

Kraków, 21 września 2025 r.

Dr hab. Michał Ronikier
Instytut Botaniki im. W. Szafera Polskiej Akademii Nauk
Lubicz 46
31-512 Kraków
E-mail: m.ronikier@botany.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Sebastiana Szczepańskiego

pt. „Genetic diversity of the hybrid zones and allopatric populations of closely related pine species (genus *Pinus*)” [„Zmienność genetyczna stref hybrydowych i populacji allopatrycznych spokrewnionych gatunków sosen (rodzaj *Pinus*)”].

Recenzja została wykonana na podstawie pisma Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z 25 lipca 2025 r. informującego o powierzeniu mi, uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne UAM z dnia 7 lipca 2025 r., roli recenzenta rozprawy doktorskiej Pana mgr. Sebastiana Szczepańskiego.

Mgr Sebastian Szczepański wykonał swoją pracę doktorską w Zakładzie Ekologii Roślin i Ochrony Środowiska Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod opieką prof. dr. hab. Witolda Wachowiaka (jako promotora) i dr. Bartosza Łabiszaka (jako promotora pomocniczego). Na rozprawę składają się cztery oryginalne, anglojęzyczne prace naukowe, które dotyczą badań genetycznych stref styku i hybrydyzacji blisko spokrewnionych gatunków sosen i stanowią tematycznie i metodycznie spójną całość. Nieco odbiega od pozostałych charakterem artykuł, który stanowi pierwszy rozdział pracy, ponieważ ma charakter metodyczny. Opisuje on jednak metodę analizy zmienności DNA wykorzystaną w drugiej pracy więc jest z tą pracą bezpośrednio powiązany. Dwa artykuły (które stanowią pierwsze dwa rozdziały rozprawy) zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, dwa kolejne zostały zamieszczone jako manuskrypty złożone do druku. Pierwsza z opublikowanych prac ukazała się w solidnym, specjalistycznym czasopiśmie *Dendrobiology*, druga w bardzo dobrym, wysokoimpaktowym czasopiśmie typu Open Access *BMC Plant Biology*. Manuskrypt tworzący trzeci rozdział rozprawy jest w recenzji w renomowanym, interdyscyplinarnym czasopiśmie *Molecular Ecology*, natomiast manuskrypt tworzący ostatni rozdział został złożony, podobnie jak druga praca, do *BMC Plant Biology*. Te złożone prace nie ukazały się jeszcze w czasopismach w czasie przygotowania tej recenzji.

W trzech pracach (rozdziały 1, 2 i 4) doktorant jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, co wskazuje na jego wiodącą rolę w realizacji badań i opracowaniu artykułów. W jednej pracy (rozdział 3) doktorant jest drugim (środkowym) autorem, jednak również tutaj był zaangażowany we wszystkie główne etapy realizacji badań i przygotowania pracy. Załączone na końcu rozprawy oświadczenia autorów oraz opisy wkładu autorskiego zawarte w poszczególnych manuskryptach potwierdzają istotny wkład doktoranta na wszystkich etapach planowania metodyki, realizacji badań, opracowania danych i przygotowania artykułów, poza – w większości przypadków – opracowaniem wstępnej koncepcji badań,

która została przygotowana przez promotorów rozprawy, co jest jednak naturalne, zwłaszcza w przypadku prac, które stanowią – jak w tym przypadku – nowy etap w długofalowych badaniach grupy.

