



Białystok, 2025.09.16

Dr hab. Ada Wróblewska, prof. UwB
adabot@uwb.edu.pl
tel. 85 738 84 24

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Sebastiana Szczepańskiego

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

(Genetic diversity of the hybrid zones and allopatric populations of closely related pine species (genus *Pinus*)

Formalny aspekt rozprawy

Rozprawa doktorska Pana mgr Sebastiana Szczepańskiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Witolda Wachowiaka oraz promotora pomocniczego dr Bartosza Łabiszaka z Zakładu Ekologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Obejmuje ono poszczególne rozdziały, tj. podziękowania, listę czterech rozdziałów w pracy, źródło finansowania przeprowadzonych badań z funduszy krajowych, streszczenia w języku angielskim i polskim, wstępu w języku angielskim przedstawiającym ogólne założenia pracy, cel badań oraz hipotezy wraz z ich syntetycznym omówieniem i weryfikacją, załączone cztery publikacje naukowe oraz oświadczenia Doktoranta i współautorów. Stanowi ona jednorodne tematycznie opracowanie naukowe w skład, którego wchodzi publikacje naukowe merytorycznie ze sobą powiązane. Dwie z tych anglojęzycznych prac z IF zostały już opublikowane, tj. pierwsza z nich w 2023 w *Dendrobiology*, a druga w 2024 roku w *BMC Plant Biology*. Dwie kolejne publikacje, wg opisu Doktoranta, są obecnie na etapie recenzji w czasopismach z listy JCR, tj. *Molecular Ecology*

oraz *BMC Plant Biology*. W dwóch pierwszych pracach, które zostały już opublikowane oraz ostatniej zdefiniowanej jako czwartej pracy będącej w recenzji Doktorant jest korespondencyjnym i pierwszym autorem, brał udział w istotnych zadaniach związanych z ogólnie rozumianą metodyką, przygotowaniem manuskryptu do wydania. Natomiast wkład jego, w postaci koncepcji tych prac, który mógłby być uznany jako umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, nie został wyszczególniony. W trzeciej pracy, znajdującej się w recenzjach, Doktorant wskazuje swoje zaangażowanie w badania zarówno koncepcyjnie jak i metodycznie, oraz w pisaniu manuskryptu. W tym miejscu chciałabym się na chwilę zatrzymać i zadać pytanie Doktorantowi, jak w przypadku dwóch pierwszych już opublikowanych prac i czwartej w recenzji można byłoby wyjaśnić brak zaznaczonego przy jego nazwisku wkładu jako „koncepcji pracy”?

Podsumowując uważam, że układ rozprawy doktorskiej jest konsekwentnym poszerzaniem i uszczegółowianiem badań z zastosowaniem odpowiednich narzędzi do analiz genomowych, pozwalających na odpowiedzi i dyskusję na postawione hipotezy i pytania. Dlatego uważam, że rozprawa doktorska Pana mgra S. Szczepańskiego spełnia warunki formalne.

Ocena merytoryczna

Jak wspomniałam powyżej, Pan mgr Sebastian Szczepański przedstawił rozprawę doktorską w formie czterech anglojęzycznych publikacji naukowych, punktowanych w Impakt Faktorowych czasopismach. Zostało w nich opisane oraz przedyskutowane zagadnienie dotyczące mechanizmu hybrydyzacji, stref hybrydyzacji głównie między *Pinus sylvestris*, *P. mugo* i *P. uliginosa* oraz skutków tego procesu w kontekście adaptacji hybrydowych, ale i czystych genetycznie osobników z ww. gatunków do warunków środowiska. Układ prac w rozprawie został tak przedstawiony, ukierunkowując na zagadnienia związane z metodologią, postawionymi hipotezami oraz celami badań. Uzupełniają się one nawzajem, a jednocześnie uszczegółowiają opis i interpretację wzorców genetycznej różnorodności w strefach kontaktu względem populacji symatrycznych i allopatrycznych. Podjęty problem badawczy w przypadku drzew, należy do rzadko rozpatrywanych zagadnień w literaturze tematu, dlatego w tym zakresie jest ważny w badaniach historii ewolucyjnej. Sześć hipotez badawczych powstało w oparciu o cele badawcze, których lista znajduje się w rozdziale *General Introduction*. Zostały

one sformułowane w klarowny sposób, jednakże nie ukrywam, że Doktorant w skromny sposób zaprezentował, jaką wiedzę do tej pory dysponujemy, na podstawie której powstały niniejsze hipotezy. Oczywiście część wyjaśnień odnośnie podstaw do sformułowania hipotez można odnaleźć w czterech przedstawionych publikacjach naukowych, głównie w rozdziale „wstęp”. *General Introduction* w rozprawie doktorskiej to syntetyczne streszczenie zagadnień opisywanych w czterech publikacjach wskazujących zrealizowane cele oraz zweryfikowane hipotezy. Doktorant wyszczególnił publikacje, w których kolejne hipotezy były testowane.

