

Warszawa, 08.08.2021

dr hab. Hanna Bolibok-Braęoszewska, prof. SGGW
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

DZIEKANAT WYDZIAŁU
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA
Wpłynęło dnia 10.08.2021r.

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Katarzyny Stelmach pt. "Analiza dystrybucji transpozonów *DcSto* w genomie marchwi oraz wykorzystanie polimorfizmu ich insercji do analizy struktury genetycznej populacji marchwi uprawnej (*Daucus carota* subsp. *sativus*)."

1. Podstawowe dane o kandydatce

Pani Katarzyna Stelmach jest absolwentką Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, kierunku Biotechnologia. Studia pierwszego stopnia (inżynierskie) ukończyła w lutym 2013r., studia drugiego stopnia ukończyła w czerwcu 2014 r. Tytuł magistra uzyskała 23.06.2004 na podstawie obrony pracy magisterskiej pt. „Dystrybucja wewnątrzgatunkowa i charakterystyka miejsc insercji retrotranspozonu *DcG01* u marchwi (*Daucus carota* L.)”, wykonanej pod opieką naukową prof. dr hab. Dariusza Grzebelusa. W latach 2014-2020 Kandydatka była uczestnikiem studiów doktoranckich Biotechnologia Roślin (dyscyplina Rolnictwo i Ogrodnictwo) na Uniwersytecie Rolniczym im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Od stycznia 2019 jest zatrudniona na stanowisku starszego technika w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii na Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Pani mgr inż. Katarzyna Stelmach nie ubiegała się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

2. Informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr inż. **Katarzyny Stelmach** obejmuje cykl trzech artykułów naukowych opublikowanych w latach 2017 – 2021.

Trzy prace naukowe wchodzące w skład opracowania to spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów w renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Wartości współczynnika wpływu (Impact Factor, IF) tych czasopism (wg

daty publikacji artykułu) wahają się od 3,161 do 4,117; ich łączny współczynnik wpływu wynosi 10,775, a suma cytowań w bazie Web of Science wynosi 10 (stan z dnia 03.08.2021). Wszystkie wyżej wspomniane prace są wieloautorskie. Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch z nich i drugim autorem w trzeciej pracy. Według deklaracji wkład Doktorantki w powstanie prac był bardzo duży i jednoznacznie wiodący w przypadku prac, gdzie jest ona pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami Doktorantki o udziale współautorów w publikacji ten wkład obejmował udział w sformułowaniu problemu badawczego, wykonanie analiz, laboratoryjnych i in silico, interpretację wyników, udział w napisaniu manuskryptów. W przypadku pracy opublikowanej w *Mobile DNA*, gdzie Doktorantka jest drugim autorem, jej deklarowany wkład związany był z wykonaniem analiz laboratoryjnych. Należy jednak podkreślić, że wyniki analiz laboratoryjnych są bardzo istotną częścią ww. publikacji. Oświadczenia pozostałych współautorów o ich udziale w publikacjach są zgodne z treścią oświadczeń Doktorantki oraz z udziałem autorów deklarowanym w samych publikacjach. Wkłady autorów nie zostały określone procentowo, co jednak nie przeszkadza w ocenie istotności wkładu Doktorantki w powstanie prac.

Cykl publikacji został poprzedzony opisem, liczącym 30 stron, na który składają się: Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wykaz używanych skrótów i terminów, Streszczenie (w jęz. polskim i angielskim), Przegląd literatury, Hipotezy badawcze i cele prowadzonych badań, Materiały i metody, Najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań, Podsumowanie (z wnioskami), Spis literatury. Badania zostały zrealizowane w ramach programu badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii na Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, a promotorem był prof. dr hab. Dariusz Grzebelus.

Tematyka badań opisanych w rozprawie związana jest z wykrywaniem i charakterystyką rozmieszczania ruchomych elementów genetycznych *DcSto* w genomie marchwi, opracowywaniem bazujących na ich polimorfizmie insercyjnym markerów molekularnych oraz charakterystyką zróżnicowania genetycznego odmian marchwi typu zachodniego przy pomocy opracowanego panelu markerów.

