

RECENZJA
Rozprawy doktorskiej mgr Emilii Rabinia
pt. „Analiza kopalnego DNA rodzajów *Lepus* i *Ochotona* (Lagomorpha, Mammalia) z plejstocenu i holocenu Europy Środkowej”

Wstęp

Przedstawiona do oceny praca wpisuje się w badania problematyki pochodzenia i formowania się współczesnej fauny nie tylko w oparciu o dane paleontologiczne, ale również wyniki uzyskane w efekcie stosowania nowych technik badawczych. Co zrozumiałe, paleontolodzy skupiają się na analizowaniu cech morfologicznych, które dostarczają, przy wszystkich znanych ograniczeniach metodycznych, rzetelnej wiedzy o pochodzeniu i ewolucji różnych grup roślin, zwierząt oraz człowieka. Badanie szczątków kopalnych pochodzących z najmłodszego okresu historii dziejów Ziemi, czyli późnego plejstocenu, stwarza jednak dodatkowe możliwości zastosowania technik, którymi posługuje się powszechnie współczesna biologia. Chodzi oczywiście o technikę PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), która zrewolucjonizowała genetykę molekularną, umożliwiając otrzymywanie dużej liczby kopii fragmentów DNA, również z materiału kopalnego. Dzięki badaniom aDNA (ang. *ancient DNA*), stało się możliwe nie tylko odtworzenie pokrewieństw pomiędzy wymarłymi i współczesnymi gatunkami i populacjami, ale również śledzenie dróg migracji w przeszłości i rozwoju linii ewolucyjnych różnych taksonów. Badania te mają zatem duże znaczenie poznawcze i tak teraz modny walor innowacyjności.

Doktorantka podjęła się analiz kopalnego DNA dwóch rodzajów zajęczaków (Lagomorpha): zająca (*Lepus*) i szczekuszki (*Ochotona*) z późnoplejstocenijskich i holocenijskich osadów w Europie. Przesłanką do podjęcia tego wyzwania był ciągle niejednoznaczny status taksonomiczny kopalnego zająca *Lepus tanaicus* oraz kopalnej szczekuszki *Ochotona spelaea*, a także wyjaśnienie pokrewieństw pomiędzy tymi wymarłymi taksonami, a ich współczesnymi odpowiednikami. Jak sama autorka pisze w ostatnich latach wykorzystywanie do badań paleontologicznych danych uzyskanych z analizy aDNA, stało się nie tyle ciekawym dodatkiem do tych badań, ile niezbędnym wymogiem uzupełniającym wiedzę paleontologiczną.

Uwagi formalne

Przedłożona do recenzji praca doktorska jest podzielona na 5 części, w tym spis literatury oraz 3 załączniki. Pierwsze 4 rozdziały zawierają tekst, 20 rycin, 8 fotografii i 2 tabele, a całość rozprawy liczy 124 strony. Praca ma typowy układ i jest napisana na ogół poprawnym językiem, zawiera wszystkie niezbędne części, które powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej. Tytuł pracy jest nieco mylący ponieważ doktorantka badała

materiał z Ukrainy, która leży we wschodniej Europie. Cytowana literatura jest wyjątkowo obfita, obejmuje 262 pozycje. Niestety nie wszystkie prace znajdujące się w spisie literatury są cytowane w tekście. Odnalazłem, aż 17 takich przypadków np. Alletoft et al. (2012), Averianov (2001), Bogdanowicz i in. (2012), Briggs i in. (2010), Campos i in. (2012), Erbajeva i in. (2001), Guindon i in. (2010), Peters i in. (2007), Pruvost i in. (2006), Rizzi i in. (2012), Rompler i in. (2006), Shapiro i Hofreiter (2014) i in. Stwierdziłem też odwrotną sytuację, kiedy pozycje cytowane w tekście nie znalazły się w spisie literatury, np. Lindner i Marks (1994), Nadachowski (1989), Ovchinnikov i in. (2000), Smith i in. (2005). Ponadto w kilku przypadkach pomyłone są lata wydania publikacji w tekście i w wykazie literatury.

Uwagi merytoryczne i komentarze do wyników

„Wstęp” rozprawy jest bardzo rozbudowany i podzielony na 5 podrozdziałów (53 strony). W tej części znalazł się cały przegląd literatury paleontologicznej i historia rozwoju badań nad kopalnym DNA, a więc znacznie więcej niż inni autorzy umieszczają we wstępie. Tłumaczę to chęcią podkreślenia przez doktorantkę faktu, że jej praca leży na pograniczu dwóch wielkich działów biologii: paleozoologii i biologii molekularnej. Jest to dla mnie wystarczające wyjaśnienie tej dość nietypowej sytuacji. „Wstęp” rozpoczyna się próbą przedstawienia problemu badawczego na jednej stronie maszynopisu. Niestety ten krótki tekst nie jest najlepiej napisany, zawiera albo oczywiste sformułowania, albo użyte słowa i frazy są niezgrabne lub wręcz niezrozumiałe np. „dynamika zmian geologicznych” lub „poziom ewolucyjny bioty końca plejstocenu” (zapewne chodzi o „biom”) i kilka innych. Ta jedna strona jakby nie pasuje do całej pracy i nie spełnia swojej roli. Jako przykład zbyt szczegółowego potraktowania niektórych zagadnień niech posłuży podrozdział poświęcony opisowi i charakterystyce tak zwanej „strefy peryglacjalnej”. Termin ten, co ciekawe, został wprowadzony do światowej literatury przez Polaka – Łozińskiego w 1909 roku – i jest nadal stosowany. Obecnie pod tym pojęciem rozumiemy pas łądu leżący dookoła czaszy lodowca lub łądolodu, w plejstocenie o szerokości nawet kilkuset kilometrów, charakteryzujący się szeregiem zjawisk kriogenicznych związanych z wieloletnią zmarzliną. W tej specyficznej strefie, która w ostatnim zlodowaceniu obejmowała dużą część północnej, środkowej i wschodniej Europy po zachodnią Syberię, ukształtowała się specyficzna flora i fauna. Biocenoza ta nie przetrwała do współczesności. W skład zespołu fauny strefy peryglacjalnej wchodziły również, dwa gatunki zajęczaków badane przez panią Emilię Rabinia, czasami traktowane przez paleontologów jako odrębne gatunki *Lepus tanaiticus* i *Ochotona spelaea*. Doktorantka w wyczerpujący i kompetentny sposób opisała cechy tego ekosystemu, jego zróżnicowanie i omówiła najważniejsze gatunki ssaków które wchodziły w skład tej biocenozy. Czytając ten fragment rozprawy odniosłem jednak wrażenie, że

jest on zbyt rozbudowany, w niektórych miejscach nasycony szczegółami, które nie wiążą się bezpośrednio z tematem pracy doktorskiej. Pani Emilia Rabiniak w umiejętny sposób przedstawia pochodzenie *Lepus* i *Ochotona* oraz ich dalszą ewolucję korzystając z publikowanych danych morfologicznych i molekularnych. Szczegółowo dyskutuje poglądy przedstawiane w różnych pracach i konfrontuje wyniki uzyskane odmiennymi metodami przez różne grupy badawcze. Po przeczytaniu tej części pracy nie mam wątpliwości, że doktorantka uzbroiła się w odpowiedni zasób wiedzy na temat statusu taksonomicznego wymarłych i współczesnych przedstawicieli obu rodzajów i była świadoma problemów które należało rozwiązać w rozprawie.

