

21.04.2023, Wrocław

Prof. dr hab. Leonid Rekovets  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Żeromskiej  
pt.  
Wykorzystanie analiz kopalnego DNA (aDNA) do rekonstrukcji filogenezy  
i ewolucji populacji nornika północnego (*Alexandromys oeconomus*)**

Rozprawa doktorska pani mgr Aleksandry Żeromskiej powstała na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorami byli prof. dr hab. Paweł Mackiewicz z Zakładu Bioinformatyki i Genomiki Uniwersytetu Wrocławskiego i prof. dr hab. Adam Nadachowski z Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie.

Formalne aspekty rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska ma tradycyjną formę i została przedstawiona jako manuskrypt na 155 stronach. W tej objętości tekstu mieszczą się ryciny i tabele, a także lista cytowanej literatury na 11 stronach oraz Suplement obejmujący na 37 stronach między innymi wykazy analizowanych sekwencji, drzewa filogenetyczne oraz spis ilustracji i tabel oraz krótkie podsumowanie dorobku naukowego autorki pracy. Tekst w języku polskim jest napisany poprawnie, zrozumiale, a kolejność poszczególnych rozdziałów ułożona jest zgodnie ze streszczeniem z tradycyjnym ich podziałem na wstęp, materiały i metody, wyniki ze statystycznym i analitycznym ich opracowaniem oraz dyskusję i wnioski. Już na początku chciałbym podkreślić, że rozprawa nawet przy wstępnym przeglądzie, robi wrażenie solidnej pracy naukowej opartej na wykorzystaniu nowoczesnych metod - analiz DNA. To pozwala na uzupełnienie wniosków ewolucyjnych budowanych dotychczas w dużej mierze w oparciu o materiał kopalny, a także na nowe spojrzenie na procesy ewolucyjne, zagadnienia adaptacyjne i zmienności gatunkowej. Zapoznanie się ze streszczeniami w językach polskim i angielskim daje możliwość szybkiego zorientowania się co jest istotą pracy, nawet niedoświadczonemu specjalście.

Ocena wartości naukowej rozprawy

Historia i ewolucja przedstawicieli rodzaju *Microtus* (*s.l.*) i filogenetycznie bliskich jemu form jest stosunkowo dobrze poznana, chociaż wiele zagadnień, wymaga dalszych badań, szczególnie przy pomocy nowoczesnych metod, takich jak analizy DNA, które należy przeprowadzać na współczesnych i wymarłych osobnikach. Na etapie aktualnego poznania nornikowatych (Arvicolinae) różni autorzy dokonują istotnych zmian w taksonomii, systematyce i filogenezie taksonów należących do tej grupy gryzoni (na przykład: *Microtus* – *Alexandromys*, *Stenocranius* – *Lasiopodomys*, *Clethrionomys* – *Myodes*, *Microtus* grupy *arvalis* i in.). Nornikowate opanowały północne kontynenty na Ziemi (Palearktykę i Nearktykę) o czym świadczy historia ich powstawania, dynamika ekspansji i związane z tym zmiany arealów oraz przemiany taksonów w czasie geologicznym. Ich ewolucja, podobnie jak innych grup ssaków, odbywała się na tle wydarzeń geologicznych w ścisłym powiązaniu z warunkami środowiskowymi i stale działającymi procesami adaptacji do zmieniających się warunków życia. Ewolucja nornikowatych (Arvicolinae) jest dobrym przykładem obrazującym zasadę twierdzeń sformułowanych przez Kowalewskiego – czyli powiązania morfologii, funkcji i środowiska. Bez wątplenia ta zasada ewolucyjna posłużyła Doktorantce za teoretyczną podstawę do realizacji planu badań.

W pierwszym rozdziale pracy (**Wstęp**) Autorka podaje charakterystykę, zastosowanie i znaczenie badań antycznego DNA oraz powiązanie zmienności genetycznej z wahaniami klimatycznymi w plejstocenie, co miało istotny wpływ na stan i przemiany populacji nornika północnego (*Alexandromys oeconomicus*). Podana jest również systematyka, areal i rozmieszczenie w czasie tego gatunku gryzonia. W miarę szczegółowo przeanalizowano historię powstawania gatunku w czasie geologicznym, która jest oparta na badaniu morfologii zębów w materiałach kopalnych. Ważne są rozważania Autorki o początkach oddzielenia linii *Alexandromys*, najprawdopodobniej od rodzaju *Allophaiomys*, w kontekście datowania osadów, w których znaleziono szczątki najstarszych *Alexandromys*, co będzie szczegółowo dyskutowane w kolejnych rozdziałach rozprawy.

Eksperymentalna część pracy oparta jest na materiale kopalnym i współczesnym dokładnie opisanym i scharakteryzowanym w tabelach, łącznie z datowaniem radiowęglowym (rozdział **Materiały i Metody**). Uważam, że Tabelę 1 o stanowiskach kopalnych warto by było uzupełnić o kolumnę ze skalą MIS (*Marine Isotopic Stages*), w celu określenia wieku geologicznego stanowisk. Również warto byłoby podać jaki schemat stratygraficzny przyjęto w pracy i zacytować odpowiednią publikację.

