z którego genomu, zdaniem Doktoranta, lepiej odzwierciedlają strukturę genetyczną i procesy zachodzące w populacji? 3) Przedstawione wyniki pokazały, że jedna populacja (P-9) ma wyższą zmienność, czy można zauważyć zależność pomiędzy poziomem wykrytej zmienności a wielkością populacji, z której pochodzą osobniki, oraz według jakich kryteriów wybrano populacje i osobniki do powyższych badań.

Ocena strony edytorskiej

Rozprawa nie zawiera zbyt wielu błędów edytorskich, co świadczy o starannym przygotowaniu manuskryptów. W pracy w Genes odnalazłam drobne nieścisłości w tekście np. oznaczenie osobnika P9-123 (w Tabeli 1 i na wykresach jest P9-122), str. 6 w piątym wierszu od góry „one nonsynonymous and one nonsynonymous SNP", czy liczba SNP w genomie chloroplastowym w populacji P9, na początku podrozdziału 3.2 jest liczba 58, a pod koniec 60. W autoreferacie zabrakło mi dokładnego wskazania, które wyniki odnoszą się do hipotezy 4 i 5, tak jak zostało to zrobione dla hipotez 1-3.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska pana dr. Kamila Szandara prezentuje wysoki poziom naukowy, biorąc pod uwagę bardzo duże znaczenie rozwiązywanego problemu, jakość wykonanych badań w oparciu o najnowsze techniki oraz wysoką rangę czasopism, w których zostały opublikowane uzyskane wyniki. Na podstawie analizy publikacji składających się na rozprawę doktorską stwierdzam, że założenia pracy zostały dobrze przemyślane a cele w pełni zrealizowane, przy zastosowaniu bardzo zaawansowanych metod badawczych. Jak wynika z autorstwa publikacji, badania były wykonane w szerszym zespole, jednak udział Doktoranta w wykonaniu badań i przygotowaniu rozprawy, zgodnie z oświadczeniami, nie budzi wątpliwości. Badania dostarczyły wartościowych danych, uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą i wnoszą istotny wkład w poznanie ewolucji struktury genomu mitochondrialnego na wczesnych etapach ewolucji roślin dwuliściennych. Opublikowane wyniki otwierają także możliwości wykorzystania mtDNA w badaniach na poziomie populacyjnym.

Wniosek końcowy

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska w pełni spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023.742 ze zm.). W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie dr. Kamila Szandara do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Katarzyna Buczkowska-Chmielewska

Poznań, 03.08.2023 dr hab. Katarzyna Buczkowska-Chmielewska, prof. UAM