Pierwsza publikacja Szczepański S. Łabiszak B. Wachowiak W. (2023) Development of a SNaPshot assay for the genotyping of organellar SNPs in four closely related pines. *Dendrobiology* 90, 76-85, przedstawia wybrane i po raz pierwszy opublikowane 13 markerów SNP generowanych techniką SNaPshot określonych w mtDNA, oraz diagnostyczny marker cpDNA (*trnL-trnF*) w badaniu poziomu polimorfizmu w rodzaju *Pinus*. Doktorant zobrazował w pracy, w jaki sposób wypełnił lukę w analizach genomów organelli, np. mtDNA i cpDNA, których tradycyjnie genotypowanie stanowi wyzwanie ze względu na ich skomplikowany charakter dziedziczenia i konieczność stosowania specyficznych primerów. Wysoka przepustowość i wszechstronność multipleksowego testu genotypowania SNaPshot pokazują, jak jest on nieocenionym narzędziem w zaspokajaniu ciągłego zapotrzebowania na szybsze, dokładniejsze i tańsze metody genotypowania w szerokim zakresie gatunków i obszarów badawczych. Chociaż w głównej mierze jest to praca metodyczna, Doktorant obok metodyki przedstawił wyniki bazujące na analizach wybranych markerów SNP mtDNA i cpDNA dla czterech gatunków sosen. Uwzględnił w badaniach 12 populacji 4 gatunków, 147 osobników co uważam za wystarczające do testowania markerów, tym bardziej, że w kolejnej publikacji w rozprawie doktorskiej liczba prób została znacząco zwiększona. Podkreślił, że uzyskano zarówno wspólne, ale i unikalne haplotypy dla poszczególnych gatunków sosen, oraz odpowiednio wysoki poziom różnorodności genetycznej przy analizie niewielkiej grupy osobników i populacji. Wynikiem tych badań jest również wskazanie, że markery te mogą być z sukcesem stosowane do badania nie tylko podstawowych parametrów w genetyce populacji, ale również mechanizmów powstawania hybryd i wzorców migracji w analizowanych gatunkach sosen. W tym punkcie mogę stwierdzić, że określenie i wytypowanie specyficznych markerów SNP mtDNA techniką SNaPshot do analiz i ich zastosowanie predestynuje do uznania, że problem naukowy zyskał oryginalne rozwiązanie w zakresie przedstawionych badań naukowych.

Potwierdzenie słuszności wyboru tych primerów testowanych na 147 osobnikach z 12 populacji *P. sylvestris*, *P. mugo*, *P. uliginosa* i *P. uncinata* ma uzasadnienie w drugiej pracy Szczepański S. Łabiszak B. Lasek M. Wachowiak W. (2024). Hybridization has localized effect on genetic variation in closely related pine species. BMC Plant Biology 24: 1007. Doktorant postawił sobie za zadanie odpowiedź na pytanie jaka jest rola hybrydyzacji w kształtowaniu się genetycznej różnorodności hybryd w stosunku do czystych linii trzech gatunków z rodzaju *Pinus* oraz testowanie dwóch hipotez przedstawiających (1) ograniczone występowanie stref hybrydowych jak i (2) niski poziom zmienności genetycznej obecnej w strefie hybrydyzacji. Wybór populacji zarówno ze stref kontaktu oraz referencyjnych pozwolił na ujęcie znaczącej części zasięgu geograficznego trzech gatunków sosen, a liczba prób ponad 2000 daje gwarancję, że wyniki powinny być rzetelne, powtarzalne i są wartością dodaną zwiększającą próbę statystyczną w tych analizach. W opisie osobników i populacji ze stref kontaktu nie zauważyłam jednak przypisów, ani wytłumaczenia, na jakiej podstawie były identyfikowane osobniki hybrydowe jeśli chodzi o cechy morfometryczne. Jest oczywiście zaznaczona informacja o ocenie materiału do badań przez prof. Krystynę i prof. Adama Boratyńskich, ale nie wyjaśnia ona do końca procesu oznaczania tych osobników, co uważam za istotne i niewątpliwie mogące wpłynąć na podejście do badań, m.in. wątpliwości przy interpretacji pochodzenia osobników czystych lub hybrydowych. Dlatego prosiłabym Doktoranta o odpowiedź na pytanie „na podstawie jakich cech morfologicznych identyfikowano osobniki hybrydowe w strefach kontaktu” i „czy określone hybrydy za pomocą morfologii były również potwierdzone za pomocą markerów molekularnych?”

