

**Recenzja rozprawy doktorskiej
pana mgr. Sebastiana Szczepańskiego
pt. "Zmienność genetyczna stref hybrydowych i populacji alloptrycznych spokrewnionych
gatunków sosen (rodzaj *Pinus*)"**

Recenzję niniejszej pracy wykonano na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza z dnia 7 lipca 2025 roku, zgodnie z wymogami określonymi w art. 190 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571).

1. Formalny opis rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska, wykonana pod kierunkiem naukowym prof. dr. hab. Witolda Wachowiaka (promotora) oraz dr. Bartosza Łabiszaka (promotora pomocniczego) na Wydziale Biologii w Zakładzie Ekologii Roślin i Ochrony Środowiska, podejmuje niezwykle aktualny i istotny w biologii ewolucyjnej problem hybrydyzacji, specjacji i adaptacji w strefach kontaktu blisko spokrewnionych gatunków w tym przypadku sosen. Rozprawa jest kompleksowym, wieloaspektowym studium, które łączy nowoczesne metody genetyki populacyjnej i genomiki z dogłębną analizą ekologiczną.

Rozprawa doktorska mgr. Sebastiana Szczepańskiego została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu czterech publikacji naukowych. Dwie z nich ukazały się drukiem w latach 2023-2024 na łamach czasopism o zasięgu międzynarodowym: *Dendrobiology* oraz *BMC Plant Biology*. Dwa kolejne manuskrypty zostały złożone do oceny wydawniczej w redakcjach *Molecular Ecology* oraz *BMC Plant Biology*. Dorobek publikacyjny Doktoranta, wchodzący w skład rozprawy, charakteryzuje się łączną punktacją MEiN wynoszącą 240 punktów oraz sumarycznym wskaźnikiem Impact Factor (IF) na poziomie ok. 6,2.

Należy podkreślić znaczący wkład Doktoranta w powstanie wszystkich prac, które mają charakter współautorski. W obu opublikowanych artykułach oraz w jednym z procedowanych manuskryptów mgr Sebastian Szczepański pełni kluczową rolę pierwszego korespondencyjnego autora. W drugiej z prac złożonych do druku (*Molecular Ecology*) jest drugim autorem. Przedłożone oświadczenia współautorów potwierdzają, że wkład Doktoranta obejmował wszystkie etapy procesu badawczego: od planowania i gromadzenia materiału, poprzez realizację eksperymentów i analiz statystycznych, po interpretację wyników i finalne przygotowanie publikacji.

Dane nauko-metryczne z bazy Web of Science Core Collection (indeks Hirscha = 2, liczba cytowań = 14 przy pięciu zarejestrowanych publikacjach) nie są wprawdzie bezpośrednim przedmiotem niniejszej oceny, jednak w mojej opinii stanowią one obiecującą prognozę dla dalszej kariery naukowej Doktoranta.

Strukturę rozprawy dopełnia liczące 22 strony streszczenie, zawierające: streszczenie w języku polskim i angielskim, wyczerpujące wprowadzenie teoretyczne, w którym precyzyjnie sformułowano cele i hipotezy badawcze. Całość zamyka obszerny spis cytowanej literatury.

Po przeanalizowaniu załączonej dokumentacji uważam, że rozprawa doktorska Pana mgr. Sebastian Szczepańskiego spełnia wymogi formalne.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska, zrealizowana w formie cyklu powiązanych tematycznie artykułów, stanowi spójne i kompletne studium naukowe. Praca w logiczny sposób prowadzi od opracowania nowej metodyki, przez analizę zmienności genetycznej na poziomie markerów neutralnych, aż po zaawansowane badania genomowe poświęcone zjawiskom introgresji i selekcji. W toku badań Doktorant udowodnił nie tylko biegłe posługiwanie się zaawansowanymi technikami laboratoryjnymi, ale także zdolność do krytycznej interpretacji danych i umiejscowienia wyników w szerokim kontekście współczesnej teorii ewolucji.

