

dr hab. Sebastian Hofman, prof. UJ
Zakład Anatomii Porównawczej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Grzegorza Jana Skórzewskiego pt. „Status taksonomiczny i przebieg strefy hybrydyzacji padalca zwyczajnego *Anguis fragilis* L. i kolchidzkiego *A. colchica incerta* (Nordmann, 1840) (Anguidae; Squamata) na terenie Polski”,

wykonanej pod kierunkiem promotora dra hab. Jana Katusza, prof. UW. oraz promotora pomocniczego dra Bartosza Borczyka, na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Praca Pana Grzegorza Skórzewskiego dotyczy analizy morfologicznej i molekularnej dwóch gatunków europejskich padalców: padalca zwyczajnego, *Anguis fragilis* Linnaeus, 1758 oraz padalca kolchidzkiego, *A. colchica* (Nordmann, 1840). Trzeba zwrócić uwagę, że praca dotyczy dość ważnego i nowego aspektu różnicowania genetycznego dwóch gatunków padalców wyróżnionych molekularnie stosunkowo niedawno, bo w 2010 roku, a dokładniejsze opisanie tego różnicowania zostało uzupełnione badaniami przeprowadzonymi w 2013 roku przez Gwoźdika i współpracowników. Co jest warte podkreślenia autor niniejszej dysertacji aktywnie zajmował się tym tematem już niemal od czasu pierwszych opisów padalca kolchickiego w Polsce, o czym świadczy praca z 2012 roku, której jest współautorem. Co również ważne niniejsza praca jest przykładem badań łączących analizy molekularne i morfologiczne, a podejście takie jest niemal konieczne do prawidłowych wniosków taksonomicznych.

Praca ma postać tradycyjnej rozprawy doktorskiej, liczy 129 stron, 31 tabel, 23 rycin, 5 tablic, które zawierają zdjęcia cech morfologicznych padalców oraz jeden załącznik będący wykazem sekwencji referencyjnych wykorzystanych przez doktoranta. W sumie doktorant zacytował 149 pozycji, a ich wybór świadczy o dobrym rozeznaniu tematu przez autora pracy.

Wstęp do pracy w jasny sposób wprowadza czytelnika do zagadnień związanych z badaniami nad padalcami, przedstawiając głównie historię badań nad ich taksonomią oraz historię poznawania cech wyróżniających padalca kolchickiego wraz ze stosowanymi cechami morfologicznymi oraz metodami molekularnymi. Cele pracy są bardzo jasno sprecyzowane, co świadczy o dobrym zaplanowaniu badań. Do najważniejszych należy określenie przebiegu granicy kontaktu pomiędzy dwoma polskimi gatunkami padalców, wykrycie ewentualnej strefy hybrydyzacji pomiędzy nimi, oraz opis różnorodności

genetycznej obu gatunków i powiązanie jej ze zróżnicowaniem cech morfologicznych, stanowiących podstawę używaną do rozróżniania obu taksonów.

Osobniki do badań zebrano z około 36 stanowisk mniej więcej pokrywających całą powierzchnię Polski, o łącznej liczbie 116. Materiał uzupełniono o okazy należące do zbiorów różnych jednostek badawczych. Co bardzo istotne, najwięcej stanowisk zebrano w obszarze potencjalnego kontaktu między gatunkami. Liczba stanowisk jest stosunkowo duża, zważywszy na trudność w pozyskiwaniu materiału do badań z takich zwierząt jak padalce. W badaniach molekularnych wykorzystano: dla fragmentu ND2 157 sekwencji (w tym 90 nowo otrzymanych) oraz dla markeru RAG1 83 sekwencje (w tym 71 nowych). Liczby te są wystarczające dla przeprowadzenia miarodajnych badań filogenetycznych. W badaniach morfologicznych przebadano dużą liczbę osobników dorosłych, to jest 251. Oprócz długości tułowia i ogona mierzono 10 różnych dystansów w obrębie głowy. Analizowano również cechy policzalne związane m. in. z łuskami, otworem słuchowym i pileusem oraz cechy jakościowe, jak ubarwienie, a także skład pokarmu. Wykorzystane metody, sposób zbierania materiału, techniki laboratoryjne i analityczne zostały opisane w sposób wystarczający i jasny. Nasuwa się jednak pytanie, czy doktorant próbował użyć innych markerów genetycznych? Co do dodatkowych fragmentów DNA mitochondrialnego (mtDNA), mogłyby one wnieść niewiele, genom mitochondrialny można traktować jako jeden locus (choć zwiększenie długości analizowanego DNA dodatkowo mogłoby wzmocnić wnioskowanie), to jednak użycie innych fragmentów DNA jądrowego (np. stosowane przez innych badaczy czynnik dojrzewania oocyty oraz receptor prolaktynowy, lub innych, takich jak histon 3) mogłoby znacznie wzmocnić wyniki. Co więcej 25 różnych markerów zostało niedawno opisanych w pracy Lavin i Girman 2019. Czy były podejmowane próby wykorzystania innych markerów jądrowych i np. okazywały się mało lub nie zmienne? Nie jest również jasne, czy próbowano przeprowadzić analizę maksymalnego prawdopodobieństwa przy zastosowaniu programu RAxML, który umożliwia chociażby zastosowanie partycji i czy wyniki były podobne, jak również czy były podjęte próby wykorzystania metod delimitacji gatunków (z wykorzystaniem również innych europejskich gatunków padalców), jak np. PTP, ABGD, GMYC?