Tytuł rozprawy został sformułowany prawidłowo i dobrze oddaje tematykę zrealizowanych badań.

Z obowiązku z recenzenta odnotowuję, że wersje polska i angielska streszczenia różnią się nieznacznie pod względem treści: w wersji angielskiej nie ma opisu materiału roślinnego, w wersji polskiej nie ma informacji o liczbie resekwencjonowanych genomów wykorzystanych w badaniach, ani o liczbie markerów SNP wykorzystanych w analizie zróżnicowania genetycznego.

W streszczeniu angielskim (oraz w pierwszej i trzeciej publikacji z cyklu) pojawia się również błąd polegający na zaczynaniu zdania od liczby w zapisie cyfrowym. Właściwym w takiej sytuacji jest zapisanie liczby słownie. Chciałaby jednak podkreślić, że wyżej wspomniane różnice w streszczeniach dotyczą jedynie szczegółów i oba streszczenia dobrze przekazują najważniejsze informacje dotyczące wykonanych badań.

Opis cyklu publikacji został w mojej ocenie przygotowany bardzo starannie, zarówno pod względem językowym, jak i edycyjnym. W przeglądzie literatury Doktorantka w sposób rzeczowy i przystępny przedstawiła kluczowe informacje dotyczące ruchomych elementów genetycznych, ich klasyfikacji, roli w ewolucji genomów, metod identyfikacji ruchomych elementów MITE – wokół których koncentrowały się jej badania, możliwości wykorzystanie elementów MITE jako markerów molekularnych. Druga część przeglądu dotyczy charakterystyki obiektu badawczego – marchwi uprawnej i zawiera kluczowe informacje dotyczące historii udomowienia tego gatunku, głównych puli genowych, typów kształtu korzenia występujących w odmianach marchwi typu zachodniego, a także zawiera zwięzłe podsumowanie danych na temat transpozonów występujących w genomie marchwi, ze szczególnym uwzględnieniem elementów typu MITE. Przegląd literatury został przygotowany na podstawie 51 trafnie dobranych, wyłącznie anglojęzycznych publikacji naukowych, opublikowanych w uznanych czasopismach. Uwagę moją zwróciła Rycina 1, zamieszczona w przeglądzie literatury, przedstawiająca kształty korzenia spichrzowego u najpopularniejszych typów hodowlanych marchwi zachodniej. W legendzie, w którą została zaopatrzona rycina, nie znalazłam informacji o jej autorze, ani o źródle, z którego rycina pochodzi. Identyczna rycina (w wersji angielskiej) znajduje się w trzeciej publikacji z cyklu składającego się na pracę doktorską, opublikowanej w piśmie *BMC Plant Biology*. Zgodnie z informacją na pierwszej stronie publikacji, w odniesieniu do treści publikacji znajduje zastosowanie licencja *Creative Commons Attribution 4.0 International License*, która pozwala na reprodukcję treści, o ile wymienieni zostaną autorzy i źródło, podanie zostanie link do licencji i informacja, czy wprowadzone zostały modyfikacje. Zatem, informacje takie powinny być umieszczone w podpisie Ryciny 1.

W opisie pracy doktorskiej przedstawione zostały trzy hipotezy badawcze, oraz korespondujące z nimi trzy cele naukowe, które przytaczam poniżej:

1. Analiza dystrybucji insercji elementów *DcSto* w obrębie sekwencji kodujących genomu referencyjnego oraz 31 resekwencjonowanych genomów marchwi.
2. Opracowanie markerów molekularnych na opartych na polimorfizmie insercji *DcSto* zidentyfikowanych w genomie referencyjnym oraz w resekwencjonowanych genomach marchwi uprawnej typu zachodniego.

3. Analiza struktury zmienności genetycznej kolekcji odmian populacyjnych marchwi uprawnej typu zachodniego przeprowadzona w oparciu o opracowany panel markerów ILP i SNP.