Pracę otwierają – wymagane zapisami ustawy – streszczenia w językach angielskim i polskim. Są one bardzo dobrze napisane pod względem językowym oraz pod względem czytelnego przedstawienia i podsumowania podjętego tematu i uzyskanych wyników. Cztery główne rozdziały, obejmujące publikacje lub złożone manuskrypty, poprzedzone zostały także ogólnym wprowadzeniem (rozdział pt. „General Introduction”) z odrębnym zestawem cytowanej literatury. Rozdział ten rozpoczyna się wstępem dotyczącym zjawiska hybrydyzacji i jego znaczenia ewolucyjnego, szczególnie u drzew, oraz gatunków sosny jako biologicznego systemu do badań genetyki stref hybrydyzacji. To wprowadzenie w tematykę pracy jest bardzo krótkie ale rzeczowe i wystarczające (biorąc pod uwagę, że każdy z artykułów obejmuje również wstęp osadzający poszczególne badania w szerszym kontekście). Przy wzmiance o środkowoeuropejskich strefach mieszańcowych, których dotyczy praca (s. 13) zabrakło mi jedynie krótkiego odniesienia do prowadzonych niegdyś przez wiele lat badań nad zmiennością morfologiczną mieszańców *Pinus mugo* i *P. sylvestris* (np. Staszekiewicz i Tyszkiewicz 1969; *Fragm. Flor. Geobot.* 15: 187–212), które stanowiły punkt wyjścia do badań tych zagadnień. Po krótkim zarysowaniu tematyki doktorant przedstawia cele podjętych badań i przekłada je na sześć hipotez badawczych do przetestowania. W pozostałej części rozdziału wprowadzającego (s. 14–19) zostały przedstawione metodyczne i materiałowe podstawy rozprawy oraz cele, wyniki i wnioski poszczególnych artykułów, które składają się na rozprawę, w odniesieniu do sformułowanych hipotez. Z formalnego punktu widzenia nie wydaje się właściwe zawarcie w rozdziale ‘Wprowadzenie’ omówienia wyników i wniosków z całej rozprawy; należałoby raczej tę część przenieść na koniec jako podsumowanie rozprawy lub zmienić tytuł tego rozdziału tak, żeby odzwierciedlał zarówno wprowadzenie do tematu jak i podsumowanie pracy. Należy jednak podkreślić, że jest to tylko uwaga formalna a rozdział w praktyce bardzo dobrze spełnia swoją rolę wprowadzenia i syntetycznego omówienia całości rozprawy i najważniejszych jej rezultatów.

Należy podkreślić, że praca jest napisana bardzo dobrym językiem i niezwykle starannie przygotowana. Z obowiązku wynotowałem tylko drobną niekonsekwencję w formatowaniu jednej pozycji w spisie literatury i kilka drobnych błędów gramatycznych (w tekstach angielskich). Należałoby również skorygować formę fraz autorskich przy podaniu naukowych nazw gatunkowych (np. w streszczeniach), zgodnie z formalną konwencją przyjętą dla nomenklatury botanicznej (por. International Plant Names Index – www.ipni.org): *Pinus mugo* Turra (zamiast *P. mugo* T.) i *Pinus uliginosa* G.E. Neumann (zamiast *P. uliginosa* N.)

Prace zrealizowane w ramach rozprawy wpisują się w długofalowe badania prowadzonych w zespole prof. Witolda Wachowiaka i dotyczących ewolucji i genetyki populacyjnej sosny. Stanowią kolejny etap tych badań i wnoszą do nich szereg nowych, wartościowych wyników. Badania dotyczą struktury genetycznej stref styku generalnie allopatrycznych gatunków: *Pinus sylvestris* i *P. mugo*, a także rzadkiego, enigmatycznego taksonu *P. uliginosa*, różnie traktowanego w literaturze. Badania prowadzone były w trzech dobrze znanych i opisanych strefach kontaktu – dwóch w Sudetach (Błędne Skały w Górach Stołowych i Torfowisko pod Zieleńcem w Górach Bystrzyckich) i jednej w Karpatach (Bór na Czerwonym w Kotlinie Orawsko-Nowotarskiej), w próbkowaniu uwzględniono również obszerny materiał

referencyjny z allopatrycznych populacji *P. sylvestris* i *P. mugo* w Europie, a także z trzech populacji *P. uliginosa* (w tym, co ważne, z *locus classicus* tego taksonu). Próbkowanie osobników (zmapowanych i wstępnie scharakteryzowanych morfologicznie) w badanych strefach styku jest bardzo obszerne i stanowi doskonałą podstawę do szczegółowych badań. Analizy genetyczne zostały oparte o kilka metod (SNaPshot polimorfizmów w DNA organellarnym, analiza jądrowych loci mikrosatelitarnych, analiza obszernych, ogólnogenomowych paneli SNP) i obejmowały zarówno genotypowanie cech neutralnych jak i potencjalnie powiązanych z presją selekcyjną i adaptacją do środowiska.

Rozdział pierwszy rozprawy (artykuł w *Dendrobiology*) przedstawia metodę genotypowania gatunków sosen z wykorzystaniem mutacji punktowych (SNP) w 13 fragmentach DNA mitochondrialnego oraz jednym fragmencie DNA plastydowego, diagnostycznym dla rozróżnienia *P. sylvestris* od kompleksu *P. mugo* (miejsca polimorficzne były znane wcześniej i badane za pomocą metody PCR-RFLP). Ponieważ jest to artykuł metodyczny, brakuje mi nieco w opisie metod informacji o sposobie zaprojektowania starterów do reakcji SNaPshot (Tabela 2 w artykule). Wybór zestawu fragmentów i zaprojektowanie sekwencji oligonukleotydów do detekcji polimorfizmów nukleotydowych (SNP) stanowi przecież podstawę innowacji w zaproponowanej metodzie genotypowania sosen. Dodatkowo, biorąc pod uwagę, że celem pracy było udoskonalenie metodyki genotypowania sosen na podstawie zmienności genomów organellarnych, nasuwa się pytanie, czy nie było warto podjąć próby zidentyfikowania i opracowania większej liczby markerów cpDNA w celu lepszego zbadania zmienności neutralnych markerów z tej frakcji DNA przenoszonej z pyłkiem?

W drugim artykule (w *BMC Plant Biology*) doktorant wraz ze współautorami przebadał – wykorzystując m.in. opracowany w pierwszej pracy zestaw SNaPshot – zmienność genetyczną wybranych neutralnych loci organellarnych (głównie mutacji punktowych w DNA mitochondrialnym) i jądrowych (mikrosatelitarnych). Analizy te pozwoliły na określenie poziomu zmienności genetycznej (różnorodności alleli/haplotypów) w strefie hybrydyzacji w porównaniu do populacji allopatrycznych a także na określenie przestrzennego oddziaływania międzygatunkowej wymiany genów w strefach hybrydyzacji na populacje gatunków czystych. Wykazano i przedyskutowano istotne różnice w poziomie zmienności DNA mitochondrialnego i jądrowego – o ile w mtDNA strefy hybrydyzacji charakteryzowały się niższą zmiennością haplotypową i homogenizacją haplotypów do najczęstszych wariantów, zmienność DNA jądrowego wykazywała, zgodnie z oczekiwaniami, wyższy poziom w populacjach mieszańcowych (zostało to potwierdzone również w kolejnych pracach). Stwierdzono również dla badanych stref hybrydyzacji ich lokalne tylko znaczenie dla przepływu genów. Pomimo wiatropylności badanych gatunków, strefy mieszańcowe nie są źródłem szerszego rozchodzenia się allogenicznych wariantów w regionalnych populacjach tych zasadniczo allopatrycznych gatunków. Potwierdza to obserwacje z wielu innych lokalnych stref styku gatunków o rozdzielnymi zasięgach, które utrzymują się w długiej perspektywie czasowej jednak nie wpływają na populacje poza tymi strefami.

Artykuł obejmuje, poza analizami w badanych strefach mieszańcowych, rozległe próbkowanie referencyjne w europejskich populacjach *Pinus sylvestris*. Na marginesie głównych celów pracy chciałbym zapytać, czy zaobserwowana struktura genetyczna we

wszystkich badanych populacjach pozwala dodatkowo na wyciągnięcie wniosków dotyczących polodowcowej historii zasięgu tego gatunku w północnej Europie?

