

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29-Listopada 54, 31-425 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.:

„Struktura i ewolucja kariotypu w rodzaju *Crepis*”

autor rozprawy:

mgr Magdalena Senderowicz

FORMALNA I MERYTORYCZNA OCENA ROZPRAWY

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi cykl trzech spójnych tematycznie artykułów naukowych opatrzonych wspólnym opracowaniem. Artykuły zostały opublikowane w latach 2021-2022, w międzynarodowych czasopismach naukowych z zakresu nauk o życiu i charakteryzujących się znaczącymi wskaźnikami bibliometrycznymi tj.: *Plants* (IF₂₀₂₁=4,658, pkt._{MNISW}=70), *Genes* (IF₂₀₂₁=4,141, pkt._{MNISW}=100) i *International Journal of Molecular Sciences* (IF₂₀₂₁=6,208, pkt._{MNISW}=140). Wszystkie artykuły są wieloautorskie i mają od 4 do 7 autorów. Doktorantka jest drugim autorem w pierwszym artykule, który jest przeglądowy i pierwszym autorem w artykule drugim i trzecim, które są eksperymentalne. Włączone do dokumentacji oświadczenia współautorów artykułów eksperymentalnych wskazują na dominujący i merytorycznie istotny wkład Doktorantki w ich powstanie. Doktorantka prowadziła materiał badawczy, wykonała wszystkie analizy laboratoryjne obejmujące: izolację DNA, amplifikację markerów nrITS i cpDNA, przygotowanie preparatów cytogenetycznych i ich barwienie w DAPI i DAPI/CMA₃, przygotowanie sond do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), przeprowadzenie FISH, archiwizację analiz mikroskopowych oraz uczestniczyła w pomiarach wielkości genomu. Przeprowadziła analizy filogenetyczne, struktury kariotypu, ewolucji wielkości genomu i ewolucji loci rDNA, przygotowywała ryciny i manuskrypty publikacji. Natomiast oświadczenie Doktorantki co do jej wkładu w przygotowanie artykułu przeglądowego jest bardzo nieprecyzyjne i sprowadza się do stwierdzenia, że „mój udział polegał na pisaniu manuskryptu i przygotowaniu figur”, podobnie zresztą jak w przypadku trzeciego autora artykułu. Ponieważ jest to artykuł przeglądowy prosiłabym Doktorantkę o uszczegółowienie jakie rozdziały/podrozdziały i ryciny zostały przez nią przygotowane, czy w całości czy częściowo.

Rozprawa oprócz artykułów (Rozdział II), zawiera *Autoreferat rozprawy* (Rozdział I) obejmujący: Wprowadzenie, Cel pracy doktorskiej, Materiały i metody, Wyniki i dyskusję

oraz Literaturę; *Podsumowanie i wnioski* (Rozdział III); *Streszczenie* w j. polskim i angielskim (Rozdział IV i V) oraz *Oświadczenia autorów* (Rozdział VI).

Badania będące przedmiotem rozprawy były finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu OPUS 14 (2017/27/B/NZ8/01478) i zostały wykonane w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska UŚ pod kierunkiem Pani dr hab. Bożeny Kolano, prof. UŚ.

Wprowadzenie rozpoczynające *Autoreferat rozprawy* jest syntetycznym opisem przedstawiającym zagadnienia związane z podjętym przez Doktorantkę problemem badawczym. Autorka przybliżyła pojęcie genomu, zwraca uwagę na cechy charakterystyczne struktury genomów roślinnych, w szczególności na wysycenie genomu sekwencjami powtarzalnymi, w tym m.in. na geny kodujące rybosomalny RNA (rRNA) i ich znaczenie w badaniach filogenetycznych i cytogenetycznych nad ewolucją genomów roślinnych. Wprowadza w zagadnienia analizy struktury i ewolucji kariotypów, charakteryzuje rodzaj *Crepis* pod kątem cytogenetycznym i syntetycznie wspomina o metodach cytogenetycznych i molekularnych wykorzystywanych do analizy ewolucji genomów i kariotypów. Treści przedstawione w tym rozdziale uważam za właściwie dobrane i wyczerpujące w kontekście tematyki rozprawy doktorskiej. Niemniej jednak, wprowadzenie tytułów dla poszczególnych akapitów lub grup akapitów poprawiłoby jego czytelność. Tekst rozdziału został przygotowany w oparciu o liczną, w tym najnowszą, literaturę anglojęzyczną opublikowaną w uznanych czasopismach naukowych. Wynika z niego, że Doktorantka jest dobrze zorientowana o stanie aktualnej wiedzy w zakresie poruszanej tematyki.