Dalej Autorka podkreśla, że w badaniach były wykorzystane dane z analiz mitogenomów i cytochromu b zarówno form wymarłych jak i populacji współczesnych z arealu występowania *Alexandromys oeconomicus*, a także dane z GEN Banku. Podano również szczegółowe informacje o ekstrakcji DNA, jego wzbogacaniu, sekwencjonowaniu, metodach analiz filogenetycznych, datowaniu molekularnym. Autorka podkreśla, że badania mitochondrialnego DNA (mtDNA) są obecnie najbardziej powszechnie stosowaną i docenianą metodą w badaniach filogenetycznych. O tym świadczy także to, że w określeniu celów pracy Autorka nie przewidziała połączenia danych uzyskanych w badaniach molekularnych z rezultatami badań morfologicznych. Chciałbym podkreślić, że takie podejście dominuje (niestety) obecnie, również w badaniach innych grup drobnych ssaków, co powinno się zmienić w miarę gromadzenia kolejnych danych. W moim przekonaniu o postępie w taksonomii i filogenezie metody morfologiczne nadal odgrywają decydującą rolę i pozostają najbardziej przekonujące w tej kwestii.

Rozdział **Wyniki** poświęcony jest omówieniu rezultatów uzyskanych przede wszystkim w oparciu o badania DNA, szczegółowej analizie danych molekularnych co pozwoliło na sformułowanie wniosków. Autorka dokładnie scharakteryzowała używane w pracy metody badań DNA, przeanalizowała różne aspekty wykorzystania otrzymanych danych w analizach filogenetycznych i pokazała problemy i rozbieżności w rekonstrukcji pokrewieństw pomiędzy różnymi liniami Arvicolini. Przyczyną takich rozbieżności w danych może być różne tempo powstawania mutacji, ale także używanie różnych metod przy opracowaniu wyników, jak podkreśla to Autorka.

Podstawowe rezultaty analiz zostały przedstawione na ryc. 11 jako uproszczona wersja konsensusowego drzewa uzyskanego w trzech programach opartych na sekwencjach cytochromu b. Najważniejszym i nowatorskim rezultatem w tych badaniach jest to, że zidentyfikowano 12 grup sekwencji i wydzielono 2 główne grupy filogenetyczne: azjatycko-amerykańską i europejską. Podział głównych grup na mniejsze omówiono i dokładnie przeanalizowano w pracy. Na podstawie wyników datowania molekularnego Autorka określiła najbardziej prawdopodobne czasy rozdzielenia się głównych linii i grup z uwzględnieniem wariantach z grupą zewnętrzną lub bez. Oprócz tego osobno przeanalizowała kalibracje i zbudowała chronogram na podstawie cytochromu b i dla sekwencji mitogenomów. Przy takim podejściu otrzymała różne cyfry kalibracyjne w tys. lat, co jest w pełni zrozumiałe. Moim zdaniem powody tej rozbieżności powinny być jednak w tekście rozprawy bardziej i dokładniej wyjaśnione.

W oparciu o najlepsze analizowane modele Doktorantka wskazała i dopasowała określone regiony geograficzne areálu gatunku do linii filogenetycznych i zrekonstruowała historię ich zasiedlenia. Takimi centrami zasiedlenia i różnicowania filogeograficznego były Środkowa i Zachodnia Azja, a dopiero później Europa, Fennoskandia i Ameryka Północna.

Czy dane te zgadzają się z danymi paleontologicznymi? Ogólnie – tak, ale paleontolodzy nie dysponują tak szczegółowymi danymi, chociaż mają podstawy do wskazania wielu regionalnych centrów powstawania tego gatunku w pierwszej połowie plejstocenu. W tym czasie (pierwsza połowa plejstocenu) w rodzaju *Allophaiomys*, który zajmował obszerny areał w Eurazji, powstała wielka różnorodność morfologiczna, którą można obecnie znaleźć również w linii *Alexandromys* w postaci morfotypów: *protoeconomus*, *ratticepoides*, *malei*, *hyperboreus*, *epiratticeps*, *eotheomys* i innych. Wśród współczesnych form w Centralnej Azji morfologicznie bliskie gatunki znajdziemy na przykład w rodzajach *Phaiomys* i *Neodon*, które zachowały prymitywne cechy dawnych *Allophaiomys*.

Na pierwszy rzut oka morfologicznie *Alexandromys* to konserwatywna linia filogenetyczna, ale tak naprawdę ma ona szeroki zakres zmienności morfologicznej zarówno w różnych częściach areálu jak i w czasie geologicznym. Do pewnego stopnia dane morfologiczne *Alexandromys* potwierdzają ustalenia Autorki oparte o zmienność kopalnego DNA, ale korelacja obu typów informacji wymaga dodatkowych analiz porównawczych.

Również w miarę dyskusyjne pozostaje pytanie o zmianach w liczbie linii filogenetycznych i wielkości populacji gatunku w czasie zmian klimatu w późnym plejstocenie. Z danych na ryc. 32 i 33 wynika, że zmiany w liczbie linii nie zawsze są synchroniczne z wahaniami klimatu, na przykład w czasie różnych etapów MIS 5 i MIS 3, wymaga to moim zdaniem dodatkowego objaśnienia.

Ciekawe i naukowo ważne dane Autorka otrzymała, jeśli chodzi o tempo podstawień nukleotydów dla sekwencji genomów mitochondrialnych między różnymi badanymi grupami. Pokazała, że zróżnicowanie na poziomie nukleotydów zarówno cytochromu b jak i genomu mitochondrialnego w różnych badanych grupach (A – L), jest podobne (jednakowe prawidłowości podziału) z pewnymi wyjątkami, co pokazuje ryc. 36. Brakuje moim zdaniem wyjaśnienia w tekście o czym to świadczy.

W rozdziale **Dyskusja** Autorka podkreśliła, że połączenie danych o zróżnicowaniu geograficznym cytochromu b i danych genomowych umożliwiło zrekonstruowanie najbardziej prawdopodobnych relacji filogenetycznych w obrębie różnych linii badanego gatunku. Najważniejszym rezultatem rozprawy jest wniosek, że sekwencje *Alexandromys oekonomus* można podzielić na dwie grupy azjatycko-amerykańską i europejską z kolejnym ich podziałem na mniejsze linie filogenetyczne. Do pewnego stopnia podział ten udowodniono również na podstawie badań paleontologicznych, porównując zmiany morfotypów zębów w czasie i w przestrzeni.

Ważnym i wymagającym jeszcze dalszej dyskusji pozostają zagadnienia związane z porównaniem czasów dywergencji poszczególnych linii kalibrowane różnymi metodami, np. w oparciu o dane paleontologiczno-stratygraficzne (przy użyciu metody AMS C<sup>14</sup>) i szacowane metodami molekularnymi (w oparciu o DNA.) Porównanie obu metod daje najczęściej różne daty dla tych samych próbek. Trzeba zawsze pamiętać, że w procesie ewolucji najpierw następują zmiany na poziomie genetycznym z akumulacją mutacji, które dopiero po pewnym czasie przejawiają się z zmianami morfologicznymi, a na końcu mamy adaptację i selekcję. Zmiany morfologiczne obserwowane w materiale paleontologicznym pojawiają się znacznie później po zmianach genetycznych utrwalonych w sekwencjach. Dlatego ważne wydaje się byłoby przeprowadzenie badań nad morfologią zębów *A. oekonomus* w całym zasięgu areálu, aby porównać dane morfologiczne ze zmiennością genetyczną. To jest moja sugestia w jakim kierunku powinny pójść dalsze badania Autorki.

Mam jeszcze dwie niewielkie uwagi. Po pierwsze Autorka nie powiązała otrzymanych danych z zagadnieniami taksonomicznymi i po drugie – moim zdaniem w niewystarczającym stopniu zostały porównawcze przedyskutowane wyniki badań DNA uzyskane z wymarłych populacji, z populacjami współczesnymi (za wyjątkiem badań w jaskini Denisowskiej). Ważne byłoby na przykład regionalne porównanie danych antycznego i współczesnego DNA gatunku z terytorium Polski. Uzupełniło by to wiedzę o możliwych przodkach, o drogach migracji form i o regionalnym formowaniu areału gatunku w ujęciu filogeograficznym.

Otrzymane wyniki pracy doktorskiej są naukowo ważne, dobrze udokumentowane, nowatorskie i interesujące jak dla neontologów tak i dla paleontologów. Wnioski zostały przedstawione w formie punktów, są zrozumiałe i odpowiadają celom pracy oraz zaplanowanym zagadnieniom badawczym. Są one logicznie ułożone zgodnie z tekstem doktoratu, chociaż moim zdaniem, ich kolejność powinna zaczynać się najpierw od przedstawiania głównych osiągnięć Autorki.

#### Podsumowanie

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Żeromskiej pt. „Wykorzystanie analiz kopalnego DNA (aDNA) do rekonstrukcji filogenezy i ewolucji populacji nornika północnego (*Alexandromys oeconomus*)” stanowi oryginalne dzieło, wnoszące istotny wkład w poznanie ewolucji i filogenezy tego gatunku, przede wszystkim na poziomie molekularnym. Ponadto zawiera ona wiele nowych wyników pozwalających na rekonstrukcję powiązań filogenezy ze stratygrafią i filogeografią nornika północnego (*Alexandromys oeconomus*).

Uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Żeromskiej spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim przez obowiązujące w Polsce prawo dotyczące stopni naukowych (Ustawa z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami). Dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczeniu Pani mgr Aleksandry Żeromskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto ze względu na wysoki poziom naukowy rozprawy rekomenduję Radzie Naukowej jej wyróżnienie.



Prof. dr hab. Leonid Rekovets