

Sebastian Szczepański

Zmienność genetyczna stref hybrydowych i populacji allopatrycznych spokrewnionych gatunków sosen (rodzaj *Pinus*)

Niniejsza praca doktorska składa się z czterech artykułów opisujących badania genetyczne allopatrycznych oraz mieszańcowych populacji sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.), kosodrzewiny (*Pinus mugo* T.) oraz sosny błotnej (*Pinus uliginosa* N.). Głównym obiektem badań były trzy strefy kontaktu sosny zwyczajnej i kosodrzewiny, na których niekiedy formy hybrydowe przyjmują fenotyp przypominający sosnę błotną – były to dwie populacje zlokalizowane w Sudetach Środkowych: Błędne Skały w Górach Stołowych oraz Torfowisko pod Zieleńcem w Górach Bystrzyckich, a także Bór na Czerwonem w Nowym Targu, położony między Gorcami a Tatrami. Grupę referencyjną obejmował przekrój naturalnych populacji sosny zwyczajnej, zarówno górskich, jak i nizinnych, w zasięgu polskim oraz europejskim. Referencyjne populacje kosodrzewiny obejmowały wszystkie polskie pasma górskie, w których ten gatunek występuje, oraz wybrane stanowiska europejskie. Jako referencje dla sosny błotnej wykorzystano jej *locus classicus* – Wielkie Torfowisko Batorowskie – oraz dwa drzewostany zlokalizowane w okolicy Węglińca. Materiał zbierano w latach 2021–2023.

Pierwszy artykuł opublikowany w *Dendrobiology*, zatytułowany *Development of a SNaPshot assay for the genotyping of organellar SNPs in four closely related pines*, opisuje opracowaną metodę genotypowania panelu 13 dziedziczonych w linii matczynej mitochondrialnych polimorfizmów (SNP) oraz diagnostycznego markera chloroplastowego, dziedziczonego w linii ojcowskiej i pozwalającego określić pochodzenie danego osobnika od sosny zwyczajnej lub sosen z kompleksu *Pinus mugo*. Celem tej pracy było udoskonalenie i uproszczenie dotychczasowych metod genotypowania oraz ich walidacja na 12 populacjach czterech gatunków sosen w tym min. *P. sylvestris*, *P. mugo* i *P. uliginosa*. Metoda wykazała dużą dokładność i skuteczność, pozwalając na określenie genotypów dla 146 ze 147 badanych osobników z europejskiego zasięgu wybranych gatunków. W badanej próbie zidentyfikowano 12 różnych haplotypów mitochondrialnych, a ich najwyższą, uśrednioną różnorodność wykazano dla sosny błotnej i sosny zwyczajnej. Badania te potwierdziły również specyficzność chloroplastowego markera diagnostycznego – wszystkie sosny zwyczajne posiadały wariant „C”, natomiast wszystkie sosny z kompleksu *Pinus mugo* miały wariant „A” w locus *trnL-trnF*.

Drugi artykuł, opublikowany w *BMC Plant Biology*, pod tytułem *Hybridization has localized effect on genetic variation in closely related pine species*, opisuje oszacowanie zmienności genetycznej hybrydowych populacji sosen w odniesieniu do allopatrycznych populacji referencyjnych, na podstawie 13 markerów mitochondrialnych wygenerowanych za pomocą metody SNaPshot oraz 14 jądrowych markerów mikrosatelitarnych (nSSR). W tym celu osobniki zasiedlające strefy kontaktu podzielono na klasy gatunkowe, uwzględniając ich genetyczne pochodzenie (na podstawie genotypów nSSR), morfologię oraz wariant diagnostycznego markera chloroplastowego DNA. Oszacowano zarówno zmienność genomu jądrowego, jak i mitochondrialnego, przyjmując za jej miarę m.in. bogactwo alleliczne (*allelic richness*) i bogactwo haplotypowe (*haplotype richness*), czyli średnią liczbę alleli lub

haplotypów w danej populacji, odniesioną do populacji o najmniejszej liczbie osobników. Przeprowadzono również analizę haplotypów mitochondrialnych dla wielu populacji w zasięgu europejskim, w celu stworzenia bazy i sieci występujących wariantów. Wyniki badań wskazały na brak spodziewanego istotnego zwiększenia zmienności genetycznej w obrębie stref hybrydowych, a nawet wykazały jej zmniejszenie – szczególnie w przypadku genomu mitochondrialnego. Co więcej, w strefach kontaktu nie stwierdzono żadnych nowych wariantów, a populacje wydają się ujednocilać do jednego lub dwóch haplotypów, najczęściej spotykanych w polskim zasięgu występowania badanych gatunków. Okoliczne populacje allopatryczne nie wydają się być w żaden sposób dotknięte procesami zachodzącymi w populacjach hybrydowych, co wskazuje na lokalny efekt hybrydyzacji.

Trzeci rozdział stanowi artykuł w trakcie recenzji w czasopiśmie *Molecular Ecology*, zatytułowany *Repeatable genomic outcomes along the speciation continuum: insights from pine hybrid zones (genus Pinus)*. Badanie to było pierwszą próbą wykorzystania danych genomowych (7390 markerów SNP) do oszacowania zróżnicowania genetycznego, struktury populacyjnej oraz wzorców pochodzenia genetycznego w analizowanych strefach kontaktu. Pomimo że zidentyfikowano jedynie nieliczne osobniki reprezentujące genetycznie czystą kosodrzewinę, pochodzenie od tego gatunku rodzicielskiego było dominujące w każdej populacji sympatrycznej. Co więcej, różnorodność genetyczna — oszacowana na podstawie tysięcy markerów zlokalizowanych w genach funkcjonalnych — była wyższa u mieszańców niż w populacjach allopatrycznych gatunków rodzicielskich.

Czwarty i ostatni rozdział stanowi artykuł *Molecular signatures of introgressive divergence and selection in contact zones of closely related pine species (Pinus genus)* będący w recenzji w *BMC Plant Biology*, dotyczący procesów selekcji i introgresji genomowej zachodzących w strefach hybrydowych. Osobniki zostały podzielone na klasy genetyczne zgodnie z proporcjami ich genetycznego pochodzenia, obliczonymi na podstawie genotypów 7390 jądrowych markerów SNP. Do określenia loci podlegających selekcji, tzw. outlierów, zastosowano trzy powszechnie używane metody: pcadapt, OutFLANK oraz BayeScan. Zbiory markerów wybranych każdą metodą dla kilkunastu układów grup lub populacji porównano ze sobą i wybrano wyłącznie te, które zostały określone jako outliery przez co najmniej dwie z metod. Celem badań było określenie, które geny ulegają selekcji w wybranych klasach gatunkowych w strefach hybrydowych, w odniesieniu do referencyjnych populacji allopatrycznych danego gatunku. Badania wykazały znacznie większą presję selekcyjną obserwowaną w grupach hybrydów sosny zwyczajnej w porównaniu do osobników z przewagą genów kosodrzewiny. Co więcej, wykazano oznaki selekcji działającej również na wiele genów u osobników sosny zwyczajnej występujących w strefach kontaktu, posiadających czyste genetyczne pochodzenie od sosny zwyczajnej, typowy dla niej fenotyp oraz wariant diagnostycznego markera chloroplastowego.

Podsumowując, niniejsza rozprawa doktorska wykazuje, że hybrydyzacja, przepływ genów oraz selekcja odgrywają odmienne, lecz komplementarne role w kształtowaniu zmienności genetycznej w strefach kontaktu badanych gatunków sosen. Podczas gdy markery neutralne wskazują na ujednoclenie pul genowych, loci funkcjonalne ujawniają zwiększoną różnorodność genetyczną oraz zróżnicowanie między osobnikami hybrydowymi i czystymi osobnikami sosny zwyczajnej z populacji sympatrycznych. Przewaga genomu *P. mugo* wśród większości osobników hybrydowych oraz niska presja selekcyjna na takie

mieszance sugeruje występowanie adaptacyjnej introgresji oraz lepsze przystosowanie mieszańców kosodrzewiny. Natomiast czyste osobniki *P. sylvestris* ze stref kontaktu podlegają selekcji związanej z adaptacją do warunków środowiskowych, trudnych dla typowych przedstawicieli tego gatunku. Wyniki zaprezentowane w czterech publikacjach naukowych, będących rozdziałami tej rozprawy przyczynią się do pogłębienia wiedzy na temat hybrydyzacji jako mechanizmu adaptacji oraz czynnika napędzającego specjację. Nowa wiedza o genomice stref hybrydowych drzew ma znaczenie nie tylko dla biologii ewolucyjnej, lecz również niesie ze sobą istotne implikacje praktyczne dla ochrony przyrody, zarządzania zasobami genetycznymi oraz zachowania bioróżnorodności w ekosystemach leśnych poddawanych rosnącej presji środowiskowej.