Kolejny podrozdział *Autoreferatu rozprawy* to Cel pracy doktorskiej, w którym zostały sformułowane 4 hipotezy badawcze w odniesieniu do trendów i kierunków ewolucji w rodzaju *Crepis*, które Doktorantka weryfikowała w oparciu o trzy cele badawcze jakimi były: 1) zrekonstruowanie zależności filogenetycznych między badanymi gatunkami *Crepis*, które umożliwią badania nad ewolucją kariotypu i wielkości genomu, 2) poznanie trendów w ewolucji wielkości genomu i ewolucji podstawowej liczby chromosomów w rodzaju *Crepis* oraz 3) porównanie organizacji chromosomowej loci rDNA w rodzaju *Crepis*. Cele te są istotne dla poszerzenia wiedzy nt. mechanizmów ewolucji chromosomów roślinnych i znaczenia przemian chromosomowych w różnicowaniu się i specjacji gatunków.

Podrozdział Materiały i metody opisuje w skrócie materiał badawczy wykorzystany w badaniach i stosowane metody, łącznie dla wszystkich badań opisanych w dołączonym cyklu trzech artykułów. W sumie do wszystkich analiz Doktorantka wykorzystwała bardzo dużą, jak na tego typu badania, kolekcję obiektów w skład której wchodziło 55 cytotypów reprezentujących 45 gatunków *Crepis* i dodatkowo 4 inne gatunki (łącznie 6 obiektów) stanowiące grupę zewnętrzną w analizach filogenetycznych. Część opisująca stosowane metody w niektórych miejscach jest zbyt skrótowa, a czasami błędnie wyedytowana (jak np. wzór na indeks asymetrii, str. 16). Mimo, że część brakujących elementów można znaleźć w dołączonych artykułach, proszę Doktorantkę o doprecyzowanie następujących zagadnień:

1. z jakiej liczby roślin w obrębie cytotypu izolowano DNA
2. co zawierał bufor wykorzystany do ekstrakcji jąder komórkowych z liści, które potem były podstawą analizy cytometrycznej

3. ile roślin w obrębie cytotypu wykorzystano w analizach kariotypu
4. jaki był czas barwienia płytek metafazowych chromomycyną A₃ i DAPI w barwieniu różnicowym chromosomów?

Mimo powyższych pytań, cały rozdział pozwala zapoznać się na wystarczającym poziomie dla zrozumienia opisanych później wyników, z zastosowanymi materiałami roślinnymi i wykonanymi analizami.

Kolejny podrozdział rozprawy poświęcony jest omówieniu wyników zawartych w dołączonych dwóch artykułach eksperymentalnych i ich dyskusji. W akapicie wprowadzającym do tego podrozdziału Doktorantka nawiązuje do pierwszego artykułu z cyklu, który ma charakter przeglądowy i z oczywistych względów go nie omawia. Zapewne został on włączony w cykl artykułów stanowiących rozprawę doktorską jako swoiste wprowadzenie czytelnika w omawiane zagadnienia badawcze. I w rzeczy samej stanowi bardzo rzeczowy, ciekawy i obszerny przegląd literatury nt. wykorzystania narzędzi cytogenetycznych do interpretacji ewolucji genomu roślin okrytozalążkowych. Osobiście jednak, bardziej preferuję rozprawę doktorską składającą się tylko z artykułów eksperymentalnych. Tym bardziej, że w mojej opinii, liczba przebadanych materiałów i przeprowadzonych analiz jak również jakość i waga wygenerowanych wyników opisanych przez Doktorantkę w dwóch artykułach eksperymentalnych były wystarczające do przygotowania rozprawy doktorskiej.