Rozdziały trzeci i czwarty rozprawy (prace złożone, odpowiednio, do *Molecular Ecology* i *BMC Plant Biology*) oparte są na obszernym, nowo opracowanym panelu polimorficznych markerów SNP dla sosny (7390 markerów po rygorystycznym filtrowaniu), który został wykorzystany do genotypowania ponad 1300 wstępnie scharakteryzowanych morfologicznie osobników z trzech badanych stanowisk (stref hybrydyzacji) i referencyjnych, allopatrycznych populacji gatunków rodzicielskich. Należy podkreślić jakość tego materiału i czasochłonność prac przeprowadzonych przez doktoranta. W pierwszej części badań szczegółowo scharakteryzowano rozkład i udział puli genetycznych gatunków rodzicielskich u zmapowanych osobników z badanych stref mieszańcowych. Niezwykle interesującym wynikiem tych analiz było stwierdzenie w badanych strefach wyraźnej introgresji w stronę *P. mugo*, szczególnie na obydwu stanowiskach o charakterze torfowiskowym. Nieco wyższy udział puli ancestralnej *P. sylvestris* został zanotowany na odmiennym siedliskowo stanowisku Błędne Skały. Powiązana była z tym obserwowana segregacja środowiskowa fenotypów na stanowiskach podmokłych i skupienie osobników o fenotypie zbliżonym do *P. sylvestris* tylko na bardziej suchych obrzeżach. Wszystkie te obserwacje wskazują na duży wpływ warunków mikrośrodowiskowych na kształtowanie struktury genotypów i rozkład fenotypów w obrębie strefy hybrydyzacji i – w tym przypadku – dominację puli genetycznej *P. mugo*, jako gatunku o lepszym wyjściowym dostosowaniu siedliskowym. Obserwacje te znalazły potwierdzenie w drugiej części badań skupionej na wytypowaniu potencjalnych loci podlegających presji selekcyjnej. W analizie wytypowanych loci (wybranych w rygorystycznej analizie opartej na potwierdzeniu charakterystyki loci co najmniej dwiema metodami) doktorant wraz ze współautorami wykazał znacząco wyższą presję selekcyjną na pulę genetyczną *Pinus sylvestris* niż *P. mugo* w obrębie stref hybrydyzacji charakteryzujących się warunkami środowiskowymi bardziej różniącymi się od typowej niszy pierwszego gatunku. Przedstawiona interpretacja opiera się na ogólnej obserwacji lepszego dostosowania *P. mugo* do trudnych warunków siedliskowych (łącznie z podtapianiem; nb. na przykład ekologiczne liczby wskaźnikowe pokazują takie same wartości wilgotności gleby dla obu gatunków sosen; Zarzycki i in. 2002. *Ecological indicator values of vascular plants of Poland*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences). Generalnie warto byłoby może pod kątem dyskusji na temat presji selekcyjnej bardziej formalnie oszacować stopień dostosowania obydwu gatunków do warunków stref hybrydyzacji np. poprzez szczegółowe modelowanie nisz środowiskowych.

Dodatkowo, badania pozwoliły na przekonujące wsparcie koncepcji, że populacje opisane jako *Pinus uliginosa* nie reprezentują odrębnego taksonu ale populacje mieszańcowe *P. sylvestris* x *P. mugo* (= *P. x rhaetica*), które stanowią być może wstępny etap utrwalania potencjalnego taksonu mieszańcowego. Jest to wynik ważny dla rozwiązania problemu tego enigmatycznego taksonu, traktowanego jako zagrożony i objęty ochroną gatunek reliktowy.