Wyniki badań (opisane na 16 stronach) zostały przedstawione dla obu analizowanych rodzajów w postaci drzew filogenetycznych Cytochromu b i regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA. Należy podkreślić, że topologia wszystkich drzew u *Lepus* i *Ochotona* była podobna niezależnie od zastosowanej metody. Ich opis nie budzi wątpliwości, jest szczegółowy i wyczerpujący. W celu uzyskania dłuższej sekwencji mtDNA badanych osobników doktorantka połączyła sekwencje kodujące fragmentu Cytochromu b oraz regionu kontrolnego i porównała je z sekwencjami współczesnych, północnych gatunków zajęcy: *Lepus timidus*, *L. othus* i *L. arcticus*, a jako grupę zewnętrzną wykorzystała *Lepus europaeus*. Na podstawie sieci haplotypów autorka stwierdziła jednoznacznie, że badane osobniki plejstoceńskich zajęcy są najbliżej spokrewnione z *Lepus timidus*, a nie z *Lepus othus* czy *Lepus arcticus*. Drzewo filogenetyczne rodzaju *Ochotona* podzieliło się na dwa bardzo odrębne kłady: pierwszy obejmujący współczesne gatunki azjatyckie i północnoamerykańskie i drugi obejmujący współczesne i kopalne osobniki gatunku *Ochotona pusilla*. Poziom istotności różnic jest wysoki i tym samym wiarygodny, co pozwoliło doktorantce na wyciągnięcie dobrze popartego wniosku, że kopalne osobniki należą do współczesnego gatunku szczekuszki malutkiej (*Ochotona pusilla*).

Dyskusja i wnioski wypływające z badań doktorantka przedstawiła na 11 stronach. Systematyka przedstawicieli współczesnego rodzaju *Lepus* jest ciągle kontrowersyjna i nastrocza wiele problemów. Sytuacja ta wynika przede wszystkim ze zjawisk hybrydyzacji międzygatunkowej i introgresji co skutkuje dużą wewnątrzgatunkową zmiennością morfologiczną i genetyczną, szczególnie gatunków szeroko rozprzestrzenionych. Wysoki stopień przepływu genów mtDNA pomiędzy europejskimi gatunkami *Lepus* może nawet dawać przesłanki do połączenia haplogrup w jeden gatunek. Spośród współczesnych północnych gatunków *Lepus* dotyczy to przede wszystkim *L. timidus*, który na drzewie filogenetycznym nie tworzy osobnego kładu, tylko sekwencje badanych osobników są rozproszone w obrębie całego drzewa. Swoje wyniki autorka dyskutuje przede wszystkim z pracą Prost i in. (2010), w której autorzy badający materiał kopalny *L. tanaicus* z północnego Uralu doszli do wniosku, że należy on do *L.*

timidus. W omawianej pracy doktorskiej chodziło o sprawdzenie czy populacje *L. tanaiticus* z obszaru występowania typowych populacji tego taksonu we wschodniej Ukrainie i południowej Rosji, również należą do *L. timidus*. Przeprowadzone przez p. Emilię Rabiniak badania potwierdziły w zasadzie to co uzyskali wcześniej Prost i in. (2010). Z drugiej strony większość badanych okazów utworzyła grupę monofiletyczną co może zdaniem autorki sugerować pewną odmienność taksonomiczną np. podgatunkową. Doktoranta jest jedna bardzo ostrożna w formułowaniu bardziej zdecydowanych wniosków w tej kwestii i sugeruje w przyszłości konieczność zbadania dłuższych sekwencji mtDNA lub markerów jądrowych w celu rozstrzygnięcia problemu. Uważam, że jest to prawidłowe podejście, tym bardziej, że *Lepus timidus* wykazuje wyjątkowo dużą zmienność genetyczną, a opowiedzenie się za odrębnością formy kopalnej jest w oparciu o uzyskane wyniki nieuzasadnione.

Szczekuszki (rodzaj *Ochotona*) wykazują wysoką wewnątrzgatunkową zmienność morfologiczną przy jednocześnie stosunkowo niskim zróżnicowaniu międzygatunkowym. Powoduje to trudności w rozróżnianiu gatunków w stanie kopalnym. Na szczęście tempo zmian sekwencji mtDNA (Cytochromu b) jest na tyle wysokie, że stanowi odpowiedni wskaźnik, który może być wykorzystany w badaniach ewolucyjnych i systematycznych. Doktorantka po przebadaniu 20 okazów kopalnych określanych jako *O. pusilla* lub *O. spelaea* uzyskała cztery haplotypy, które są powiązane z przedstawicielami gatunku *Ochotona pusilla*. Potwierdza to z jednej strony dotychczasowe opinie większości paleontologów, którzy określali szczątki kopalne z Europy jako *O. pusilla*, a z drugiej oddala przesłanki morfologiczne innych paleontologów, zakładające odrębność taksonomiczną kopalnych osobników z Europy. Nie mam wątpliwości, że wyniki pracy doktorskiej jednoznacznie wskazują, że kład utworzony przez analizowane osobniki kopalne oraz współczesne jest wyraźnie wyodrębniony w stosunku do innych porównywanych gatunków. Tym samym w późnym plejstocenie Europę zasiedlał jeden gatunek szczekuszki *Ochotona pusilla*.

Uwagi krytyczne

Jedynym, mankamentem pracy jest moim zdaniem pewna dysproporcja pomiędzy częścią wstępną i metodyczną rozprawy, a wynikami i dyskusją. Autorka poświęciła chyba zbyt dużo miejsca na wprowadzenie czytelnika w różne szczegółowe zagadnienia co zdaje się wynikać z chęci „udowodnienia” opanowania rozległej i ze swojej natury odmiennej wiedzy paleontologicznej i genetycznej. Części wstępne, opisowe i wprowadzające zajmują (nie licząc literatury) ok. 70% tekstu, a wyniki i dyskusja jedynie 30% tekstu. W większości prac doktorskich te proporcje są odwrócone. Ze względu na takie proporcje i ułożenie tekstu praca jest czasami trudna w odbiorze. Strona formalna

rozprawy też pozostawia sporo do życzenia np. jeśli chodzi o zgodność publikacji cytowanych w tekście z tymi znajdującymi się w spisie literatury.

Mocne strony rozprawy

Praca doktorska powstała niewątpliwie dużym nakładem pracy i wymagała od autorki wiele wysiłku oraz opanowania podstaw metodycznych i wiedzy z zakresu paleontologii i biologii molekularnej. Cenne z naukowego punktu widzenia jest potwierdzenie, że mieszkaniac peryglacjalnego środowiska w Europie jakim był *Lepus tanaiticus* należy, w oparciu o analizy genetyczne, zaliczyć do *Lepus timidus*. Równie ważne są badania paleogenetyczne szczekuszek. Pani Natalia Rabiniak zbadała sekwencje 20 osobników kopalnych *Ochotona* w Europie z okresu ostatnich 20 tysięcy lat. Nigdy wcześniej materiał z rodzaju *Ochotona* nie był opracowany pod kontem badań mtDNA. Jest to pierwsza taka analiza w światowej literaturze. Do najważniejszych osiągnięć tej pracy należy również ostateczne ustalenie, że w późnym plejstocenie w Europie występował jeden gatunek szczekuszki *Ochotona pusilla*, co kończy spory paleontologów o jej status taksonomiczny. Warto również podkreślić innowacyjność rozprawy, która manifestuje się śmiałym połączeniem wiedzy i narzędzi badawczych stosowanych przez paleontologów i biologów molekularnych. Takie podejście zaowocowało zrealizowaniem postawionego celu rozprawy doktorskiej jakim jest uzyskanie nowego, znaczącego wyniku badawczego.

Konkluzja

Jak każda, również recenzowana praca doktorska posiada pewne niedociągnięcia, ale postawione cele rozprawy zostały zrealizowane. W moim odczuciu zauważone uchybienia (głównie natury formalnej) tylko w niewielkim stopniu obniżają jej poziom i wartość. Mam nadzieję, że zostaną one uwzględnione w trakcie przygotowania maszynopisu do druku.

Uważam, że przedstawiona praca w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie pani mgr Emilii Rabiniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