Fundament empiryczny rozprawy stanowi imponujący materiał badawczy, obejmujący ponad 90 populacji (ok. 2500 osobników). Zastosowanie zintegrowanego podejścia, łączącego analizę markerów genetycznych – matczyńskie dziedziczonego mtDNA, ojcowsko dziedziczonego cpDNA, markerów mikrosatelitarnych SSR oraz tysięcy markerów SNP – pozwoliło na przeprowadzenie wieloaspektowej i wnikliwej analizy procesów ewolucyjnych.

Głównym celem podjętych badań było zidentyfikowanie ewolucyjnych konsekwencji hybrydyzacji u sosny zwyczajnej i taksonów wyróżnionych w kompleksie *Pinus mugo*. Cele szczegółowe dotyczyły: a) oceny zakresu i wzorców genetycznych hybrydyzacji między *P. sylvestris*, *P. mugo* i *P. uliginosa* b) poszukiwania sygnatur międzygatunkowego przepływu genów w loci neutralnych i potencjalnie adaptacyjnych; 3) weryfikacja ewolucyjnego pochodzenia i statusu taksonomicznego *P. uliginosa*; 4) zbadanie wpływu różnych środowisk i składu gatunkowego na ewolucyjne skutki hybrydyzacji; 5) identyfikacja regionów genomowych podlegających selekcji i zbadanie roli introgresji adaptacyjnej. Cele te Doktorant zrealizował poprzez weryfikację sześciu hipotez badawczych, które zostały precyzyjnie sformułowane i dobrze nawiązują do postawionych celów.

Pierwszy artykuł rozprawy doktorskiej mgr. Szczepańskiego opisuje opracowanie i walidację multipleksowego testu SNaPshot do genotypowania markerów mitochondrialnego DNA (mtDNA) u badanych gatunków sosen. Zastosowanie tego wydajnego, dokładnego i tańszego testu, w miejsce czasochłonnych i droższych metod (PCR-RFLP) stworzyło fundament pod realizację kolejnych, ambitnych etapów pracy. To nowatorskie podejście metodyczne zasługuje na uznanie.

Rozprawa **charakteryzuje się logicznym ciągiem badawczym**, w którym każdy kolejny rozdział (publikacja) stanowi naturalne rozwinięcie i pogłębienie poprzedniego. W drugiej części pracy (Szczepański i in. 2024, BMC Plant Biology) przedstawiono wyniki analizy wzorców neutralnej zmienności genetycznej w strefach hybrydowych oraz w populacjach referencyjnych. Analizy, oparte na wcześniej opisanych markerach SNaPshot oraz 14 jądrowych loci SSR, przyniosły **kluczowe, a zarazem zaskakujące, wnioski**. Wbrew oczekiwaniom, w strefach hybrydowych nie zaobserwowano **wzrostu zmienności genetycznej, a wręcz przeciwnie – jej spadek**, co było szczególnie widoczne

w przypadku genomu mitochondrialnego. Co więcej, w strefach kontaktu nie stwierdzono żadnych nowych wariantów genetycznych, a populacje **cechowały się ujednoczonym składem haplotypów**, ograniczonym do wariantów najczęściej spotykanych w polskim zasięgu występowania badanych gatunków.

Trzecia publikacja rozszerza zakres badań o analizę danych genomicznych (7390 markerów SNP), **co pozwoliło na dogłębne zbadanie zmienności genetycznej w strefach hybrydowych**. Autorzy wykazali, że na wszystkich badanych stanowiskach zachodzi intensywna hybrydyzacja, z dominacją mieszańców późniejszych pokoleń i wyraźnym niedoborem czystych genetycznie osobników *P. mugo*. **Kluczowym odkryciem jest uderzająco spójny skład genomowy populacji hybrydowych, niezależny od warunków środowiskowych, z asymetryczną introgresją silnie przechyloną w kierunku *P. mugo***. Sugeruje to istnienie przewidywalnych wzorców ewolucyjnych w strefach kontaktu. Jednocześnie stwierdzono specyficzne dla poszczególnych stanowisk różnice w zróżnicowaniu i fenotypie mieszańców, co podkreśla rolę lokalnej selekcji. Ponadto, praca dostarczyła **solidnych dowodów genomowych podważających status taksonomiczny *P. uliginosa*, wskazując, że jest to stabilizująca się linia o pochodzeniu mieszańcowym**. Ma to fundamentalne znaczenie dla taksonomii rodzaju *Pinus* oraz strategii ochrony.