W niniejszej pracy Doktorant, dzięki zastosowaniu różnorodnych markerów molekularnych uzyskał dane, które pozwoliły na wieloaspektową analizę wyników. Uważam, że wykorzystanie w pracy więcej niż jednego typu markera molekularnego pozwoliło na szersze spojrzenie na historię ewolucyjną gatunku, m.in. na ocenę nie tylko poziomu genetycznej różnorodności w strefie hybrydowej oraz przyczyn kształtowania się jej na niskim poziomie w przypadku markerów mtDNA, ale i wielkości skali geograficznej stref hybrydyzacji, względnego wieku sympatrycznych populacji. Powyższe zagadnienia, które udało się wyjaśnić Doktorantowi, pozwalają istotnie zrozumieć funkcjonowanie stref hybrydowych w warunkach zmian klimatycznych.

W sprawach technicznych zachęcałabym Doktoranta do bardziej szczegółowego opisu rycin ogólnie we wszystkich pracach ze względu na złożoność wyników badań. Znacznie

ułatwiałoby ich szybką analizę przez czytających, np. (1) w drugiej pracy Fig. 1 mogłaby zawierać informacje o populacjach podzielonych pod względem przynależności do gatunku, wyjaśnić co oznaczają kody populacji, (2) w Fig. 2 brakuje określenia jakie wartości zastosowano w wykresach ramkowych, (3) Fig. 3, FS6 można byłoby ułożyć populacje pod kątem ich położenia geograficznego i opisać ich lokalizację pod diagramem Structure, populacje są wymieszane względem siebie jeśli chodzi o położenie w danym regiony.

Trzecia praca Łabiszak B. Szczepański S. Wachowiak W. Repeatable genomic outcomes along the speciation continuum: insights from pine hybrid zones (genus *Pinus*) będącą w recenzji w *Molecular Ecology*, jest kontynuacją badań nad wyjaśnieniem kierunku przepływu genów między gatunkami rodzicielskimi pozwalającego na powstawanie hybryd, mechanizmów asymetrycznej introgresji oraz roli hybrydyzacji i introgresji w różnicowaniu się gatunków sosny. Doktorant pochylił się również nad interpretacją statusu gatunku *P. uliginosa*. W tej, jak i poprzedniej pracy, na uwagę zasługuje również imponująca liczba prób wykorzystanych do analiz ponad 1300, dodatkowo liczba pozyskanych prób z danej populacji pokrywających się w znacznym stopniu z liczbą bytujących tam osobników. Wykorzystanie ponad 49 tys. jądrowych markerów SNP we wstępnych analizach, a ostatecznie ponad 7300 jądrowych markerów SNP, głównie z regionów funkcjonalnych oraz przedstawionych w pracy Perry i in. (2020), pozwoliło na wskazanie wyższej genetycznej różnorodności wśród grupy hybryd w odniesieniu do czystych gatunków sosen. Asymetryczna introgresja przejawiała się w znaczącej dominacji cpDNA *P. mugo* niż cpDNA *P. sylvestris* w analizach za pomocą sekwencji *trnL-trnF*. Doktorant określił w ten sposób dominujący, ale nie jedyny kierunek powstawiania hybryd, którego przyczynę należy szukać w oddziaływaniu specyficznego siedliska górskiego, ograniczonych zasobów wody, do którego *P. mugo* wykazuje szerszą adaptację, oraz dodatkowo mały rozmiar populacji *P. sylvestris* na tych obszarach. Doktorant sugeruje jeszcze inny argument. Jest nim selekcja mająca swój początek działania już na pierwszych etapach zapłodnienia u *P. sylvestris* i kolejnych etapach rozwoju osobników hybrydowych. Niewątpliwie odpowiedź na to pytanie wymaga dalszych badań, co zostało podkreślone przez mgr S. Szczepańskiego. W nawiązaniu do gradientu admiksji między *P. sylvestris* i *P. mugo* pokazany został diagram UPGMA, jednak bez określenia czy dana haplogrupa wyróżnia się istotnie statystycznie na tle innych. Czy tego typu analizy/testy były wykonane, czy istniały istotne statystycznie różnice między grupami haplotypów i jak te różnice można byłoby zinterpretować? Problem klasyfikacji do danej jednostki taksonomicznej oraz dyskusji na

