Katedra Biogeografii,
Paleoekologii
i Ochrony Przyrody

Wydział Biologii
i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, dnia 26.08.2023 r.

Marcin Kiedrzyński, dr hab.

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

Ocena umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana w Katedrze Botaniki i Ochrony Przyrody, Wydziału Biologii i Biotechnologii UWM w Olsztynie pod opieką promotor dr hab. Moniki Szczecińskiej, prof. UWM oraz promotor pomocniczej dr Katarzyny Krawczyk. Pracę doktorską stanowi cykl dwóch, spójnych tematycznie publikacji naukowych opublikowanych w 2022 i 2023 roku i współfinansowanych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu MINIATURA 3 (projekt DEC-2019/03/X/NZ9/01374 – kierownik dr Kamil Szandar):

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.

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.

Artykuły zostały opublikowane w czasopismach z wysokim IF – 4,14 i 5,26 odpowiednio dla pierwszego i drugiego artykułu oraz o łącznej liczbie punktów MNiSW – 240. W obu pracach doktorant jest pierwszym autorem a jego wkład w powstanie prac jest wiodący. Według oświadczeń określających indywidualny wkład współautorów dr Kamil Szandar brał udział zarówno w opracowaniu koncepcji badań, analizach laboratoryjnych, analizach filogenetycznych, bioinformatycznych jak również w przygotowywaniu pierwotnych manuskryptów, w odpowiedziach na recenzje i w ostatecznym przygotowaniu publikacji do druku. Dr Kamil Szandar brał więc udział we wszystkich etapach badań, opracowania wyników i ich publikacji, w tym również na etapie skutecznego aplikowania o środki na badania, a później w ramach koordynacji projektu naukowego pełnił rolę kierownika. Biorąc pod uwagę powyższe dane **należy stwierdzić, że spełniony został przez doktoranta warunek umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Ocena rozprawy doktorskiej pod kątem prezentacji ogólnej wiedzy teoretycznej osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w określonej dyscyplinie

Tematyka badań prowadzonych w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej dotyczy możliwości uzupełnienia wiedzy o zasobach genomowych sasanki otwartej *Pulsatilla patens* (L.) Mill w oparciu o genomy organellowe. Wykorzystując materiał genetyczny zgromadzony na potrzeby wcześniejszych analiz genetycznych, w ramach ocenianego doktoratu, przeprowadzono badania, których celem była analiza efektywności genomów organellowych w badaniach populacyjnych. Podjęcie badań miało więc dwie istotne przesłanki, pierwsza dotyczyła poszerzenia wiedzy o strukturze genomów organellowych, druga – obejmowała wykorzystanie tej wiedzy do analizy zmienności i struktury genetycznej populacji gatunku ważnego dla zachowania różnorodności biologicznej kontynentu Europejskiego (gatunek umieszczony jest na światowej czerwonej liście IUCN oraz w Załącznikach II i IV Dyrektywy Siedliskowej UE).

Wszystkie aspekty teoretyczne podjętego problemu badawczego zostały w odpowiedni sposób zaprezentowane zarówno w samych publikacjach, jak i w dysertacji napisanej w języku polskim. Wprowadzenia do odpowiedniej problematyki badawczej i metodologii oraz dyskusja uzyskanych wyników zawarte w rozprawie w wyczerpujący sposób prezentują zagadnienia związane ze strukturą genomów organellowych u roślin, a w szczególności ze strukturą mitogenomów. W porównaniu do stosunkowo jednolitej wielkości mitogenomów zwierząt i grzybów, mitogenomy roślin lądowych są znacznie większe i bardziej zmienne, nawet między spokrewnionymi gatunkami. Częste zmiany strukturalne mitogenomów oraz przypuszczalnie niższa szybkość ewolucji w porównaniu z genomami plastydowymi sprawiają, że nie są one zwykle pierwszym wyborem w badaniach nad filogenetyką, filogeografią i genetyką populacyjną roślin (wyjątkiem są tu wczesne rośliny lądowe, takich jak mszaki,

których mitogenomy są stosunkowo stabilne ewolucyjnie). Tak było również w przypadku *P. patens*, której zmienność i strukturę genetyczną populacji w europejskiej części zasięgu, opisano za pomocą markerów mikrosatelitarnych. Porównano również efektywność markerów SSR i ISJ. W dotychczasowych badaniach nad *P. patens* zsekwencjonowano i opisano też genom chloroplastowy, który jednak nie był jeszcze wykorzystany w badaniach populacyjnych. Z powyższych względów podjęcie zadania polegającego na analizie możliwości wykorzystania mitogenomu w kombinacji z genomem chloroplastowym w genomice porównawczej wymagało dogłębnego przygotowania zarówno w sferze wiedzy teoretycznej jak i możliwości wykorzystania najnowszych osiągnięć technicznych i bioinformatycznych.

