

dr hab. **Paweł Mackiewicz**, prof. nadzw. UWrul. F. Joliot-Curie 14a | 50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 63 03
pamac@smorfland.uni.wroc.pl

Wrocław 29.12.2016

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Emilii
Rabiniak pt. " *Analiza kopalnego DNA rodzajów Lepus i
Ochotona (Lagomorpha, Mammalia) z plejstocenu i
holocenu Europy Środkowej.*"**

Wnioskowanie o przeszłości wymarłych organizmów opiera się najczęściej na analizie morfologicznej ich szczątków kopalnych i śladów działalności życiowej tych organizmów, co jest przedmiotem badań paleontologii. Jednakże dzięki rozwojowi nowoczesnych technik molekularnych nieocenionym źródłem informacji na ich temat staje się coraz częściej kopalny DNA (ang. ancient DNA, aDNA). Analizy aDNA wykorzystywane są do odtwarzania powiązań filogenetycznych z uwzględnieniem gatunków wymarłych, badań zmienności i liczebności dawnych populacji, odtwarzania kierunków ich migracji, a nawet rekonstruowania dawnych cząsteczek białkowych i wnioskowania o fenotypie wymarłych organizmów. Tego typu analizy niejednokrotnie obaliły dotychczasowe klasyczne poglądy na temat relacji filogenetycznych wymarłych gatunków i zmieniły ich pozycje taksonomiczne. Dla wielu gatunków żyjących w przeszłości wciąż nie otrzymano sekwencji kopalnego DNA i nie skonfrontowano klasycznych badań paleontologicznych z analizami genetycznymi.

Jednymi z takich organizmów, występujących stosunkowo licznie w stanie kopalnym są zającokształtne (Lagomorpha). Do nierozwiązanych i kontrowersyjnych kwestii należy pozycja taksonomiczna i filogenetyczna wymarłych form plejstocenijskich zaliczanych do gatunku *Lepus tanaiticus* oraz *Ochotona spelaea*. Dlatego przedmiotem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej Pani mgr Emilii Rabiniak stało się ambitne przedsięwzięcie uzyskania sekwencji kopalnego DNA z fosylnych i subfosylnych szczątków zaliczonych do

rodzaju *Lepus* oraz *Ochotona*, a następnie wykonanie analiz filogenetycznych, aby określić pozycję taksonomiczną i relacje filogenetyczne osobników, z których wyizolowano sekwencje.

Przedmiotem analiz było 8 szczątków opisanych pod nazwą *Lepus* z plejstoceńskich i holocceńskich stanowisk z Ukrainy oraz 20 plejstoceńskich i holocceńskich szczątków zaliczonych do rodzaju *Ochotona* ze stanowisk położonych w Europie Zachodniej, Środkowej i Wschodniej. Ostatecznie, sekwencje mitochondrialnego regionu kontrolnego udało się uzyskać dla 7 osobników z rodzaju *Lepus*, a cytochromu b dla 4 osobników *Lepus* i 20 *Ochotona*. Analizy szczątków *Lepus* wykazały ich bliskie relacje z gatunkiem *Lepus timidus*, jednak nie wykluczyły możliwości przynależności form plejstoceńskich (w tym *Lepus tanaiticus*) do odrębnej jednostki taksonomicznej. Z kolei analizy sekwencji prób z rodzaju *Ochotona* pokazały ich bliskie podobieństwo do sekwencji gatunku *Ochotona pusilla*. Z tym współczesnym gatunkiem pogrupowały się także sekwencje pochodzące ze szczątków opisanych pod nazwą *Ochotona spelaea*, co sugeruje, że nie powinny być one traktowane jak osobny gatunek mimo pewnych różnic morfologicznych.

Recenzowana praca ma typowy układ i obejmuje: abstrakt w języku angielskim, Wstęp z celami pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję z wnioskami, Literaturę oraz trzy załączniki. W związku z tym, że w analizach uwzględniono również szczątki pochodzące ze stanowisk wschodnioeuropejskich w tytule można było uwzględnić, że badane rodzaje pochodziły z plejstocenu i holocenu Europy Środkowej i Wschodniej. Sądzę, że przydałoby się również streszczenie po polsku. Jednak angielski abstrakt jest jasno napisany i zawiera najważniejsze wyniki uzyskane w pracy.

Wstęp jest dosyć przejrzysty i wystarczający do wprowadzenia czytelnika do omawianych zagadnień oraz uzasadnienia tez pracy doktorskiej. Należy podkreślić wieloaspektowość poruszanych problemów. Przedstawiono w nim trzy główne zagadnienia: dotyczące kopalnego DNA, strefy peryglacjalnej oraz charakterystyki rzędu zająkocształnych i relacji filogenetycznych ich przedstawicieli.

Mimo wielu zróżnicowanych źródeł, doktorantka umiejętnie wybrała i opisała najważniejsze zagadnienia wiążące się z kopalnym DNA, jak: definicja, historia

badań, przykłady analiz, problemy izolacji i zachowanie oraz praktyczne wskazówki jak unikać niepowodzeń w jego izolacji. Jednakże podając na str. 8, że DNA może zostać wyizolowany ze skamieniałości znacznie starszych liczących 700 000 lat można było podać wiek jeszcze starszych izolacji dotychczas znanych z Grenlandii liczących do 900 000 lat, co doktorantka podaje na stronie 11. Przy opisie wpływu różnych czynników na stan zachowania aDNA na str. 8 dobrze byłoby podać dokładniej, jakie wartości lub jaki wpływ ma pH i mikroklimat, nie ograniczając się tylko do ogólnego stwierdzenia, że „Odpowiednie pH podłoża także jest czynnikiem istotnym” oraz „Niekiedy mikroklimat jaskiń wapiennych wpływa na stan zachowywania materiału genetycznego”. Zamiast zdania „DNA zachowuje się dzięki obecności szkliwa” lepiej było napisać „DNA zachowuje się łatwiej w zębach dzięki ochronnej warstwie szkliwa i dużej mineralizacji tkanek zęba.” Na str. 10 nie rozumiem wpisu „moa- pierwszy kompletny mitochondrialny fragment DNA wymarłego gatunku (Cooper et al., 2001)”, przecież przed 2001 rokiem znane były fragmenty DNA wymarłych gatunków, np. mamuta i niedźwiedzia jaskiniowego.

Część dotycząca strefy perglacjalnej jest również opisana wyczerpująco, chociaż według mnie mogła zostać skrócona, ponieważ zdarzają się powtórzenia dotyczące szczególnie unikalności fauny i flory. Celem tego rozdziału jest pokazanie wpływu strefy peryglacjalnej na zróżnicowanie i specyfikę organizmów żyjących w tej strefie. Na str. 17 dobrze było zamieścić bardziej aktualny podział zlodowaceń i plejstocenu, ponieważ na jednym z rysunków pojawia się nazwa Związku Radzieckiego (USSR). Na str. 18 podane jest, że peryglacjał wiązany jest ze zmianami klimatycznymi oraz procesami kopalnymi. Jaki procesy kopalne ma tutaj doktorantka na myśli? Podając nazwy zlodowaceń Würm lub Wałdaj można było uściślić, że pierwszy termin odnosi się do północnej i środkowej Europy, a drugi do wschodniej Europy. Podając na str. 20 wykaz gatunków ze strefy peryglacjalnej można było podać nieco więcej przykładów drobnych ssaków (gryzoni i ryjówek). Na str. 22 podano, że na temperaturę oraz wilgotność strefy peryglacjalnej wpływ miały procesy lodowcowe (interglacjały, interstadiały). Do tego należałoby dodać jeszcze glacjały i stadiały. Na str. 27 jako czynniki powodujące zniknięcie ekosystemów strefy peryglacjalnej lepiej było podać czynniki klimatyczne opisane nieco niżej. Wymieranie, migracja i

transformacja taksonów to raczej konsekwencje i zjawiska towarzyszące niż czynniki.

Rozdział „Charakterystyka rzędu Lagomorpha” jest kompleksowym opisem aktualnych poglądów na ewolucję, taksonomię i filogenezę tych ssaków. Doktorantka umiejętnie powiązała w nim zarówno dane paleontologiczne i molekularne skupiając się na rodzajach *Lepus* i *Ochotona* będących przedmiotem pracy doktorskiej. Słusznie wyeksponowano problem introgresji mitochondrialnego DNA w obrębie rodzaju *Lepus*. Jednakże dobrze by było tuż przy nazwach łacińskich podać nazwy polskie, a omawiane relacje filogenetyczne przedstawić w formie schematycznych drzew. Na str. 31 podano, że Lagomorpha są filogenetycznie związane z grupą Mixodontia. Ponieważ pozycja Mixodontia nie jest do końca ustalona i niektórzy zakładają, że Mixodontia są bliższe gryzoniom (Rodentia) tworząc grupę Simplicidentata, lepiej byłoby napisać, że Lagomorpha są związane z takimi wymarłymi rodzajami z paleogenu jak *Mimotona*, *Mimolagus* i *Gomphos* lub ogólnie Mimotonida. Na str. 37 podano, że holotyp *Lepus tanaiticus* znajduje się w kolekcji Zoologicznego Instytutu ZSRR. Dobrze by było uaktualnić nazwę tej instytucji. Na Ryc. 1.6 i 1.7 są pokazane tylko czaszki *Ochotona spelaea*. Dobrze by było pokazać dla porównania również czaszki *Ochotona pusilla*.

Cele z hipotezą badawczą są jasno sformułowane i wszystkie zostały zrealizowane w ramach pracy doktorskiej. W rozdziale Materiały i Metody rzeczowo i szczegółowo scharakteryzowano próby badawcze, izolację DNA oraz analizę bionformatyczną. Nie mam zastrzeżeń do przeprowadzonych analiz, które zostały przeprowadzone rzetelnie zwłaszcza w przypadku izolacji i amplifikacji aDNA. Na uwagę zasługuje fakt, że doktorantka zdecydowała się przetestować pięć metod izolacji DNA. Dwie z nich okazały się skuteczne. W związku z tym mam pytanie: Czy doktorantka ma jakieś wytłumaczenie, z czym może być związana skuteczność stosowanych metod? Nie jest dla mnie jasne, na jakiej zasadzie został oszacowany wiek szczątków dla wszystkich stanowisk. Dla niektórych było to datowanie stratygraficzne. Czy takie samo dotyczyło innych stanowisk? Czy podany wiek to lata temu czy p.n.e.? Zdjęcia okazów są wykonane w opakowaniach. Domyślam się, że wynika to ze zminimalizowania niebezpieczeństwa zanieczyszczenia okazów współczesnym DNA. Chciałbym się dowiedzieć jak duże różnice między sekwencjami uzyskano z niezależnych

powtórzeń amplifikacji zanim uzyskano sekwencję konsensusową oraz jaka była długość przyrównania przed i po przycięciu. Taka informacja powinna być podana w metodach.

Rozdział z wynikami jest opisany w sposób zrozumiały i logiczny. Właściwie zinterpretowano uzyskane drzewa filogenetyczne i sieci haplotypów. Mimo, że nie wszystkie klady uzyskały duże wsparcie i nie wszystkie powiązania były dobrze rozwiązane analizy dostarczyły interesujących wyników. W przypadku sekwencji *Lepus* najlepiej rozwiązane drzewo uzyskano dla regionu kontrolnego, z którego wynika, że próbki zajęcy plejstocenijskich grupują się z gatunkiem *Lepus timidus*. Pięć z nich łącznie z *Lepus timidus tanaiticus* należy do osobnych linii wcześniej oddzielonych i niepowiązanych bezpośrednio z innymi sekwencjami. Drzewo oparte na sekwencjach cytochromu b i przedstawicieli *Ochotona* jest lepiej rozwiązane, a sekwencje plejstocenijskie łączą się z kładem *Ochotona pusilla*. Jedna z sekwencji z Ukrainy jest wyraźnie dywergentna, oddziela się od pozostałych i umieszcza się u podstawy całego kladu o istotnym wsparciu. Legendy do rysunków z drzewami filogenetycznymi powinny być pod nimi, a nie na następnej stronie. Łatwiej interpretowałoby się drzewa i sieci haplotypów, gdyby przy nowo uzyskanych próbach była informacja nie tylko o numerze próby, ale również o stanowisku, wieku oraz przypuszczalnej przynależności gatunkowej. Wartości wsparcia przy węzłach podane są jako wartości ułamkowe. Pierwsza z tych wartości odnosi się do prawdopodobieństwa *a posteriori* uzyskanego w programie MrBayes, natomiast druga powinna oznaczać wartości bootstrap przedstawiane z reguły w formie procentów. Czy w związku z tym procenty zostały zamienione na frakcje? Niektóre klady mają oznaczenia -/-, co oznacza, że nie uzyskały one wsparć > 0.5 lub 50%. Niektóre klady nie mają żadnych oznaczeń. Czy to oznacza, że też nie mają takich istotnych wsparć? Podane wartości wsparć 1/1 na str. 80 i 84 nie odnoszą się do tych węzłów, co podano, ale dotyczą one rozdziałów względem grupy zewnętrznej.

W rozdziale Dyskusja i wnioski doktorantka rzetelnie przedyskutowała najważniejsze osiągnięcia w swojej pracy dotyczące powiązań filogenetycznych w obrębie rodzaju *Lepus* i *Ochotona* porównując je z wynikami innych autorów. Dobrze przeprowadzona dyskusja wyników i właściwie wyciągnięte wnioski świadczą o dużej dojrzałości naukowej doktorantki i umiejętności wydobywania najważniejszych informacji z uzyskanych wyników. Za każdym razem

doktorantka krytycznie i obiektywnie podeszła do interpretowania wyników. W dyskusji uwzględniła powszechne zjawiska introgresji i hybrydyzacji u *Lepus*. Zinterpretowała, że części osobników plejstocenijskich z Ukrainy przypisanych do rodzaju *Lepus* może należeć do odrębnego taksonu (np. podgatunku). Jej wyniki wykazały również odrębność gatunków *Lepus othus* i *Lepus arcticus* od *Lepus timidus*. Natomiast w przypadku plejstocenijskich form *Ochotona* doktorantka stwierdziła, że ich relacje filogenetyczne nie uprawniają do wyodrębnienia tych form w osobną jednostkę taksonomiczną (tj. gatunek *Ochotona spelaea*) i zaproponowała, aby zaliczyć je do *Ochotona pusilla*. Wskazuje na to również zmienność samych sekwencji w porównaniu do innych dobrze zdefiniowanych gatunków.

Wnioski są przedstawione zwięźle i rzeczowo oraz opisują najważniejsze osiągnięcia rozprawy. Zostały one właściwie sformułowane, co świadczy o zdolności syntetycznego myślenia i dojrzałości naukowej doktorantki. Można było je przedstawić jako osobny rozdział, a nie pod koniec dyskusji i wypunktować. Bibliografia zawiera 262 pozycje głównie anglojęzycznych, w tym najnowsze z poruszanej dziedziny.