temat klasyfikacji *P. uliginosa* jako hybrydy *P. mugo* i *P. sylvestris* został w tej pracy również podjęty, bazując na otrzymanych danych genetycznych. Badania z zastosowaniem markerów molekularnych po raz kolejny pokazały, że ranga taksonomiczna może być efektywniej i precyzyjnie zidentyfikowana za ich pomocą, a znajomość filogeografii oraz historii populacji, morfologii może być dodatkowo pomocna w rozwiązaniu tego problemu. Na końcu rodzi się jeszcze pytanie czy wartości cech morfologicznych i określony udział genomu *P. mugo* u osobników czystych i hybryd można ze sobą skorelować. Moje pytanie dotyczy przedstawionych fotografii osobników o udziale od 100% do 0% genomu pochodzenia od *P. mugo*. Mam nadzieję, że pojawienie się tej informacji w publikacji miało na celu zwrócenie uwagi na określone cechy morfologiczne, które należałoby przeanalizować i zestawić z danymi genetycznymi? Czy może Doktorant pracuje nad takimi danymi, czy jest to zasadne i możliwe do zrealizowania?

Ostatnia zamykająca rozprawę doktorską publikacja to Szczepański S. Łabiszak B. Wachowiak W. Molecular signatures of introgressive divergence and selection in contact zones of closely related pine species (*Pinus* genus), będąca w recenzji w *BMC Plant Biology*. Zagadnienia asymetrycznego przyływu genów w strefach hybrydyzacji *P. sylvestris* i *P. mugo* oraz ocena ilości, typów loci podlegających selekcji tworzą tutaj spajający wątek badań nad tymi gatunkami. Jednocześnie uważam, że praca ta należy istotnych pod kątem badań adaptacji u dwóch gatunków sosen. Doktorant po raz kolejny zwiększa liczbę prób i populacji do badań loci podlegających selekcji u dwóch gatunków *Pinus* i ich hybryd. Po raz pierwszy w literaturze, zwraca on uwagę na możliwe loci podlegające selekcji, które występują raczej w powszechnie w grupie hybryd *P. sylvestris* rosnącej w sąsiedztwie *P. mugo*, niż w populacjach referencyjnych *P. sylvestris*. Wskazał tym samym na presję selekcyjną sosny zwyczajnej warunkowanej typem siedliska, która przetrwała w nim albo prawdopodobnie jako „czysty takson” będący pod wpływem selekcji lub określając kierunek introgresji u hybryd. Tym samym potwierdza słuszność dwóch ostatnich hipotez dotyczących obecności puli tych samych loci podlegających selekcji w różnych strefach hybrydyzacji u *P. mugo* oraz unikalnych dla *P. sylvestris*.

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty, chciałabym podkreślić, że Doktorant wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej zarówno w zakresie metod badawczych, opracowania statystycznego danych oraz pisania manuskryptu. Uważam, że Doktorant wniósł znaczny wkład w rozwój dyscypliny poprzez opis historii ewolucyjnej

gatunków sosen oraz mechanizmów, przyczyn oraz wzorców różnorodności genetycznej w ich strefach hybrydyzacji. Prace włączone do rozprawy doktorskiej, treści które zawierają oraz sposób ich napisania są dowodem na to, że Doktorant posiada nie tylko ogólną wiedzę i doświadczenie, ale również umiejętności laboratoryjne, charakteryzuje go spostrzegawczy sposób dedukcji, które pozwoliły na znacznie szersze ujęcie omawianych problemów. Ponadto uważam, że rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego pod względem wyboru i określenia markerów molekularnych oraz ich późniejszego wykorzystania do analiz w rozprawie doktorskiej.

Podsumowanie

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa wnosi istotny wkład do wiedzy w zakresie historii ewolucyjnej stref hybrydyzacji u gatunków drzew w tym gatunków z rodzaju *Pinus*. Niniejsza rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ. U. z 2023 r., poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Sebastiana Szczepańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Ada Wróblewska, prof. UWB