W czwartym rozdziale, będącym artykułem „Molecular signatures...” (w recenzji w *BMC Plant Biology*), autorzy zgłębiają molekularne mechanizmy selekcji i introgresji w strefach kontaktu sosen. Punktem wyjścia było sklasyfikowanie osobników na podstawie ich genomowego pochodzenia, określonego przy użyciu 7390 markerów SNP. Następnie, w celu precyzyjnego wykrycia genów pod presją selekcji, zastosowano rygorystyczną procedurę, łącząc wyniki trzech metod (pcadapt, OutFLANK, BayeScan) i wybierając tylko najbardziej wiarygodnych kandydatów. Analiza ta doprowadziła do dwóch kluczowych wniosków. Po pierwsze, **presja selekcyjna jest asymetryczna** – znacznie silniej oddziałuje na mieszańce o przewadze genów sosny zwyczajnej niż na te z dominacją genów kosodrzewiny. Po drugie, co równie ważne, **nawet czyste genetycznie sosny zwyczajne żyjące w strefach kontaktu wykazują oznaki selekcji**, co świadczy o ich adaptacji do nietypowych dla gatunku warunków.

Rozprawa doktorska mgr Sebastian Szczepańskiego dostarcza cennych i nowych dla nauki wyników które wnoszą znaczący wkład w zrozumienie procesów ewolucyjnych w strefach hybrydowych sosny zwyczajnej i taksonów wyróżnionych w kompleksie *Pinus mugo*.

Za najciekawsze i najbardziej cenne wyniki badań uważam:

- **rewizję statusu taksonomicznego *Pinus uliginosa***, praca dostarcza solidnych dowodów genomowych, podważających status *P. uliginosa* jako odrębnego gatunku rodzicielskiego.
- wykazanie, że hybrydyzacja w różnych, niezależnych strefach kontaktu prowadzi do powtarzalnych wyników genomowych, z konsekwentną **asymetryczną introgresją w kierunku *P. mugo***.

Podstawą uzyskania powyższych wyników było wykazanie się przez Doktoranta biegłością w posługiwaniu się nowoczesnymi i zaawansowanymi technikami badawczymi. W pracy wykorzystano szerokie spektrum markerów genetycznych (mtDNA, jądrowe i chloroplastowe DNA), których dobór był starannie przemyślany i dostosowany do postawionych celów. **Godne podkreślenia jest**

samodzielne opracowanie nowego multipleksowego testu SNaPshot do genotypowania markerów mitochondrialnego DNA (mtDNA) u badanych gatunków sosen. Szeroki wachlarz metod statystycznych dowodzi, że Doktorant w pełni opanował warsztat niezbędny do prowadzenia badań w swojej dziedzinie. Różnorodność nowoczesnych technik i rzetelność analiz przełożyły się na wysoką jakość wyników uzyskanych przez mgr. Szczepańskiego. Wyniki te zostały starannie udokumentowane i zilustrowane licznymi, czytelnymi oraz dobrze przemyślanymi tabelami i rycinami, które w wyczerpujący sposób prezentują ustalenia pracy. Mocną stroną recenzowanej rozprawy doktorskiej jest dyskusja wyników badań zamieszczona w artykułach. Autor, mgr Szczepański, wykazał się rzadką umiejętnością syntezy ogromnej liczby danych i osadzenia ich w szerokim kontekście literaturowym. Wnioski są wnikliwe i świadczą o głębokiej wiedzy oraz krytycznym podejściu do istniejących poglądów naukowych.

Po analizie tej części rozprawy stwierdzam, że uzyskane przez doktoranta wyniki są oryginalne, interesujące i stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne.