Największą częścią pracy są wyniki. Pierwsza część obejmuje wyniki badań molekularnych, druga morfologicznych, co jest bardzo logicznym zabiegiem doktoranta. Dla markera mitochondrialnego ND2 na 19 stanowiskach doktorant zidentyfikował padalca zwyczajnego, a na 10 kolchidzkiego. Co ciekawe na dwóch stanowiskach znajdowały się osobniki z dwoma typami mtDNA. Haplotypy charakterystyczne dla padalca zwyczajnego

zostały znalezione generalnie w Polsce północnej i zachodniej, a dla padalca kolchidzkiego południowo-wschodniej. Szkoda, że mapy obrazujące rozmieszczenie poszczególnych typów mtDNA są stosunkowo małe i nie są na nich zaznaczone konkretne numery pozwalające zidentyfikować poszczególne stanowiska. Niemniej ustalenie granicy styku obu gatunków w Polsce jest bardzo wartościowym osiągnięciem pracy. Doktorant analizował również zróżnicowanie mtDNA w obrębie obu gatunków. Niezwykle ciekawą okazała się różnica w poziomie zmienności pomiędzy gatunkami, u padalca zwyczajnego jest ona niewielka, u padalca kolchidzkiego znacznie większa, a dodatkowo poszczególne haplotypy tego gatunku grupowały się w trzy wyraźnie odrębne kłady. Podobnie do ND2 zmienność między i wewnątrz gatunkowa oraz rozmieszczenie geograficzne haplotypów były przeanalizowane dla jądrowego fragmentu RAG1. Jednym z ważniejszych wyników pracy było zidentyfikowanie hybryd międzygatunkowych, posiadających genomy mitochondrialny i jądrowy dwóch różnych gatunków. Jest to pierwsza taka identyfikacja w Polsce i jedna z nielicznych w Europie. Zidentyfikowanie trzech molekularnych klas padalców (zwyczajny, kolchidzki i hybrydy) stworzyły dla doktoranta okazję do przeanalizowania wielu cech morfologicznych pod kątem różnic międzygatunkowych i ewentualnego praktycznego zastosowania do odróżniania gatunków.

Wśród analizowanych cech morfologicznych znalazły się rozmiary ciała, pomiary kilku parametrów wymiarów głowy (co pozwoliło m. in. na analizę zróżnicowania kształtu głowy oraz wzorców wzrostu), liczby łusek po brzusznej stronie ciała, liczby łusek wargowych górnych i dolnych, liczba rzędów łusek wokół centralnej części ciała, widoczność otworu słuchowego, typ kontaktu między tarczami przedczołowymi, plamy na grzbiecie, ubarwienie spodniej strony ciała, obecność centralnej linii grzbietowej, obecność kontrastu grzbietowo-brzusznego, obecność plam za głową. Analizowano również skład pokarmu. Ta długa lista badanych cech ma pokazać ilość pracy włożoną przez doktoranta, tym bardziej, że poszczególne pomiary były robione na dużej liczbie osobników, zarówno samic, jak i samców, z podziałem na trzy zdefiniowane molekularnie grupy.

Analizy wykazały m. in. większe rozmiary ciała u padalca kolchidzkiego, istnienie pewnych różnic międzygatunkowych w rozmiarach głów, a przede wszystkim udowodniły przydatność do identyfikacji gatunku takich cech jak obecność otworu usznego (którego brak jest u padalca zwyczajnego) oraz liczbę rzędów łusek wokół centralnej części ciała (mniejszą u padalca zwyczajnego).

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy są bardzo interesujące i ważne. W temacie taksonomii padalców w Europie praca ta jest jedną z nielicznych, które wiążą badania

molekularne i morfologiczne. To właśnie to powiązanie jasno wskazuje, które cechy morfologiczne mogą być przydatne do identyfikacji gatunkowej, które mogą być traktowane jako pomocnicze, a które się do tego nie nadają. Dzięki zidentyfikowaniu poszczególnych osobników, za pomocą badań molekularnych, na osobniki reprezentujące padalca zwyczajnego, kolchickiego oraz hybrydy, stało się możliwe udowodnienie, które z powszechnie wykorzystywanych do tej pory cech pozwalają na prawidłowe określenie gatunku, a które nie. Jest to jedno z najważniejszych osiągnięć recenzowanej rozprawy.

Dyskusja jest napisana w sposób bardzo zadowolający. Większość otrzymanych wyników jest omówiona i zinterpretowana. Do ważniejszych wniosków należy interpretacja możliwych refugium glacialnych dla obu gatunków, przy czym duże zróżnicowanie padalca kolchickiego i jego trzy odrębne linie ewolucyjne, mogą wskazywać, w przeciwieństwie do padalca zwyczajnego, na istnienie trzech odrębnych refugium. Udowodniono również występowanie hybryd na terenie Polski, przynajmniej w dwóch miejscach, na Mazowszu i Górnym Śląsku, co więcej uzyskane wyniki sugerują żywotność i zdolność do rozmnażania mieszańców. Doktorant dokładnie przedyskutował i porównał z istniejącą literaturą wszelkie zaobserwowane różnice dotyczące zróżnicowania genetycznego i morfologicznego. Na szczególne wspomnienie zasługują części omawiające pewne różnice w obecności niebieskich plam na grzbiecie, które mogą być pomocniczą cechą przy odróżnianiu gatunków (plamy te są znacznie częstsze u padalca kolchickiego) oraz próby wyjaśnienia różnic w wymiarach głowy, nie tylko w kontekście odróżniania gatunków, ale również dymorfizmu płciowego. Pod koniec dyskusji autor zastanawia się nad taksonomią padalców. Oba gatunki zostały odróżnione od siebie stosunkowo niedawno, na podstawie cech morfologicznych i zróżnicowania genetycznego. Jednak mogą one nie spełniać wszystkich warunków potrzebnych do wyodrębnienia gatunków, ze względu na brak izolacji rozrodczej. Autor sugeruje przywrócenie rangi podgatunków, choć słusznie zauważa, że konieczne są dalsze badania, w tym nad żywotnością i rozrodczością mieszańców. Zgadzam się z tym zdaniem, szczególnie w kontekście np. możliwej strefy mieszańcowej związanej np. z niższym dostosowaniem mieszańców, która może, mimo zdolności krzyżowania się gatunków, utrzymać ich odrębność genetyczną. Być może autor mógł nieco wydłużyć dyskusję właśnie w kierunku możliwych stref mieszańcowych pomiędzy gatunkami o izolowanych pulach genowych.

Edytorsko praca jest napisana dobrze, choć istnieją pewne niedociągnięcia. Przykładowo w niektórych miejscach brakuje określenia autora nazwy rodzaju lub gatunku, pewne stosowane skróty angielskie powinny być napisane po polsku (np. i in. zamiast et al.,

„w” zamiast „In”, „i” zamiast „&”, „red” zamiast „eds”), a w spisie literatury są niepotrzebne odstępki. Nieco zastrzeżeń można mieć do jakości rycin, szczególnie map, na których są przedstawione rozmieszczenia zebranych prób, czy też zidentyfikowanych haplotypów. Mapy mogły by być nieco większe, poszczególne miejsca powinny zostać oznaczone numerami, korespondującymi z oznaczeniami w Tabeli z wykazem miejsc, a kolory oznaczające poszczególne haplotypy powinny bardziej różnić się od siebie. Szkoda również, że autor nie zamieścił mapy pokazującej lokalizację każdego stanowiska, np. za pomocą ponumerowania poszczególnych stanowisk. Ponadto na rycinach 3a i 3b zaznaczone są, według opisu, rozmieszczenia haplotypów, jednak chodzi raczej o typy mtDNA charakterystyczne gatunkowo, rozmieszczenie poszczególnych haplotypów jest pokazane na rycinach 4 i 7. Mam również pytanie dotyczące tabeli 1 – są w niej pewne nieścisłości, w tekście autor podaje liczbę prób zebranych z terenu Polski jako 36. W tabeli znajduje się 31 stanowisk opisanych jako „analiza molekularna”, jedno jako „te badania” (co to znaczy?) oraz dziesięć zaczerpniętych z wcześniejszych publikacji.

Powyższe uwagi krytyczne nie ujmują mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy, która niewątpliwie stanowi znaczący wkład w rozwój dziedziny biologii. Biorąc pod uwagę duże znaczenie podjętych badań, znaczne wartości poznawcze, a także dobrą znajomość problematyki przez Autora oraz jego umiejętności pozyskiwania i wykorzystania uzyskanych danych i właściwego wyciągnięcia wniosków stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska mgra Grzegorza Skórzewskiego spełnia wszelkie warunki ustawowe stawiane pracom doktorskim, na podstawie ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity: Dz. U. z 2016, poz. 882 ze zm.), w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 ze zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgra Grzegorza Skórzewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę ważność tematu, jak i sposób jego opracowania wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Sebastian Hofman

dr hab. Sebastian Hofman, prof UJ