Zadanie, które należało wykonać na początku to zsekwencjonowanie i opisanie mitogenomu *P. patens*. Szczególnie interesująca jest pod względem przekazanego zasobu danych dyskusja struktury opisanego mitogenomu w stosunku do obecnej wiedzy na temat mitogenomów roślinnych. Dzięki temu można było wskazać te wyniki, które mają odkrywczy i nowatorski charakter. Zaprezentowana szczegółowa wiedza na temat genomów organellowych mogła być dalej z powodzeniem wykorzystana w analizach z zakresu genomiki populacyjnej.

Aspekt związany z ochroną różnorodności genetycznej małych i izolowanych populacji został również w odpowiedni sposób zaprezentowany w rozprawie. Przedstawiono znaczenie badań nad zmiennością genetyczną zagrożonych gatunków w aspekcie ich ochrony oraz oceny potencjału ewolucyjnego i zdolności adaptacyjnych populacji. Wyjaśniono niebezpieczeństwo wejścia takich populacji w tak zwaną „spiralę wymierania", napędzaną sekwencją niekorzystnych procesów demograficznych i genetycznych w populacjach. W odpowiedni sposób zaprezentowano również dotychczasową wiedzę na temat badanego gatunku, gatunków pokrewnych i spokrewnionych linii ewolucyjnych. Analiza piśmiennictwa cytowanego w publikacjach i w dysertacji również potwierdza odpowiednie przygotowanie teoretyczne Kandydata, które jest właściwe do podejmowanej nowatorskiej problematyki badawczej.

W mojej ocenie zaprezentowana rozprawa doktorska w zupełności spełnia wymóg prezentacji ogólnej wiedzy teoretycznej przez dr Kamila Szandara w zakresie dyscypliny nauki biologiczne.

Ocena rozprawy doktorskiej pod kątem rozwiązania oryginalnego problemu naukowego oraz oryginalnego rozwiązania w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych

Jak wspomniano wyżej w ramach wcześniejszych badań na zasobami genetycznymi sasanki otwartej *P. patens* w zespole badawczym do którego należy Doktorant zsekwencjonowano i opisano genom chloroplastowy, który charakteryzował się typową strukturą kolistą. Przeprowadzone analizy wskazały, że największą zmiennością wewnątrzgatunkową charakteryzują się regiony międzygenowe

ndhJ-ndhK, ndhD-ccsA oraz intron genu rps16, które z powodzeniem mogą być wykorzystane w badaniach ewolucyjnych w zakresie zmienności i struktury genetycznej populacji. W ramach ocenianej rozprawy podjęto dalsze badania, które miały na celu uzupełnienie wiedzy o genomach organellowych poprzez sekwencjonowanie dodatkowych genomów chloroplastowych i opisanie *de novo* genomu mitochondrialnego oraz wykorzystanie tej wiedzy w analizie zasobów genomowych gatunku na poziomie wewnątrzpopulacyjnym i międzypopulacyjnym.

Podjęty problem badawczy oraz odpowiednio sformułowany cel badań jest więc oryginalny w stosunku do dotychczasowych badań genomicznych nad *P. patens*, ale również w szerszym aspekcie badań nad ewolucją kladu wczesnych roślin dwuliściennych, do których należy rząd *Ranunculales*. Warto podkreślić, że w momencie rozpoczęcia badań, nie było znanych żadnych kompletnych sekwencji mitogenomów roślin z tego rzędu.

Wykorzystanie genomów mitochondrialnych roślin w analizach filogenetycznych i filogeograficznych bywa trudne ze względu na duże rozmiary mitogenomu, obecność długich powtórzeń oraz fragmentów pochodzenia plastydowego. Podejściem metodycznym, które można zastosować jest analiza regionów konserwatywnych, które mogą mieć duży potencjał w badaniach filogenetycznych. Podjęcie tego problemu przez Doktoranta jest więc oryginalne, ale stanowi również duże wyzwanie naukowe. Do tej pory, genomy organellowe wykorzystywano najczęściej do określenia dość „utrwalonych" powiązań filogenetycznych, często na poziomie międzygatunkowym, uwzględniając różnice w sekwencjach nukleotydowych poszczególnych genów. Informacje o zmienności wewnątrzgatunkowej i strukturze genetycznej populacji bazujące jednocześnie na danych z obu genomów organellowych nie były jeszcze przedmiotem większych analiz.

Oryginalność i nowatorstwo problemu badawczego dotyczą również podjętej z powodzeniem analizy porównawczej danych genomicznych z organelli z wynikami wcześniejszych analiz pochodzących z jądrowych markerów mikrosatelitarnych wykonanych na tych samych osobnikach. Dzięki temu uzyskano unikalną możliwość wielostronnych porównań – co było interesującym rozwiązaniem metodycznym.

W ramach dysertacji postawiono sześć hipotez, które testowano w ramach rozwiązania problemu badawczego. Przewidywano kolistą strukturę mitogenomu *P. patens* oraz występowanie regionów pojedynczej kopii jako potencjalnych markerów genetycznych. Przewidywano, ponadto, że genomy mitochondrialne wykazują niższy poziom zmienności populacyjnej w stosunku do genomów chloroplastowych, ale ich wykorzystanie rozszerzy możliwości identyfikacji haplotypów i genotypowania osobników. Zakładano również, że oba genomy organellowe ujawnią podobną historię ewolucyjną badanego gatunku.

Materiał roślinny użyty do badań obejmował łącznie 16 osobników *P. patens*, należących do pięciu populacji zlokalizowanych na terenie Polski północno-wschodniej. W badaniach zastosowano nowoczesne metody sekwencjonowania i opisu genomów. Wykorzystano techniki sekwencjonowania PacBio oraz Oxford Nanopore Technologies w połączeniu z sekwencjonowaniem krótkich odczytów

DNA i RNA. Zbadano zawartość genów oraz potencjał edycji RNA, rozkład powtarzających się sekwencji oraz w przypadku mitogenomu udział sekwencji pochodzących z plastydów. Sekwencjonowanie PacBio Sequel zostało wykonane przez firmę zewnętrzną natomiast sekwencjonowania nanoporowe z wykorzystaniem urządzenia MinION wykonano we zakresie zespołu badawczego. Następnie przeprowadzono analizę filogenetycznej pozycji genomu mitochondrialnego *P. patens* w oparciu o geny kodujące białka oraz sekwencje genów polimeraz RNA i DNA. W dalszej fazie przeprowadzono analizę filogenetyczną haplotypów cpDNA i mtDNA na poziomie wewnątrzgatunkowym oraz wykrywanie zmienności. Przeprowadzono międzygatunkowe analizy (*Pulsatilla alpina*, *P. patens* i *P. pratensis*) zmienności genów mitochondrialnych oraz zróżnicowanie nukleotydowe na poziomie rodzaju. W końcowym etapie przeprowadzono analizy zmienności wewnątrzgatunkowej oraz analizę zmian nukleotydowych, wykonano również wizualizację zmienności frekwencji SNP lub InDel między populacjami.

Wyniki badań nie potwierdziły hipotezy, że genom mitochondrialny *P. patens* charakteryzuje się kolistą strukturą. Wykazano natomiast, budowę wielochromosomową, na którą składają się trzy liniowe chromosomy flankowane przez odwrócone sekwencje powtórzone oraz unikalny dla rodzaju *Pulsatilla* układ regionów pochodzących z chloroplastów. Powtórzenia występujące w mitogenomie *P. patens* i kształtujące jego strukturę należą do najdłuższych, jakie dotąd zostały wykryte. Zidentyfikowano 14 regionów odpowiednich do wykorzystania w analizach genomiki porównawczej. Badania dostarczyły tym samym nowych cennych informacji o mitogenomie wczesnych dwuliściennych. Wyniki podważyły również ogólną hipotezę o jednokrotnym transferze chloroplastowego DNA do mitochondrium na wczesnym etapie różnicowania się roślin okrytozalążkowych.