Zarówno hipotezy jaki i cele badań zostały w mojej opinii trafnie i precyzyjnie sformułowane. Dobrze nawiązują do celów realizowanych w poszczególnych pracach z cyklu i potwierdzają jego spójny charakter. Są istotne poznawczo, dla poszerzania wiedzy o roli ruchomych elementów genetycznych oraz o badanym gatunku. Mają również wydźwięk praktyczny, gdyż ich realizacja może dostarczyć narzędzi i informacji użytecznych przy charakterystyce materiałów wykorzystywanych w hodowli i w tworzeniu nowych odmian.

W rozdziale Materiały i metody wypunktowano zbiorczo grupy materiału roślinnego wykorzystanego w poszczególnych publikacjach (podwojony haploid, linie wsobne, odmiany typu wschodniego i zachodniego, dzikie gatunki i podgatunki) i ich liczebności. Podano również informacje o źródłach pochodzenia tych materiałów. Zamieszczone zostały również 3 tabele z pełną listą materiału roślinnego wykorzystanego w poszczególnych publikacjach. Oceniam, że zamieszczenie tych tabel jest dobrym rozwiązaniem, ułatwia bowiem lekturę publikacji. Informacje na temat materiału roślinnego w tych publikacjach są zamieszczone bowiem (zgodnie z ogólnie przyjętą konwencją) w plikach dodatkowych, które nie stanowią części głównego pliku publikacji. W treści tego rozdziału nie ma natomiast żadnej informacji o wykorzystanych przez Doktorantkę metodach badawczych, czytelnik jest odesłany do odpowiednich rozdziałów każdej z publikacji. W istocie, szczegółowe opisy metod badawczych są tam zawarte, uważam jednak, że chociażby wyliczenie wykorzystanych przed Doktorantkę metod w rozdziale Materiały i metody byłoby wskazane. Ułatwiłoby to być może pełniejsze ocenienie wkładu Doktorantki w wykonane badania, zwłaszcza w sytuacji, kiedy w publikacji i w oświadczeniu współautorów deklarowany wkład ma identyczne brzmienie – jak na przykład w przypadku opisu wkładu w powstanie publikacji nr 2: panie Stelmach, Kwolek i Macko-Podgórnii deklarują, że wykonały weryfikację laboratoryjną a w przypadku pań Stelmach i Kwolek jest to jedyny ich deklarowany wkład – jedyną zatem przesłanką dotyczącą zakresu tego wkładu jest kolejność autorów tej publikacji.

Na podstawie informacji zawartych w poszczególnych publikacjach wnioskuję, iż Doktorantka opanowała i z sukcesem zastosowała szeroki wachlarz technik laboratoryjnych, bioinformatycznych/ biostatystycznych, począwszy od izolacji DNA i amplifikacji genomowego DNA, przez reakcję łańcuchową polimerazy i elektroforezę, po bioinformatyczną analizę sekwencji genomu, projektowanie starterów, analizowanie struktury populacji metodą bayesowską i metodą głównych składowych, analizę wariancji molekularnej, i inne. Metody te są bardzo dobrze dobrane do wyznaczonych celów badawczych, powszechnie uznane jako

obowiązujące w tego typu analizach. Pozwala mi to stwierdzić, iż Doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana warsztatowo do dalszej pracy naukowej.

Kolejny rozdział poświęcony jest opisowi wyników zwartych w poszczególnych publikacjach z cyklu.