W części nawiązującej do otrzymanych wyników, a opisanych w artykule drugim, Doktorantka przedstawia zależności filogenetyczne dla rodzaju *Crepis*, jakie zrekonstruowała w oparciu o markery jądrowe nrITS (ang. *nuclear ribosomal internal transcribed spacer*) i 5S rDNA NTS (ang. *not-transcribed spacer*) oraz cztery markery plastydowe. W efekcie przeprowadzonych analiz wyróżniono dwie linie ewolucyjne tj.: *Lagoseries* i *Crepis sensu stricto* z czterema kładami blisko spokrewnionych gatunków. Dalej przedstawia analizę struktury kariotypu badanych gatunków *Crepis*, która została przeprowadzona w oparciu o podstawową liczbę chromosomów, typy morfologiczne chromosomów i indeks asymetrii. Otrzymane wyniki wykazały duże zróżnicowanie liczby chromosomów oraz formuł kariotypu. Większość analizowanych gatunków była diploidalna, dla których wyróżniono 5 wartości podstawowej liczby chromosomów (od $x = 3$ do $x = 11$), przy czym najczęściej obserwowaną wartością było $x = 4$ oraz $x = 5$. Badania ewolucji podstawowej liczby chromosomów w tle filogenetycznym w oparciu o markery nrITS i chloroplastowe, wykazały, że dla obu linii ewolucyjnych ancestralna liczba chromosomów to $x=6$, a dominującym trendem w ewolucji chromosomów w rodzaju *Crepis* była dysploidalność zstępująca. Analiza indeksu asymetrii wykazała, że większość analizowanych gatunków charakteryzowała się symetrycznym kariotypem, a analizy formuły kariotypów wskazały na różnice w morfologii chromosomów blisko spokrewnionych gatunków. Kolejna omawiana sekcja odnosi się do wielkości genomu w rodzaju *Crepis*. Należy podkreślić, że w efekcie przeprowadzonych analiz **określono wielkość genomu po raz pierwszy dla 8 gatunków *Crepis***. Analiza ewolucji wielkości genomu wykazała, że ewolucji rodzaju *Crepis* towarzyszyły zarówno wzrosty jak i redukcje wielkości genomu, a stwierdzone zmiany w strukturze kariotypów jak i wielkości genomów

towarzyszyły głównie specjacji, rzadziej ewolucji całych grup blisko spokrewnionych gatunków.

W dalszej części Doktorantka omawia organizację loci rDNA na chromosomach oraz barwienie różnicowe CMA₃/DAPI (trzeci artykuł z cyklu). Identyfikacja lokalizacji genów kodujących rRNA została przeprowadzona w oparciu o fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* z wykorzystaniem sond 25S i 5S rDNA, standardowo stosowanych w tego typu badaniach. W tym miejscu warto podkreślić, że **dla 38 gatunków *Crepis* po raz pierwszy ustalono liczbę i lokalizację loci rDNA**. Analiza miejsc hybrydyzacji na płytkach metafazowych wykazała duży międzygatunkowy polimorfizm wzorów organizacji loci rDNA w rodzaju *Crepis*. W sumie wyróżniono ponad 20 różnych wzorów obejmujących zróżnicowanie zarówno w liczbie jak i lokalizacji loci rDNA. Cechą wspólną większości analizowanych kariotypów *Crepis* była lokalizacja locus 35S rDNA i 5S rDNA na krótkim ramieniu tego samego chromosomu odpowiednio dystalnie i proksymalnie. Natomiast pozytywny prążek CMA₃, wskazujący na obecność regionów bogatych w pary GC najczęściej kolokalizował z locus 35S rDNA. Analizy ewolucji chromosomowej lokalizacji loci rDNA wykazały, że wspólny przodek dla obu linii ewolucyjnych posiadał w kariotypie jeden locus 5S rDNA oraz jeden locus 35S rDNA, a najczęstszymi zmianami w ewolucji rodzaju były duplikacje w liczbie obu loci.