Praca jest napisana poprawnym językiem i stylem, jednak dostrzegłem pewne błędy przedstawionych poniżej wraz z proponowanymi poprawkami: str. 7: „Kompleks czynników wpływu i czynników reakcji na wpływy” – należało podać jawnie te czynniki, „zmian geologo-klimatycznych” -> „zmian geologiczno-klimatycznych”; str. 8: „coraz trudniejszym” -> „coraz trudniejsze” lub „coraz trudniejszym przedsięwzięciem”; str. 9: „Historia kopalnego DNA” -> „Historia badań kopalnego DNA”, „Polimaerse” -> „Polymerase”; str. 10 i 11: neandertalczyk powinien być pisany z małej litery; str. 10: „zanalizowanie” -> „przeanalizowanie”, „genomowy DNA” -> „jądrowy DNA”; str. 11: „Cara” -> „cara”, „Człowiek z Flores” -> „człowiek z Flores”; str. 12: „homo” -> „Homo”; str. 12: „Problemy izolacji kopalnego DNA” -> „Problemy izolacji i stan zachowania kopalnego DNA”, „zwalczone” -> „likwidowane”; str. 13: „częstokroć” -> „często”, „cysteiny” -> „cytozyny”; str. 14: „BSA-bydło” -> „surowicza albumina wołowa BSA”, „współczesnym materiałem komórkowym” -> „współczesnym materiałem”; str. 15: „fosfodiestrowego” -> „fosfodiestrowego”; „deaminacja cytozyny → uracyl, adeniny → hypoksantyna” -> „deaminacja cytozyny do uracylu oraz adeniny do hypoksantyny”; str. 16: „rezultaty

otrzymuje" -> „rezultaty otrzymuje się”; str. 17: „Lindner& Marks” -> „Lindner & Marks”; str. 21: „odmiennych gatunków” -> „mieszanych gatunków”, „osobliwymi biocenozyami” -> „z osobliwymi biocenozyami”; str. 22: „terenów Europy (Rekovets” -> „terenów Europy. (Rekovets”; str. 23: „Formacje skalne” -> „Osady”, „o różnym stopniu rozkładu” -> „o różnym stopniu degradacji”, „przemieszcza się” -> „przemieszczająca się”; „populacje zamieszkałe strefę peryglacjalną posiadały podwyższony zasób informacji genetycznej” -> „populacje zamieszkujące strefę peryglacjalną charakteryzowały się większą różnorodnością genetyczną”; „Tafonomia stanowisk paleontologicznych bywa różnorodna” -> „Stanowiska paleontologiczne bywają różnorodne”, „chłodnego i jałowego klimatu” -> „chłodnego i surowego klimatu”; str. 24: „epoki Valdai” -> „okresu Wałdaj”; str. 25: „prymitywnych ludzi” -> „ludzi pierwotnych”; str. 26: „warunów” -> „warunków”; str. 27: „Charakterystyczne kierunki” -> „Charakterystyczne cechy”, „procesy formowania, stabilnego rozwoju oraz rozpadu ekosystemów najbardziej widoczne w centralnej części strefy-mechanizm reprezentujący najlepszy model funkcjonowania ekosystemów w naturze” – niejasne sformułowanie, „warunakmi” -> „warunkami”; str. 28: „powiązywane” -> „wiązane”; str. 29: „forma wymarła” -> „rodzina wymarła”; str. 31: „znany z okresu paleogenu” -> „znany od okresu paleogenu”; str. 31: „dynamikę biogeograficzną i stratygraficzną” -> „dynamikę biogeograficzną i zróżnicowanie stratygraficzne”; str. 32: „manofiletyczną” -> „monofiletyczną”, „przyczyniły się znacznego zwiększenie” -> „przyczyniły się do znacznego zwiększenia”; str. 33: „dane z pochodzące” -> „dane pochodzące”; „rozproszenia” -> „dyspersje”; str. 34: „skutkowały specjacja” -> „skutkowały specjacją”, „stanu systematycznego” -> „pozycji systematycznej”; str. 35: „Topologia cytochromu b” -> „Topologia drzewa opartego na cytochromie b”; str. 36: „Myotis” -> „Myotis”, „Jugosławia” -> „kraje dawnej Jugosławii”; str. 37: „Lepus timidus” -> „Lepus timidus”, „Europejska część ZSRR” -> „Europejska część Rosji”; str. 38: „subgatunków” -> „podgatunków”; str. 39: „molekulanych” -> „molekularnych”; str. 46: „forma przodkowa” -> „przodek”, „rozproszenia” -> „dyspersji”; str. 48: „Lagimys” -> „Lagomys”, „przednia część zęba” – napisać jakiego zęba; str. 51, 95: „na poziomie 10 000 lat” -> „około 10 000 lat temu”; str. 52: „wymarłych grup tych rodzajów” -> „wymarłych przedstawicieli tych rodzajów”; str. 54: „Wiek pokładów skalnych” -> „Wiek osadów”; str. 54: „Wiek pokładów skalnych pozostałych stanowisk mieści się w czasie od 20 tys. lat do