Pierwszy artykuł, opublikowany we *Frontiers in Plant Science* (8,725), dotyczy opracowania dla analiz genetycznych marchwi panelu markerów molekularnych opartych na elementach typu MITE (*DcSto*). Do badań nad opracowaniem markerów ILP, wykrywających polimorfizm długości intronów (wynikający z obecności lub braku w danym intronie elementu mobilnego), wytypowano na podstawie analiz genomu referencyjnego marchwi 209 insercji transpozonów *DcoSto* w intronach. Po wstępnej weryfikacji eksperymentalnej (po lekturze publikacji i opisu nie mam wszakże jasności, ile i jakich form marchii wykorzystano na tym etapie badań) wybrano 90 biallelicznych markerów *DcILP*, które zastosowano następnie do analiz zróżnicowania genetycznego w kolekcji 27 obiektów marchwi, obejmującej 23 obiektów uprawnych i 4 dzikie. Wyniki genotypowania wykorzystano do obliczenia parametrów charakteryzujących skuteczność markerów molekularnych w wykrywaniu polimorfizmu (takich jak współczynnik PIC) oraz charakteryzujących populacje (np., heterozygotyczność obserwowana, oczekiwana). Dla uzyskania informacji o strukturze genetycznej badanej populacji wykorzystano metodę bayesowską (oprogramowanie STRUCTURE) i analizę głównych współrzędnych. Przeprowadzono również analizę wariancji molekularnej.

Przyjęta strategia pozwoliła na opracowanie bardzo skutecznych i stosunkowo łatwych w analizie (nie wymagających stosowania skomplikowanych technik laboratoryjnych, np. wysokorozdzielczych żeli) markerów molekularnych dla marchwi. Wprawdzie tylko około 50% przetestowanych par starterów umożliwiło amplifikację polimorficznych produktów, niemniej jednak opracowane markery molekularne okazały się być bardzo efektywne w analizach zróżnicowania genetycznego marchwi – po raz pierwszy w analizach zróżnicowania genetycznego marchwi udało się uzyskać grupowanie badanych osobników związane z typem kształtu korzenia spichrzowego. Uważam to za bardzo duży sukces naukowy, o potencjalnym znaczeniu praktycznym w charakterystyce materiałów hodowlanych. Uzyskane wyniki zostały odpowiednio przedyskutowane w odniesieniu do licznych pozycji literatury światowej, dotyczącej badanych zagadnień. Moje wątpliwości budzi jedynie zasadność porównywania wartości parametru PIC uzyskanego w różnych badaniach różnych gatunków. Autorka wprawdzie krótko wspomina w publikacji o dwóch czynnikach, które mogą wpłynąć na wartość tego parametru, ale prosiłabym Doktorantkę o szersze omówienie w trakcie publicznej obrony zagadnienia czynników wpływających na wartość PIC i możliwości porównywania jego wartości uzyskanych w różnych eksperymentach.

Drugi artykuł, opublikowany w piśmie *Mobile DNA* (10:47), został poświęcony analizie dystrybucji elementów ruchomych *DcSto* w 31 genomach marchwi, reprezentujących cztery pule genetyczne. Bardzo wszechstronne i dogłębne analizy bioinformatyczne pozwoliły na wychwycenie pewnych szczególnych fenomenów dotyczących insercji *DcSto*, np. istnienia bardzo znacznego polimorfizmu insercyjnego elementów *DcSto* u marchwi, różnej liczebności poszczególnych rodzin w genomach reprezentujących różne pule genowe, istnienia miejsc w genomie marchwi, w których szczególnie często dochodzi do insercji transpozonów, potencjalnej roli rodziny *DcSto7b* w procesie udomowienia marchwi. Autorzy nie poprzestali na analizach bioinformatycznych i przeprowadzili weryfikację eksperymentalną dla 39 spośród zidentyfikowanych insercji w intronach, zwiększając tym znacznie moc przeprowadzonego wnioskowania. Potwierdzono również występowanie w genomach marchwi równoległych miejsc insercji – analizy wykonano dla 11 ze 292 takich miejsc zidentyfikowanych *in silico*. W trakcie obrony chciałabym poprosić Doktorantkę o uzupełnienie informacji z części publikacji dotyczącej użytych metod o wyjaśnienie, z jakich względów analizy dotyczące amplifikacji intronów z insercjami elementów *DcSto* zostały poprzedzone amplifikacją całkowitego genomowego DNA. Nawiązując do wątku poruszonego w dyskusji (strona 11 publikacji) w nawiązaniu do stwierdzonej dla większości rodzin *DcSto* wyższej częstości unikalnych miejsc insercji w marchwiach dzikich niż w marchwiach uprawnych, chciałabym również poprosić Doktorantkę o zaproponowanie, jakie czynniki mogły spowodować zwiększoną aktywność transpozycyjną tych elementów w dzikich marchwiach i o rozwinięcie myśli o nieneutralności niektórych powiązanych z genami insercji. W mojej ocenie wyniki uzyskane w tej pracy mają bardzo wysoką wartość poznawczą, poszerzają wiedzę o naturze insercji transpozonów, ich dystrybucji w genomach i wpływie na kształtowanie genomów i zmienności genetycznej.