Ostatni podrozdział *Autoreferatu rozprawy* to Literatura. Obejmuje on 134 pozycje zacytowane w autoreferacie. Jest to bardzo wartościowe zestawienie piśmiennictwa dotyczącego struktury i ewolucji kariotypów i genomów roślinnych świadczące o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do prowadzenia badań i analizy ich wyników. Dwie pozycje z tego wykazu (Patterson 2009 i pozycja poniżej), na stronie 32 są niekompletne.

Rozdział *Podsumowanie i wnioski* to zbiór siedmiu dobrze i jasno sformułowanych punktów zestawiających najważniejsze informacje z przeprowadzonych badań i odpowiadających postawionym celom badawczym.

Streszczenia w j. polskim i angielskim właściwie podsumowują zakres prac oraz najważniejsze obserwacje poczynione przez Doktorantkę.

Poniżej kilka pytań do Doktorantki, które są efektem lektury recenzowanej rozprawy:

1. Kiedy, opisując geny rDNA używamy terminu 45S rDNA, 35S rDNA lub 25S rDNA?
2. Wg jakich przesłanek wybiera się standardy wielkości genomu w analizach cytometrycznych?
3. Jak często u roślin okrytozalążkowych spotykany jest wewnątrzgatunkowy polimorfizm chromosomowej organizacji loci rDNA? Na czym polega to zjawisko i w jaki sposób można wytłumaczyć jego występowanie?

PODSUMOWANIE

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Magdaleny Senderowicz jest wartościowym opracowaniem nt. struktury i ewolucji kariotypu rodzaju *Crepis*, a otrzymane

wyniki są oryginalne i w mojej opinii mają dużą wartość poznawczą. Tego typu badania oparte są m.in. na bardzo czasochłonnych analizach cytogenetycznych, wymagających od osoby je przeprowadzającej dużej precyzji, staranności, cierpliwości a także perfekcyjnego opanowania zaawansowanego warsztatu mikroskopowego oraz specyficznej, często nie prostej akwizycji i obróbki obrazów mikroskopowych. Po lekturze rozprawy jestem pod ogromnym wrażeniem liczby przebadanych cytotypów. W analizach cytogenetycznych często dużym wyzwaniem jest samo otrzymanie czytelnych płytek metafazowych, które jedynie są dopiero wstępem do wygenerowania właściwych wyników jakimi są pomiary chromosomów, parowanie chromosomów homologicznych (w czym w sprzyjających okolicznościach pomocne są markery cytogenetyczne takie jak np. geny rDNA) i wreszcie konstrukcja kariotypów. I nie należy zapominać, że wszystkie te analizy muszą być przeprowadzone na reprezentatywnej liczbie płytek metafazowych, najlepiej pochodzących z kilku osobników danego cytotypu. Na podkreślenie zasługuje także bardzo staranna dokumentacja graficzna zamieszczona w każdym artykule składającym się na rozprawę doktorską. Za szczególnie wartościowe w kontekście tematyki rozprawy uważam wzory dystrybucji loci rDNA i regionów bogatych w pary GC na chromosomach analizowanych cytotypów oraz rycinę przedstawiającą ewolucję podstawowej liczby chromosomów oraz ewolucje i lokalizacje liczby loci rDNA *Crepis sensu stricto* (odpowiednio tabela 1 i rycina 8 w trzecim artykule rozprawy). Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych materiałów i metod w celu uzyskania zakładanych celów i zweryfikowania postawionych hipotez. Wyniki zostały poprawnie opracowane, zaprezentowane, omówione jak również zinterpretowane i poszerzają dotychczasową wiedzę. Przedstawiona rozprawa wskazuje także na bardzo dobre przygotowanie teoretyczne Doktorantki w zakresie prowadzonych badań oraz na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując uważam, że złożona dysertacja spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18 marca 2011 roku (Dz. U. 2011, Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku (Dz. U. 2018, poz. 1669) i **wniosuję o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Senderowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Ponadto, z uwagi na wysoką wartość poznawczą wygenerowanych wyników jak i jakość ich prezentacji w artykułach składających się na rozprawę doktorską, **stawiam wniosek o jej wyróżnienie.**



Kraków, 6 sierpnia 2022

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK