

Warszawa, dn. 19.02.2025

prof. dr hab. Justyna Nowakowska  
Instytut Nauk Biologicznych  
Wydział Biologii i Nauk o Środowisku  
Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki  
ul. Wóycickiego 1/3  
01-938 Warszawa

Ocena pracy doktorskiej **Pani mgr Joanny Sikory**, wykonanej pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Konrada Celińskiego, na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,

pt. „**Zastosowanie metody przeczesywania genomu do charakterystyki różnorodności genetycznej blisko spokrewnionych taksonów z kompleksu *Pinus mugo***”

zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 r.  
Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz.1571)

Rozprawa doktorska Pani mgr **Joanny Sikory** dotyczy szczegółowej analizy porównawczej genomów cpDNA, mtDNA i nrDNA u wybranych taksonów z europejskiego kompleksu górskich sosen *Pinus mugo* (*P. mugo* sensu stricto, *P. uncinata* Ramond i *P. uliginosa* Neumann) i genomów blisko spokrewnionych taksonów czyli *Pinus sylvestris* i *Pinus × rhaetica*, w oparciu o analizy wysokoprzepustowego sekwencjonowania nowej generacji (NGS) oraz analizy bioinformatyczne, w tym głównie metodę przeczesywania genomu (ang. genome skimming). Przedstawione badania wpisują się w kontekst szeroko pojętych analiz filogeograficznych i konserwatorskich, bazujących na identyfikacji polimorfizmu między spokrewnionymi taksonami rodziny *Pinaceae*, które mogą tworzyć mieszańce międzygatunkowe.

### **Formalna ocena pracy**

Przedstawiona rozprawa liczy 130 stron i obejmuje wykaz 3 prac naukowych wchodzących w skład cyklu, oraz 3 pozostałych prac, wraz z przypisanymi im danymi biometrycznymi, w tym: pięcioletni Impact Factor (IF<sub>5</sub>) czasopisma i sumaryczną punktacją MNiSW/MEiN. We wstępie rozprawy zawarto krótkie wprowadzenie do przedstawionych prac naukowych, cel pracy wraz z przedstawieniem 9-ciu szczegółowych celów badawczych, materiał i metody, komentarze do 3 głównych publikacji wchodzących w skład cyklu wraz z oryginalnymi maszynopisami tychże, oraz syntetyczne podsumowanie. Całość wieńczy

bibliografia, złożona z tematycznych 84 prac naukowych, oraz oświadczenia autorów i współautorów prezentowanych 3 prac wchodzących w skład cyklu.

### **Merytoryczna ocena pracy**

Rodzina *Pinaceae* jest największą rodziną istniejących nagonasiennych i obejmuje wiele gatunków o znaczeniu ekologicznym, ekonomicznym i medycznym. Przedstawiony problem naukowy dotyczy głównych wyzwań taksonomicznych i filogenetycznych w obrębie kompleksu *Pinus mugo*, grupy blisko spokrewnionych sosen górskich występujących w europejskich pasmach górskich. Ogólnie, rodzina *Pinaceae* zawiera wiele chronionych lub zagrożonych gatunków, co sprawia, że dokładna identyfikacja każdego z gatunków jest kluczowa w ochronie trwałości i różnorodności ekosystemów leśnych. Pomimo szeroko prowadzonych badań, relacje między różnymi taksonami w kompleksie *Pinus mugo* nadal pozostają niejasne, głównie z powodu wysokiego poziomu podobieństwa genetycznego między gatunkami. W tym kontekście, przedstawiona rozprawa dostarcza nowych danych, które mogą pomóc w dalszych badaniach identyfikacyjnych na podstawie wybranych markerów zmienności DNA.

Na początku dysertacji, znajdujemy szczegółowy opis współczesnego podejścia do analiz genomu wybranych gatunków roślin w celu przeprowadzenia oceny różnorodności genetycznej, opartej na wysokoprzepustowej analizie genomów NGS i suplementowanej nowatorską metodą przeczesywania „genome skimming”. W pracy nie podano odrębnie sformułowanych hipotez badawczych, ale wyodrębniono 9 celów, które można zgrupować wokół następujących tez badawczych:

- ✓ Różnorodność genetyczna blisko spokrewnionych gatunków, powstałych w wyniku niedawnej dywergencji od wspólnego przodka i należących do taksonów z kompleksu *P. mugo* - umożliwiała wykrycie różnic międzygatunkowych. By zweryfikować tę tezę, podjęto cele badawcze nr 1-3 dla genomu cpDNA, cel 4 dla genomu rDNA, cel 5 - dla trzech badanych genomów łącznie.
- ✓ Dzięki zastosowanej metodyce, możliwe jest opracowanie specyficznych markerów w obrębie każdego z badanych taksonów, będących dobrym narzędziem do dalszych analiz filogenetycznych, niezbędnych w genetyce populacyjnej i konserwatorskiej (cele 6-7 oraz 9).
- ✓ Rodzima sosna błotna (*P. uliginosa*) jest odrębnym gatunkiem, genetycznie spokrewnionym z *P. mugo*, *P. rotundata* i *Pinus x rhaetica* (cel 8).

Rozdział **Materiał i metody** zawiera podstawowe informacje na temat nazw gatunkowych i geograficznej lokalizacji badanych taksonów tj. *Pinus uliginosa*, *P. rotundata*, *Pinus x rhaetica*, *P. mugo*, *P. uncinata* i *P. sylvestris* z Polski, Niemiec i Czech. Dalej, znajdujemy skrótowy opis metod badawczych, ponieważ szczegóły metodyczne zamieszczono w każdym z artykułów, wchodzących w skład cyklu. Warto zaznaczyć, że poddany analizom materiał roślinny (igły) pochodziły głównie rezerwatów przyrody i parków narodowych, co w większej mierze gwarantuje autochtoniczność badanego materiału źródłowego (w rozumieniu lokalnych genotypów). Zastosowane metody badawcze nie budzą zastrzeżeń, zarówno co do izolacji genomowego DNA, jak i jego obróbki w celu tworzenia bibliotek genomowych, sekwencjonowania nowej generacji (NGS), czy też samej metody przeczesywania genomu za pomocą dedykowanych programów bioinformatycznych (np. Geneious Prime 2020.2.5) w celu odczytania końcowych sekwencji poszczególnych genomów cpDNA, mtDNA i nrDNA (nuclear ribosomal DNA) badanych taksonów.

**Wyniki badań własnych i współautorskich** przedstawiono w rozdziale 4. Komentarze do publikacji, dla dwu- lub trój-autorskich **3 prac badawczych**, opublikowanych w latach 2021-2024, w których Doktorantka jest pierwszą autorką i których łączna punktacja wynosi 280 pkts wg listy MNiSW/MEiN, oraz sumaryczny  $IF_5 = 10,164$ .

- 1) **W pierwszym artykule**, pt. New insight into taxonomy of European mountain pines, *Pinus mugo* complex, based on complete chloroplast genomes sequencing (Plants 10, 1331 z 2021 r.;  $IF_5 = 2,632$ , MNiSW 70 pkts), Dyplomantka przeprowadziła szczegółową analizę genomu chloroplastowego, realizując założone na początku badań cele badawcze nr 1, 2 i 3. Opisany w tej pracy problem naukowy dotyczył relacji filogenetycznych w obrębie kompleksu *Pinus mugo*, grupującej blisko spokrewnione sosny górskie z Alp, Karpat i Pirenejów. Na podstawie przeprowadzonej analizy filogenetycznej dla sekwencji otrzymanych z wysokoprzepustowego sekwencjonowania NGS, ujawniono *de novo* kompletne sekwencje genomów chloroplastowych trzech kluczowych taksonów kompleksu *Pinus mugo* sp. *mugo*, mianowicie *Pinus mugo* sp. *mugo* (MZ333466), *P. mugo* subsp. *rotundata* (MZ333465) i *P. mugo* subsp. *uncinata* (MZ333464), odkrywając przy tym - 5 kluczowych regionów wysoce zmiennych (tzw. hot spotów), które mogą być przydatne w dalszej identyfikacji genetycznej badanych taksonów. Co ciekawe, przeprowadzona analiza filogenetyczna, która obejmowała szesnaście kompletnych genomów cpDNA z różnych gatunków drzew iglastych, wykazała że kompleks *Pinus mugo* tworzy odrębną grupę monofiletyczną. W badaniu tym podkreślono znaczenie stosowania metod sekwencjonowania o wysokiej przepustowości w celu wyjaśnienia złożonych powiązań filogenetycznych i zwrócono uwagę na potrzebę prowadzenia ciągłych badań mających na celu ochronę i

zachowanie tych ważnych gatunków sosny górskiej. W tym ujęciu, praca zawiera kluczowe wyniki dla ochrony zasobów genowych, zwłaszcza dla zagrożonego wyginieciem taksonu sosny błotnej (*P. uliginosa*).

- 2) **Drugi artykuł** pt. Assessment of ITS2 region relevance for taxa discrimination and phylogenetic inference among *Pinaceae*, z 2022 r., również został opublikowany w czasopiśmie *Plants*. W manuskrypcie, poddano krytycznej ocenie zastosowanie jądrowego rybosomalnego odcinka DNA (ITS2) w kontekście przeprowadzania taksonomicznej dyskryminacji oraz badań filogenetycznych w rodzinie *Pinaceae*. W przedstawionym badaniu, przeanalizowano 368 sekwencji ITS2 z 71 taksonów w siedmiu rodzajach i trzech podrodzinach sosnowatych. Oceniono zmienność genetyczną, rozbieżność i „zdolność” ITS2 do rozróżniania taksonów na różnych poziomach taksonomicznych (kompleksu gatunków, rodzaju, podrodziny i rodziny). Wyniki wskazują, że chociaż ITS2 może zapewnić pewien poziom dyskryminacji taksonomicznej, jego ogólna przydatność do identyfikacji gatunków u *Pinaceae*, zwłaszcza dla taksonu *Pinus mugo*, jest ograniczona (dla którego zaobserwowano zerową wartość wskaźników dywergencji z innymi taksonami). Otrzymany wynik wskazuje na konieczność opracowania bardziej precyzyjnych markerów DNA, niż ITS1 i ITS2, w celu przeprowadzenia wiarygodnej identyfikacji i analizy filogenetycznej u sosnowatych, wymaganej np. w genetyce konserwatorskiej, zmierzającej ku skutecznej ochronie zasobów genowych gatunków sosen, w tym również tych, zagrożonych wyginieciem.
- 3) **Trzeci artykuł**, opublikowany w 2024 r., w *International Journal of Molecular Sciences* (*Int. J. Mol. Sci.* 25(18), IF<sub>5</sub> = 4,9; MNiSW 140 pkt), pod tytułem “Exploring taxonomic and genetic relationships in the *Pinus mugo* complex using genome skimming data”, miał na celu poszerzenie dotychczasowych wyników badań o dodatkowe zestawy danych sekwencyjnych przydatnych do identyfikacji taksonomicznej, w oparciu o nowoczesną metodę przeczesywania genomów cpDNA, mtDNA i nrDNA. Otrzymane wyniki dostarczyły cennych spostrzeżeń na temat klasyfikacji, ochrony i zarządzania kompleksem *Pinus mugo* dla polskich, czeskich i niemieckich populacji. Przeprowadzone analizy danych, oparte na tzw. hot-spotach dywergencji, znacząco poprawiły rozdzielczość filogenetyczną kompleksu *Pinus mugo*, a dodatkowo wyodrębniły *Pinus × rhaetica* z kompleksu *Pinus mugo*, sugerując, że prawdopodobnie jest hybrydą *Pinus sylvestris* i *Pinus mugo*.  
Ujawniony wzór zmienności genetycznej w oparciu o genom mitochondrialny, wyraźnie wskazał na unikalny, lokalny charakter analizowanych populacji z kompleksu *Pinus mugo*, co prawdopodobnie jest wynikiem oddziaływania długiej izolacji przestrzennej na

pulę genową tego taksonu, a biorąc pod uwagę strukturę filogeograficzną *P. mugo* lub *P. uncinata* jako domniemanych taksonów macierzystych *P. rotundata* i *P. uliginosa*, można przypuszczać, że populacje czeskie i niemieckie *P. rotundata* były prawdopodobnie kształtowane przez podobne czynniki presji środowiskowej. W ten sposób, wyniki opublikowane w pracy nr 3, zawierają szereg odpowiedzi na postawione cele badawcze nr 4 – 9.

**Pod względem merytorycznym** pracę oceniam wysoko, gdyż zastosowano w niej prawidłowy warsztat naukowy w celu osiągnięcia założonych 9-ciu celów badawczych. Podjęte badania wpisują się we współczesną problematykę identyfikacji poszczególnych gatunków kompleksu *P. mugo* Turra *sensu lato*, historycznie opisywanych jako samodzielne gatunki, lub w różnej randze włączane do *P. mugo*, *P. rotundata* lub do *P. uncinata* – posiadających odmienne cechy morfologiczne, przy jednoczesnym małym zróżnicowaniu genetycznym, co jest charakterystyczne dla form pośrednich (mieszkańcowych) powstałych w wyniku krótkiego czasu dywergencji gatunków. Dodatkowo, proces krzyżowania się trzech wspomnianych taksonów z *P. sylvestris* (L.) w geograficznych strefach ich ko-habitacji – znacznie utrudnia przeprowadzenie feno- i genotypowej delimitacji każdego gatunku. Na to wszystko nakłada się zjawisko endemiczności niektórych taksonów, będące wynikiem ich różnego potencjału adaptacyjnego do lokalnych warunków środowiska i klimatu. Narastająca potrzeba objęcia ochroną ścisłą gatunków zagrożonych wyginięciem (jak w przypadku sosny błotnej w Polsce), czyni podjęte badania analiz genomowych bardzo przydatnymi w praktyce leśnej, z punktu widzenia ochrony zasobów genowych blisko spokrewnionych gatunków w obrębie taksonów z kompleksu *Pinus mugo sensu lato*. Na podstawie przedstawionych wyników badań własnych, Doktorantka w sposób prawidłowy wyciągnęła szereg wniosków, które zawierają cenne spostrzeżenia na temat klasyfikacji, ochrony i zarządzania kompleksem *Pinus mugo*.

Zaprezentowane metody analiz relacji filogenetycznych u blisko spokrewnionych taksonów kompleksu *Pinus mugo*, dodatkowo wzmocnione danymi o nowych regionach wysoce zmiennych (uzyskanych dzięki metodzie przeczesywania genomu), znacznie ułatwiło pozyskanie nowych danych o polimorficznych sekwencjach mitochondrialnego, chloroplastowego i jądrowego DNA, które byłyby trudne do pozyskania metodą tradycyjnego sekwencjonowania. Istnieje jednak kilka aspektów, których można byłoby uwzględnić w przyszłych badaniach, pogłębiając w ten sposób zdobytą już wiedzę, jak np.:

- szersze próbkowanie osobników, ponieważ obecne badania koncentrują się na trzech głównych przedstawicielach kompleksu *Pinus mugo*. Włączenie większej liczby taksonów lub

populacji z różnych regionów geograficznych mogłoby zapewnić pełniejsze zrozumienie różnorodności genetycznej i historii ich ewolucji,

- przeprowadzenie analiz w obrębie genomiki funkcjonalnej, w tym zbadanie funkcjonalnych implikacji dla zidentyfikowanych wysoce zmiennych regionów i loci mikrosatelitarnych, mogłoby dostarczyć wglądu w adaptacyjne znaczenie zmienności genetycznej,

- badanie korelacji między poziomem zmienności genetycznej, a czynnikami środowiskowymi pozwoliłoby zrozumieć, w jaki sposób różne taksony dostosowują się do danych siedlisk, zwłaszcza w kontekście przepływu genów między *Pinus × rhaetica* a innymi taksonami, i mogłoby wyjaśnić dynamikę ewolucyjną w obrębie kompleksu,

- przedstawione badania sugerują podjęcie długoterminowych analiz w celu monitorowania zmian genetycznych w czasie i różnej lokalizacji geograficznej, co mogłoby dostarczyć cennych informacji na temat procesów ewolucyjnych i statusu ochrony badanych taksonów.

W związku z tym, chciałabym zaadresować parę pytań do Doktorantki, z prośbą o ich szersze rozwinięcie, niż to zawarto w podanych pracach, a mianowicie:

- 1) W jaki sposób uwzględnienie dodatkowych taksonów lub populacji mogłoby poprawić rozdzielczość filogenetyczną w obrębie kompleksu *Pinus mugo*?
- 2) Czy wysoce zmienne regiony (hotspots), zidentyfikowane w genomach chloroplastowego DNA, mają pewne implikacje funkcjonalne w adaptacji taksonów do zewnętrznych czynników środowiskowych?
- 3) W jaki sposób procesy ewolucyjne, tj. losowy system kojarzenia, swobodny przepływ genów lub dryf genetyczny, które obok mutacji i rekombinacji w loci DNA – mogły wpłynąć na poziom i charakter zmienności genetycznej populacji z których pobierano próbki do badań?
- 4) W jaki sposób uzyskane wyniki nt. dynamiki ewolucyjnej między taksonami mieszańcowymi, a ich gatunkami rodzicielskimi w obrębie kompleksu *Pinus mugo*, mogą być przydatne w praktycznych działaniach na rzecz ochrony badanych taksonów?

**W podsumowaniu oceny merytorycznej,** Doktorantka była współ-pomysłodawczynią podjętych badań, wykazała się samodzielnością podczas redakcji manuskryptów wchodzących w skład cyklu, oraz samodzielnie przeprowadziła większość badań, dokonała analiz bioinformatycznych i statystycznych (np. analizy największej wiarygodności ML,

permutacje MCMC w analizie bayesowskiej BI), przeprowadziła wielowątkowe dyskusje, poparte wynikami prac autorów - krajowych i zagranicznych, oraz sformułowała prawidłowe wnioski. Zaprezentowana dysertacja została poparta 84 pozycjami literaturowymi, które w pełni odpowiadają tematyce badań i w większości pochodzą z ostatnich lat, choć w całej dysertacji, znajdziemy więcej powołań na literaturę przedmiotu, zawartą w artykułach naukowych wchodzących w skład cyklu.

W całej dysertacji (w opisach, jak i załączonych pracach naukowych) zabrakło moim zdaniem jasno wyodrębnionych hipotez badawczych, których formułowanie jest kluczowym elementem każdego badania naukowego, w tym również badań przesiewowych genomu. Hipotezy pomagają ukierunkować badania na konkretne pytania i umożliwiają testowanie przewidywań dotyczących relacji między zmiennymi. W kontekście przedstawionych badań, hipotezy mogą dotyczyć na przykład:

- ✓ genetycznych różnic w sekwencjach genów między różnymi populacjami lub gatunkami,
- ✓ określenia funkcjonalnych skutków mutacji w określonych regionach genomu,
- ✓ identyfikacji specyficznych markerów genetycznych związanych z określonymi cechami fenotypowymi lub szeroko pojętej adaptacji do zmiennych warunków środowiska.

#### **Wniosek końcowy:**

Po uważnym przestudiowaniu przedstawionej rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Pani mgr Joanna Sikora przedstawiła bardzo ciekawą i nowatorską koncepcję molekularnej charakterystyki puli genowej wybranych taksonów sosen górskich z kompleksu *Pinus mugo sensu lato*, tj. *P. mugo*, *P. rotundata* i *P. uncinata*. Moja pozytywna opinia dotyczy przede wszystkim zastosowania prawidłowego warsztatu metodycznego, w tym nowoczesnej metody przeczesywania genomu, do osiągnięcia założonych celów badawczych. Rzetelnie przestudiowana literatura przedmiotu, oraz konsekwentnie prowadzone badania własne w oparciu o narzędzia biologii molekularnej (w tym sekwencjonowanie NGS trzech typów genomów cpDNA, mtDNA i nrDNA), jak również analiza danych genomowych w odpowiednich bioinformatycznych programach obliczeniowych, wygenerowały nowy zestaw danych, który znacznie poprawił rozdzielczość filogenetyczną kompleksu *Pinus mugo* w analizie różnicującej taksony u *Pinaceae*. Ważnym wynikiem podjętych badań jest potwierdzenie przesłanki z wcześniejszych prac (nie opartych na analizie NGS) o zasadności zachowania odrębnego nazewnictwa dla *Pinus × rhaetica*, *Pinus uliginosa* i *Pinus rotundata*.

Cała praca została logicznie i poprawnie przedstawiona. Jej wyniki na pewno znajdują praktyczne zastosowanie m.in. w genetyce konserwatorskiej całej rodziny *Pinaceae*. Postawienie na początku dysertacji paru wyodrębnionych hipotez badawczych, pozwoliłoby lepiej oszacować zasadność przyjętych metod badawczych do osiągnięcia zamierzonych celów, jak i zweryfikować interpretację uzyskanych wyników.

W podsumowaniu, poddana recenzji rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dn. 20.07.2018 r. Prawo o Szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz.1571), zatem przedstawiam przed Wysoką Radą Naukową Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wnioski o dopuszczenie Pani mgr Joanny Sikory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*prof. dr hab. Justyna Nowakowska*



*Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki UKSW*