W badaniach nad wewnątrzpopulacyjną i międzypopulacyjną zmiennością wykorzystano dane otrzymane z nowych sekwencji referencyjnych genomów organellowych. Potwierdziła się hipoteza o tym, że genom chloroplastowy charakteryzuje się większym poziomem zmienności w porównaniu do genomu mitochondrialnego. Porównawcza analiza danych dla 16 osobników *P. patens* z pięciu populacji pozwoliła na identyfikację 160 mutacji punktowych, w tym 64 substytucji i 96 indeli. Dane z mitogenomu ujawniły osiem razy mniej substytucji i sześć razy mniej indeli. Pomimo tej różnicy zarówno w genomie chloroplastowym, jak i mitochondrialnym zidentyfikowano tę samą liczbę haplotypów — jedenaście. Wykazano jednak niezgodność klastrów haplotypów mitochondrialnych i chloroplastowych. Nie zaobserwowano też zgodności rozmieszczenia osobników na drzewie filogenetycznym z ich położeniem geograficznym. Jednocześnie wykazano, że zmienność genetyczna populacji opisana za pomocą metod genomiki porównawczej różni się od danych uzyskanych za pomocą markerów jądrowych. Przeprowadzona analiza potwierdziła natomiast wykazany wcześniej ograniczony przepływ genów między populacjami.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały więc, że zastosowanie danych o genomach organellowych ma istotny potencjał w analizie zmienności genetycznej populacji badanego gatunku

i może otworzyć nowy rozdział w badaniach nad zagrożonymi gatunkami roślin. Wyniki przedstawione w rozprawie mogą służyć do dalszego opracowywania nowych markerów genetycznych. Będą stanowić podstawę do testowania kolejnych hipotez, zarówno dotyczących filogeografii *P. patens*, jak również adaptacyjnych odpowiedzi tego gatunku na zmieniające się warunki środowiskowe. **Sposób zaplanowania i przeprowadzenia nowoczesnych badań oraz opracowania wyników jest podstawą do mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy doktorskiej dr. Kamila Szandara pod kątem rozwiązania oryginalnego problemu naukowego oraz oryginalnego rozwiązania w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych.**

Drobne uwagi i pytania do Doktoranta:

1. Na stronie nr. 7 Autoreferatu Autor opisuje niekorzystne zmiany jakie zachodzą w zróżnicowaniu genetycznym małych i izolowanych populacji roślinnych. Jako równorzędne wymienione są: depresja wsobna i zwiększenie poziomu homozygotyczności, sugeruje się również, że zachodzą one równocześnie. W mojej opinii takie sformułowania nie oddają dość precyzyjnie natury depresji wsobnej, która jest charakteryzowana przez fenotypowe symptomy genetycznej degeneracji osobników, np. utratę wigoru itp. Najczęściej depresja inbredowa jest następstwem zwiększonej homozygotyczności, więc trudno mówić o tym, że zachodzi równocześnie.
2. Na stronie 19 autoreferatu w opisie porównującym wyniki zmienności genetycznej w populacjach wkradł się błąd dla poziomu heterozygotyczności obserwowanej w populacji Zabiele (P15), zamiast Ho= 0.102 podano Ho=102.
3. Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktoranta wskazują, że dane o zmienności i strukturze genetycznej populacji oraz molekularna identyfikacja osobników mogą różnić się a nawet prezentować odmienne wzorce w zależności od użytych markerów genetycznych. Jaki może to mieć wpływ na interpretację historii ewolucyjnej gatunku (populacji) oraz kształtowanie strategii ochrony jego zasobów genowych?
4. Czym można wyjaśnić niezgodność uzyskanych wyników struktury genetycznej i pokrewieństwa filogenetycznego osobników *P. patens* opartych na genomach organellowych z ich rozmieszczeniem geograficznym?

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę powyższe uwagi oraz **pozytywną ocenę doktoratu** dr. Kamila Szandara we wszystkich ocenianych aspektach stwierdzam, że spełnia on warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023.742 ze zm.) stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o **dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań i wysoką rangą uzyskanych wyników, zwracam się do ww. Rady z wnioskiem **o wyróżnienie rozprawy doktorskiej dr. Kamila Szandara.**

Marcin Wiedrzyński