



ZAKŁAD BOTANIKI  
ul. Kanonia 6/8  
50-328 Wrocław  
tel. +48 71 375 40 85  
zbot@uwr.edu.pl

dr hab. Anna Jakubska-Busse, prof. UWr  
Zakładu Botaniki UWr, Pracownia Taksonomii Roślin,  
Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław,  
e-mail: anna.jakubska-busse@uwr.edu.pl

Wrocław, 10 stycznia 2025 r.

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Sikory  
pt. "Zastosowanie metody przeczesywania genomu do charakterystyki różnorodności genetycznej  
blisko spokrewnionych taksonów z kompleksu *Pinus mugo*"**

Podstawę formalną do wykonania recenzji stanowi pismo o sygnaturze WB-105-2024/2025, z dnia 13 grudnia 2024 roku, sporządzone na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza z dnia 22 listopada 2024 r., powierzające mi obowiązki recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Joanny Sikory, która ubiega się o nadanie stopnia doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jako recenzentka oświadczam, że nie znajduję się w sytuacji konfliktu interesów, w szczególności nie posiadam z Doktorantką wspólnych publikacji oraz nie prowadzę obecnie wspólnych badań naukowych.

**Ocena formalna**

Rozprawa doktorska mgr Joanny Sikory została wykonana w Zakładzie Genetyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem dr hab. Konrada Celińskiego, prof. UAM. Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską stanowią trzy spójne tematycznie artykuły naukowe napisane w języku angielskim i opublikowane w latach 2021-2024 w czasopismach MDPI: *Plants* (2021, 2022) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (2024). Wszystkie prace ukazały się w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR), o łącznym współczynniku wpływu IF: 10,164 oraz sumie punktów ministerialnych wynoszącej 280. We wszystkich trzech pracach doktorantka jest pierwszym autorem a autorem korespondencyjnym jest promotor.

W skład omawianego cyklu wchodzi następujące prace:

1. Sokołowska J., Fuchs H., Celiński K. 2021. New insight into taxonomy of European mountain pines, *Pinus mugo* complex, based on complete chloroplast genomes sequencing. *Plants* 10(7), 1331. IF = 2,632, MNiSW = 70 pkt
2. Sokołowska J., Fuchs H., Celiński K. 2022. Assessment of ITS2 region relevance for taxa discrimination and phylogenetic inference among Pinaceae. *Plants* 11(8), 1078. IF = 2,632, MNiSW = 70 pkt
3. Sikora J., Celiński K. 2024. Exploring Taxonomic and Genetic Relationships in the *Pinus mugo* Complex Using Genome Skimming Data. *International Journal of Molecular Sciences* 25(18), 10178. IF = 4,9, MNiSW = 140 pkt

Rozprawa doktorska Pani mgr. Joanny Sikory została napisana w j. polskim i składa się z sześciu numerowanych rozdziałów (*Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Komentarze do publikacji, Podsumowanie* oraz licząca 84 pozycje *Bibliografia*) i mieści się na 131 numerowanych stronach, włączając w to kopie publikacji. Rozdział czwarty stanowią załączone oryginalne publikacje w języku



## ZAKŁAD BOTANIKI

ul. Kanonia 6/8  
50-328 Wrocław  
tel. +48 71 375 40 85  
zbot@uwr.edu.pl

angielskim oraz ich krótkie omówienie w j. polskim. Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Sikory jest zgodny z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań, jest to typowy układ dla osiągnięć naukowych opartych na zbiorze opublikowanych artykułów. Na końcu pracy zostały załączone oświadczenia autorów publikacji potwierdzające wkład Doktorantki w ich powstanie. Tytuł pracy jest w pełni adekwatny do jej treści i nie budzi zastrzeżeń. Podane na stronie 18 manuskryptu główne cele rozprawy zostały jasno i zwięźle sformułowane, a zaprezentowane wyniki badań zostały przez Doktorantkę omówione wnikliwie i rzeczowo. Cytowana w pracy literatura została dobrana prawidłowo, z odniesieniem zarówno do kluczowych prac opublikowanych wcześniej, jak też do najnowszych pozycji. Nie budzą zastrzeżeń również kwestie formalne, związane z pisaniem pracy i przedstawieniem wyników badań własnych. Zgodnie z informacjami zawartymi w oświadczeniach autorów, udział Doktorantki w tworzeniu publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej prac był znaczący. Obejmował zarówno zaplanowanie badań, zebranie materiału badawczego, wykonanie analiz laboratoryjnych i analiz uzyskanych danych, następnie interpretację uzyskanych wyników oraz współudział w pracy przy redakcji wszystkich trzech manuskryptów, ich korekcie po recenzjach oraz pomoc w odpowiedzi na uwagi recenzentów. Doktorantka uczestniczyła również w procesie deponowania uzyskanych sekwencji do bazy GenBank.

Rozprawa doktorska mgr Joanny Sikory powstała w ramach realizacji projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2018-2022 (Diamentowy Grant 0031/DIA/2018/4), pt. „Rekonstrukcja relacji filogenetycznych w kompleksie *Pinus mugo* z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next generation sequencing*) i metody przeczesywania genomu (ang. *genome skimming*)”.

### Ocena merytoryczna pracy

W przypadku rozprawy doktorskiej opartej na pracach już opublikowanych recenzent ma ułatwione zadanie, gdyż każda z publikacji była już recenzowana przez przynajmniej dwóch recenzentów oraz redaktora. Oceniając całą rozprawę chciałbym podkreślić konsekwentnie zrealizowany plan realizacji podjętych celów badań oraz zastosowane nowatorskie techniki analityczne wymagające zarówno praktycznej umiejętności pracy w laboratorium, jak i znajomości metod bioinformatycznych.

Gatunek zbiorowy, jakim jest *Pinus mugo* agg. to polimorficzny kompleks blisko spokrewnionych sosen, znany przede wszystkim z dużego zakresu zmienności fenotypowej, ale także z braku wyraźnego zróżnicowania genetycznego między gatunkami, utrudniającego klasyfikację taksonomiczną. W szerokim ujęciu *Pinus mugo* s.l. obejmuje trzy podgatunki: *P. mugo* subsp. *mugo*, *P. mugo* subsp. *uncinata* i *P. mugo* subsp. *rotundata*. Traktowany wąsko, jako *Pinus mugo* s.s., obejmuje *P. mugo* subsp. *mugo*, *P. uncinata* i *P. rotundata*. Liczba taksonów wchodzących w skład kompleksu *P. mugo* przekracza obecnie 100 i poza gatunkami i podgatunkami obejmuje również liczne odmiany, włączając kultywary i formy. Wiele z taksonów ma pochodzenie mieszańcowe a ich identyfikacja, zwłaszcza w warunkach terenowych, jest szczególnie problematyczna. Z uwagi na duży zakres plastyczności fenotypowej oraz mało precyzyjne cechy morfologiczne uznane za diagnostyczne wewnątrz grupy, system klasyfikacji taksonomicznej tego agregatu od dawna budzi wątpliwości i w zasadzie traktowany jest jako tymczasowy. Mimo rozwoju technik badawczych, nadal niejasne pozostają zarówno pochodzenie, jak i status taksonomiczny wielu taksonów z kompleksu *P. mugo*.

Przedstawiona do oceny praca doktorska to przeprowadzone po raz pierwszy wnikliwe, wartościowe i w założeniu ambitne studium zróżnicowania genetycznego taksonów wchodzących w skład gatunku zbiorowego *Pinus mugo* agg. Zastosowana przez Doktorantkę metodyka badań potwierdziła bliskie



## ZAKŁAD BOTANIKI

ul. Kanonia 6/8  
50-328 Wrocław  
tel. +48 71 375 40 85  
zbot@uwr.edu.pl

pokrewieństwo między badanymi taksonami, sugerując pilną potrzebę przeprowadzenia w przyszłości rewizji obecnego systemu klasyfikacji taksonomicznej kompleksu *P. mugo*.

Pierwsza z publikacji wchodzących do cyklu (Plants 2021, 10(7), 1331) to przeprowadzona po raz pierwszy analiza porównawcza kompletnych genomów chloroplastowych taksonów zaliczanych do *Pinus mugo* subsp. *mugo*, *P. mugo* subsp. *rotundata*, *P. mugo* subsp. *uncinata* oraz blisko spokrewnionej *P. sylvestris*. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są zgodne z wcześniejszymi badaniami, w których potwierdzono podobieństwo w organizacji genomu chloroplastowego *Pinus densiflora*, *P. sylvestris*, *P. thunbergii*, *P. tabuliformis* i *P. taeda*. Przeprowadzona przez Doktorantkę szczegółowa analiza porównawcza ujawniła obecność pięciu hotspotów o wartości różnorodności nukleotydowej (średniej liczby różnic nukleotydowych w jednej lokalizacji pomiędzy dwoma losowo wybranymi osobnikami należącymi do populacji) większej niż 0,00238 dla taksonów z kompleksu *P. mugo* oraz występowanie dziewięciu hotspotów dla taksonów z kompleksu *P. mugo* i *P. sylvestris* o wartości różnorodności nukleotydowej większej niż 0,00589. W analizowanych genomach chloroplastowych *P. mugo*, *P. uliginosa* oraz *P. uncinata* autorzy pracy wykryli 59 *loci* mikrosatelitarnych (SSR) o długości co najmniej 10 pz. Należy zaznaczyć, że ich liczba była zmienna w zależności od badanego taksonu i wahała się w przedziale od 19 u *P. uncinata* do 20 u *P. mugo* i *P. uliginosa* i była podobna do *P. sylvestris*. Zidentyfikowane różnice w liczbie i rozmieszczeniu sekwencji mikrosatelitarnych pozwalają, zdaniem autorów, na rozróżnienie badanych taksonów. Bliskie pokrewieństwo *P. uncinata*, *P. mugo* i *P. uliginosa* potwierdziły również przeprowadzone przez autorów tej publikacji analizy filogenetyczne z wykorzystaniem metody największej wiarygodności (ang. Maximum Likelihood) oraz wnioskowania bayesowskiego (ang. Bayesian Inference), wykonane na podstawie dwóch zestawów danych, tj. kompletnych plastomów oraz wysoce zmiennego regionu *ycf1*.

Druga z publikacji (Plants 2022, 11(8), 1078) dotyczyła oceny skuteczności wykorzystania regionu jądrowego cistronu rybosomalnego ITS2 jako potencjalnego regionu barkodowego do wyróżniania taksonów spokrewnionych, należących do gatunku zbiorowego *Pinus mugo* agg. oraz do szerszego wnioskowania filogenetycznego. Do tego celu wykorzystano trzy metody: metodę opartą na odległości genetycznej (PWG-distance), metodę opartą na podobieństwie sekwencji DNA z wykorzystaniem programów TaxonDNA i Blast oraz wnioskowanie filogenetyczne z wykorzystaniem metody największej wiarygodności (ang. Maximum Likelihood). Uzyskane wyniki z jednej strony wykazały wyraźne różnice między wyróżnianymi jednostkami wyższego rzędu w rodzinie *Pinaceae*, z drugiej jednak potwierdziły bliskie pokrewieństwo badanych taksonów z kompleksu *P. mugo* i niestety, ze względu na zbyt niską zmienność genetyczną tego regionu, wskazały na brak zasadności wykorzystania sekwencji ITS2 do analiz filogenetycznych tego agregatu.

Trzecia z prac (Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 10178) przedstawia wyniki analiz relacji genetycznych i taksonomicznych w kompleksie *Pinus mugo*. Szczegółowe wnioskowanie przeprowadzono w oparciu o zestaw danych wygenerowany dzięki sekwencjonowaniu nowej generacji i metodzie przeczesywania genomu. Doktorantka wykazała niską zmienność całego regionu ITS, która podobnie jak region ITS2 nie pozwala na skuteczną dyskryminację blisko spokrewnionych taksonów. Wynik ten nie jest zaskakujący, potwierdza bardzo bliskie pokrewieństwo badanych taksonów i młody wiek grupy. Niewątpliwie interesującym wynikiem jest stwierdzenie, że *Pinus x rhaetica* jest znacznie bardziej zbliżona genetycznie do *P. sylvestris*, niż do taksonów z kompleksu *P. mugo* i nie powinna być utożsamiana/synonimizowana ani z *P. uliginosa*, ani z *P. rotundata*. W publikacji zwraca jednak uwagę stosunkowo niewielkie dla tego typu badań próbkowanie z ograniczonego geograficznie obszaru,



które może wpływać na uzyskany wynik badań.

### Uwagi krytyczne

W rozdziale wstępnym Doktorantka popełniła kilka błędów stylistycznych oraz błędów edytorskich, wynikających zapewne z pośpiechu przy pisaniu pracy. Błędy te nie umniejszają jednak wartości naukowej tego rozdziału. W pracy zwracają jednak uwagę stosowane błędnie, zamiennie i dosyć dowolnie skróty jednostek taksonomicznych. Zgodnie z przyjętymi zasadami stosowania nomenklatury botanicznej (Międzynarodowy Kodeks Nomenklatury Botanicznej) nazwy taksonów mieszańcowych, takich jak np. *Pinus ×pseudopumilio*, *P. ×digenea*, czy *P. ×rhaetica* piszemy bez spacji poprzedzającej epitet gatunkowy. Niestety ten ostatni błąd pojawia się w ocenianej pracy doktorskiej zarówno w tekście manuskryptu, jak i we wszystkich opublikowanych artykułach (tj. *Plants* 2021, 10(7), 1331; *Plants* 2022, 11(8), 1078 (Tabele S2 i S3) oraz *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 10178), co dziwi, ponieważ prace te były uprzednio recenzowane. Niestety, błąd ten wydaje się być powszechny, ponieważ pojawia się również w pracach innych autorów cytowanych przez Doktorantkę. Skróty łacińskich fraz „*sensu lato*” i „*sensu stricto*”, odpowiednio s.l. i s.s., piszemy bez użycia kursywy (str. 15, 16) i spacji w środku. W tekście pracy dobrze jest też konsekwentnie stosować jeden model zapisu skrótu oznaczającego podgatunek. Stosowanie obok siebie zamiennie zapisu subsp. oraz ssp. może być dla czytelnika mylące. Obecnie zaleca się stosowanie skrótu subsp., ale co ważne, skrótów tych nigdy nie piszemy kursywą (np. str. 22). Z formalnego punktu widzenia nie istnieje również skrót ssp. podany przez autorów dla podgatunków *Pinus mugo* w trzeciej wchodzącej w skład cyklu pracy na str. 11 (*Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 10178). Również zapis nazwy innego podgatunku mieszańcowego powinien zostać skorygowany do poprawnej formy *Pinus mugo* nothosubsp. *rotundata*.

Co do tego ostatniego taksonu, mam wątpliwości dotyczące jego klasyfikacji w kontekście wyników badań zaprezentowanych w ocenianej pracy doktorskiej. Zgodnie z aktualizowanymi danymi pochodzącymi z WFO (The World Flora Online) oraz danymi pochodzącymi z bazy WCSP (The World Checklist of Selected Plant Families), w zależności od ujęcia, albo w randze odrębnego gatunku *Pinus rotundata* Link, albo odmiany *Pinus mugo* var. *rotundata* (Link) Hoopes, albo podgatunku *Pinus mugo* subsp. *rotundata* (Link) Janch. & H. Neumayer wszystkie te nazwy odnoszą się do jednego taksonu i uznane są obecnie za synonimy *Pinus uncinata* subsp. *uncinata* (nazwa akceptowana). Kolejny gatunek *Pinus uliginosa* G.E. Neumann ex Wimm. to według bazy WFO jedynie synonim dla *Pinus uncinata* subsp. *uliginosa* (G.E. Neumann ex Wimm.) Businsky i to właśnie ta nazwa jest akceptowana.

Chciałabym poprosić o wyjaśnienie przez Doktorantkę tego ujęcia, w kontekście całej pracy doktorskiej, ale szczególnie w odniesieniu do wyników oraz wniosków końcowych znajdujących się w trzeciej wchodzącej w skład cyklu publikacji (*Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 10178).

Jak ostatecznie, w świetle wyników badań własnych oraz innych dostępnych danych, powinien, zdaniem Doktorantki, wyglądać system klasyfikacji kompleksu *Pinus mugo*, które taksony należy formalnie zsynonimizować?

W jaki sposób Doktorantka weryfikowała poprawność oznaczenia taksonomicznego wykorzystanych do badań genetycznych próbek materiału roślinnego, biorąc pod uwagę tak szeroki zakres zmienności fenotypowej badanych taksonów?

W przesłanej do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr Joanny Sikory zauważalny jest brak zróżnicowania wydawców czasopism, w których zostały opublikowane prace wchodzące w skład rozprawy. Wszystkie trzy prace opublikowano na łamach dwóch czasopism wydawanych przez MDPI. Łączny dorobek naukowy Doktorantki stanowi sześć prac, z których pięć zostało opublikowanych przez to wydawnictwo. Obecnie na rynku wydawniczym sprawnie funkcjonuje co najmniej kilka prestiżowych



## ZAKŁAD BOTANIKI

ul. Kanonia 6/8  
50-328 Wrocław  
tel. +48 71 375 40 85  
zbot@uwr.edu.pl

tytułów o podobnej randze, a wśród nich również czasopisma niewymagające wnoszenia wysokich opłat za publikację. Podejmowanie przez doktorantów próby publikowania wyników swoich badań w różnych periodykach, w tym wydawanych przez takie platformy jak Oxford Academic Press, Cell Press, John Wiley & Sons, Elsevier, czy chociażby Springer Nature, a co za tym idzie mierzenie się z często bardzo wysokimi wymaganiami różnych zespołów redakcyjnych, choć w razie niepowodzeń bywa frustrujące, wskazuje na dojrzałość i doskonale przygotowuje do dalszej pracy naukowej.

**Wniosek końcowy**

Przedstawiony do oceny cykl prac jest spójny tematycznie i wnosi nowe informacje o dotyczące zróżnicowania genomu chloroplastowego gatunków wchodzących w skład kompleksu *Pinus mugo* oraz sugeruje zmiany w obecnym systemie jego klasyfikacji. Z pewnością wszystkie opublikowane przez Doktorantkę prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są ważne i stanowić będą podstawę dalszych, bardziej szczegółowych badań taksonomicznych.

Pomimo zastrzeżeń zaznaczonych powyżej, stwierdzam że przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Joanny Sikory spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim 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). Na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Joanny Sikory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Anna Jakubka-Busse, prof. UWr