roku 1986 (współczesna próba *Ochotona pusilla*).” -> „Wiek próbek mieści się w czasie od 20 tys. lat do roku 1986 (współczesna próba *Ochotona pusilla*).”; str. 55 i 56: „Miejsce wydobycia okazu” -> „Region/kraj”; str. 64: „ok” -> „ok.”; str. 70: „litery w kodonie/kodonach” -> „pozycji w kodonie/kodonach”, „robotów” -> „analiz”, „Drzewa były próbkowane co setną generację przez 20 000 000 generacji (z wykorzystaniem 25% wartości burn-in). Analizę zakończono, gdy odchylenie standardowe dla średnich wartości logarytmu prawdopodobieństwa obu robotów ustabilizowało się na poziomie poniżej 0,01 dla wszystkich drzew użytych do stworzenia finalnego drzewa.” -> „Drzewa były próbkowane co setną generację przez 20 000 000 generacji. Pominięto 25% pierwszych drzew w konstruowaniu ostatecznego drzewa. Analizę zakończono, gdy odchylenie standardowe częstości rozdziałów na drzewie ustabilizowało się na poziomie poniżej 0,01 dla wszystkich drzew użytych do stworzenia finalnego drzewa.”; str. 71” „motod”->”metody”; str. 74: „Bularia” -> „Bulgaria”; str. 76: „co, z” -> „co z”; str. 85: „Korelacja w rejonie tej grupy jest potwierdzona” -> „Powiązania w tej grupie są potwierdzone”; str. 89: „z uwagi na: (i)” -> „z uwagi na”; str. 94: „Powyższe analiza” -> „Powyższa analiza”, „pokłady” -> „osady”; str. 96: „korelacje” -> „powiązania”; str. 98: „gatunku pradawnego” -> „stosunkowo wcześnie wyodrębnionego”.

Stwierdzone przeze mnie zastrzeżenia nie rzutują jednak na bardzo pozytywną ocenę pracy, a przedstawione powyżej uwagi nie zmniejszają wartości ocenianej rozprawy. Reasumując chciałbym stwierdzić, że recenzowana praca stanowi istotny wkład w wyjaśnienie pozycji taksonomicznej i relacji filogenetycznej plejstocenijskich przedstawicieli *Lepus* i *Ochotona* stosując nietrudne analizy kopalnego DNA. Należy podkreślić, że dotychczas znanych było tylko pięć sekwencji aDNA dla zajęczaków *Lepus timidus-tanaiticus*. W przeciwieństwie do dotychczasowych analiz w rozprawie zbadano próby z typowych wschodnioeuropejskich stanowisk peryglacialnych dla *Lepus tanaiticus*. Przeprowadzone badania były bardzo zasadne, ponieważ istnieje potrzeba skonfrontowania badań paleontologicznych z nowymi analizami genetycznymi dla próbek kopalnych. Należy podkreślić, że analizy zostały przeprowadzone rzetelnie i podejmują interesujące wątki badawcze. W związku z tym, że doktorantka postawiła sobie trudny cel badawczy i go rozwiązała proponuję wyróżnić rozprawę.

Uważam, więc, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy o Stopniach Naukowych. Zgłaszam, zatem wniosek do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o uznanie rozprawy Pani mgra Emilii Rabiniak za odpowiadającej wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Paweł Mackiewicz