Nie mam wątpliwości, że rozprawa doktorska Pana mgr. Sebastiana Szczepańskiego opiera się na świetnym materiale i bardzo dobrze zrealizowanych badaniach; przynosi ona ważne wyniki dotyczące genetyki stref hybrydyzacji ale także metodyki, taksonomii i ochrony zasobów przyrodniczych. Do najważniejszych, w mojej ocenie, aspektów rozprawy należą:

1. Oparcie badań na bardzo obszernym i znakomicie udokumentowanym materiale biologicznym.
2. Szczegółowe zbadanie struktury i zmienności genetycznej w trzech strefach hybrydyzacji w DNA organellarnym (głównie mtDNA) i jądrowym, w odniesieniu do szerokiego kontekstu referencyjnych populacji allopatrycznych *P. sylvestris* i *P. mugo*.
3. Wykazanie lokalnego znaczenia międzygatunkowego przepływu genów w strefach styku gatunków (braku wpływu na populacje allopatryczne nawet w skali lokalnej).
4. Wykazanie dobrze udokumentowanej, asymetrycznej presji selekcyjnej w strefach hybrydyzacji, związanej ze zróżnicowanym poziomem dostosowania gatunków rodzicielskich do warunków siedliskowych w strefach styku.
5. Potwierdzenie statusu ewolucyjnego (i zarazem taksonomicznego) *Pinus uliginosa*, jako mieszańca *P. sylvestris* i *P. mugo* a nie odrębnego taksonu.
6. Wkład w rozwój metodyki badań, w tym: opracowanie i przetestowanie usprawnionej metodyki analiz zmienności mtDNA z wykorzystaniem systemu SNaPshot, przetestowanie na obszernym materiale mutacji w regionie *trnL-trnF* cpDNA diagnostycznej dla *P. sylvestris*/*P. mugo*, a także opracowanie i wykorzystanie rozbudowanego panelu polimorficznych markerów SNP dla sosny.

Zgodnie z treścią art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce oraz wynikającymi z niej wytycznymi sformułowanymi przez Radę Doskonałości Naukowej, ocenie w ramach recenzji powinny podlegać następujące aspekty rozprawy doktorskiej: (i) czy prezentuje ona ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora, (ii) czy wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, oraz (iii) czy stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Rozprawa zawiera krótko ale dobrze zarysowane tło badań i sprawnie przeprowadzoną dyskusję wyników, z wykorzystaniem obszernej, aktualnej literatury (zarówno w ogólnym wprowadzeniu jak i w poszczególnych artykułach) pokazując jednoznacznie, że doktorant posiada bardzo dobrą orientację w tematyce badań i rozległą wiedzę teoretyczną, która pozwoliła na przygotowanie pracy na wysokim poziomie merytorycznym. Kwestia umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej to najszerszy aspekt określonych w ustawie kryteriów oceny rozprawy, ponieważ dotyczy całego warsztatu naukowego doktoranta. Zakres zrealizowanych badań, opanowany zróżnicowany warsztat analiz genetycznych (analizy loci mikrosatelitarnych, SnapShot, analizy rozbudowanych paneli SNP oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji), dobra dyskusja kompleksowych wyników oraz niezwykle staranne językowe i redakcyjne przygotowanie samej rozprawy pozwalają stwierdzić bez wątpliwości, że doktorant posiada umiejętność samodzielnej pracy naukowej. Wreszcie, omówione i podsumowane powyżej osiągnięcia naukowe, jakie przynosi rozprawa, pozwalają również jednoznacznie stwierdzić, że doktorant wykazał się umiejętnością skutecznego rozwiązania postawionych problemów naukowych a jego badania wnoszą ważny i oryginalny wkład zarówno w obieg międzynarodowy (wkład do badań ewolucji stref hybrydyzacji) jak i na poziomie regionalnym (poznania unikatowych systemów przyrodniczych w Polsce).

Konkluzja

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr. Sebastiana Szczepańskiego spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 r. poz. 742). W związku z tym wnioskuję do Rady

Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pana mgr. Sebastiana Szczepańskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny ocenianej pracy doktorskiej, znaczenie uzyskanych wyników, a także obszerność i pracowitość wykonanych badań, składam również wniosek o wyróżnienie rozprawy Pana mgr. Sebastiana Szczepańskiego.