3. Pytania i uwagi

Recenzja dysertacji przygotowanej w formie cyklu powiązanych tematycznie opublikowanych artykułów naukowych jest zadaniem ułatwionym, ponieważ zasadnicze rozdziały pracy (artykuły naukowe) były wcześniej recenzowane w trakcie procesu redakcyjnego przez ekspertów z dziedziny jakiej dotyczą badania, tak więc nie ma potrzeby ich szczegółowego analizowania pod kątem poprawności wykonanych badań i sposobu ich prezentacji. Niemniej jednak, lektura zarówno streszczenia jaki i publikacji skłoniła mnie do zadania kilku pytań;

1. Jednym z ciekawszych ustaleń pracy jest niemal **całkowity zanik czystych genetycznie osobników *P. mugo* w strefach kontaktu**. Ten nieoczywisty wynik, w połączeniu z dominacją genomu *P. mugo* u mieszańców, skłania do pogłębionej dyskusji nad dynamiką ewolucyjną tych stref. Nasuwa to fundamentalne pytania: czy mamy do czynienia z wypieraniem taksonu rodzicielskiego przez lepiej adaptowane potomstwo hybrydowe, czy może strefy te działają na zasadzie pułapki genetycznej? Cennym uzupełnieniem dyskusji byłoby odniesienie się przez Doktoranta do tej kwestii.
2. Moje drugie pytanie odnosi się do "**rozdzielenia niepełnego sortowania linii (ILS) od dawnej introgresji**". Autorzy w swojej drugiej pracy piszą, że wspólne haplotypy mitochondrialne (mtDNA) występują u różnych gatunków sosen, a ich rozmieszczenie geograficzne często nie pokrywa się z granicami gatunkowymi. Taki wzorzec może być interpretowany na dwa główne sposoby: niepełne sortowanie linii (ILS) i dawną introgresję. Autorzy w dyskusji faworyzują ostatecznie hipotezę **niepełnego sortowania linii (ILS)** z powodu niedawnej specjacji. Jest to uzasadniona interpretacja, jednakże w dyskusji można by szerzej rozważyć scenariusze dawnych, wielokrotnych kontaktów, które mogłyby prowadzić do podobnych wzorców. Kwestia ta jest jednym z największych wyzwań w filogeografii i głębsza polemika z alternatywnymi hipotezami wzmocniłaby ten fragment pracy. Poproszę o rozszerzenie dyskusji w tym zakresie.

3.



4. Chociaż forma rozprawy opartej na zbiorze publikacji nie podlega ścisłym wytycznym, co do zasady nie budzi ona moich zastrzeżeń. Zauważam jednak, że w pracy brakuje klarownie wyodrębnionej listy wniosków końcowych, co ułatwiłoby syntetyczne podsumowanie najważniejszych osiągnięć badawczych Doktoranta. Proszę doktoranta o uzupełnienie tych informacji.

5. Ocena końcowa

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr. Sebastiana Szczepańskiego, zrealizowana pod kierunkiem prof. dr. hab. Witolda Wachowiaka, stanowi cykl czterech powiązanych tematycznie publikacji naukowych. Praca podejmuje niezwykle aktualny i istotny w biologii ewolucyjnej problem hybrydyzacji, specjacji i adaptacji w strefach kontaktu blisko spokrewnionych gatunków sosen.

Waga uzyskanych wyników, dojrzała ich interpretacja, perfekcyjne opanowanie warsztatu badawczego wskazuje na dojrzałość naukową i gotowość do podejmowania nowych wyzwań. Dlatego też, zwracam się do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr. Sebastiana Szczepańskiego i dopuszczenie jej Autora do publicznej obrony.

Rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z wymogami określonymi w art. 190 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571).

Jednocześnie, biorąc pod uwagę pracowitość prowadzonych badań, znaczenie i walor naukowy wnioskuje do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o jej wyróżnienie.

Szczecińska Monika

Olsztyn, dn. 12.09.2025

dr. hab. Monika Szczecińska, prof UWM