Ostatnia praca z cyklu, która ukazała się w czasopiśmie *BMC Plant Biology* (21:200), opisuje wykorzystanie 93 markerów polimorfizmu insercji transpozonów *DcSto* oraz 2354 markerów SNP do obszernej i wnikliwej analizy zróżnicowania genetycznego w kolekcji 78 odmian populacyjnych marchwi typu zachodniego, obejmującej różne typy kształtu korzenia spichrzowego. Każda z odmian była reprezentowana przez pięć roślin, badanych indywidualnie. W trakcie obrony chciałabym uzyskać od Doktorantki więcej informacji na temat, jakim przesłankami kierowała się, określając liczebność próby reprezentującej każdą z odmian populacyjnych będących przedmiotem analizy w tej publikacji na pięć osobników.

Oba typy markerów wykryły znaczny poziom polimorfizmu, również wewnątrzodmianowego. Na podstawie wyników genotypowania przeprowadzono szereg analiz biostatystycznych, w tym analizy struktury populacji i wariancji molekularnej. W efekcie w badanej kolekcji wydzielono kilka subpopulacji, obserwując przy tym związek między

grupowaniem obiektów i dostępnymi informacjami o historii hodowli marchwi typu zachodniego, oraz, częściowo, z typem kształtu korzenia. Uzyskane wyniki poddane zostały wnikliwej dyskusji. Ta część publikacji zawiera też bardzo użyteczną kompilację informacji o historii hodowli marchwi typu zachodniego. Dane te przedstawione zostały również na rycinie (Fig. 8), na której kolorystycznie przedstawiono powiązanie między typami hodowlanymi marchwi a grupami wyodrębnionymi po analizie statystycznej wyników genotypowania. Uważam to za bardzo trafne rozwiązanie, bardzo ułatwiające odbiór publikacji grupie czytelników zaliczających się do tzw. „wzrokowców” i wskazujące na talent Doktorantki do tworzenia informatywnych wizualizacji. Praca ma dużą wartość poznawczą i praktyczną. Oba panele markerów okazały się bardzo skuteczne w wykrywaniu zróżnicowania genetycznego u marchwi i mogą być wykorzystywane z powodzeniem w charakterystyce zasobów genowych i materiałów hodowlanych.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągniętych zostało przez panią Katarzynę Stochmal pięć wniosków, przedstawionych na stronie 26. rozprawy. Wnioski są te w moim odczuciu uprawnione, sformułowane zostały precyzyjnie i starannie. Pewne zastrzeżenia budzi we mnie nieco zbyt skrótowy sposób ujęcia części wniosku pierwszego. Sformułowanie „detekcja (...) oparta na poszukiwaniu homologii pomiędzy sekwencją transpozonu a surowymi odczytami” powinno być według mnie bardziej doprecyzowane (o jakie surowe odczyty chodzi?), tak aby możliwe było zrozumienie wniosku bez lektury opisu doświadczeń, na podstawie których został on wysnuty.

3. Podsumowanie

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa jest oryginalnym rozwiązaniem problemu, ma bardzo dużą wartość poznawczą i potencjał aplikacyjny. Uważam, że przedstawiona praca doktorska pani mgr inż. Katarzyny Stochmal spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami, i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Hanna Bolibok-Brągoszewska, prof. SGGW