

Kraków, 10 sierpnia 2015 r.

dr hab. Jarosław Tyszka, prof. nadzw. ING PAN
Ośrodek Badawczy w Krakowie
Instytut Nauk Geologicznych PAN

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Pawłowskiej

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Pawłowskiej, pt. *Palaeoenvironmental changes over the last millenium in Horsund fjord (Spitsbergen). New insight from ancient DNA* wykonanej pod kierunkiem promotora pracy dra hab. Marka Zajączkowskiego, prof. nadzw. IO PAN oraz promotora pomocniczego dr Joanny Legeżyńskiej, została powierzona przez Radę Naukową Instytutu Oceanologii PAN uchwałą z dnia 10 czerwca 2015 r. Pracę doktorską, przesłaną listem poleconym, otrzymałem 22 czerwca br.

Charakterystyka rozprawy

Recenzowana praca ma postać zwięzłego monograficznego opracowania, składającego się z 91 stron ujętych w siedmiu rozdziałach, uzupełnionych szeroko cytowaną literaturą naukową. Rozprawa została napisana w języku angielskim oraz zawiera wymagane streszczenie w języku polskim. Do rozprawy dołączono płytke CD z czterema załącznikami, prezentującymi rezultaty ilościowe badań w postaci tabel.

Praca rozpoczyna się wprowadzeniem, zawierającym uzasadnienie badań oraz cele naukowe pracy. Kolejne rozdziały przedstawiają tło badań, uwzględniając zarys zmian paleoklimatycznych oraz paleoceanograficznych w obszarze Arktyki w ciągu ostatniego tysiąclecia. Dalsze części wprowadzają czytelnika w sedimentologiczne i paleoekologiczne zagadnienia wskaźników paleośrodowisk morskich. Szczególna uwaga została zwrócona na analizę zapisu kopalnego otwornic bentonicznych w postaci liczebności, chemizmu ich skorupki oraz zachowanych sekwencji aDNA (kopalnego DNA; *ancient DNA*). Kolejne dwa rozdziały omawiają obszar badań i analizowane materiały oraz interdyscyplinarną metodykę badawczą zaczerpniętą z oceanografii, sedimentologii, geochemii, mikropaleontologii i biologii molekularnej. Kluczowe w pracy są rozdziały omawiające rezultaty badań, ich interpretację oraz dyskusję otrzymanych wyników. Rozdział ostatni przedstawia opis wniosków końcowych oraz perspektywy dalszych badań.

Najważniejsze cele rozprawy obejmują:

- (a) rekonstrukcję zmian środowiska w fiordzie Horsund w ostatnim milenium na podstawie zapisu sedimentologicznego, mikropaleontologicznego i aDNA oraz rozpoznanie kluczowych procesów te zmiany wywołujących,
- (b) ewaluację zastosowania kopalnego DNA otwornic jako nowego narzędzia rekonstrukcji bioróżnorodności i paleośrodowiska.

Ocena rozprawy

Tematyka rozprawy wpisuje się w bardzo pozytywną tendencję poszukiwania i stosowania nowych narzędzi rekonstrukcji zmian paleośrodowiska. Autorka w pionierski sposób zastosowała analizę wybranych fragmentów DNA rybosomalnego (SSU rDNA) do identyfikacji taksonów otwornic. Wybór miejsca i materiału do badań jest bardzo trafny, ponieważ jest to osad relatywnie młody (do tysiąca lat), był deponowany w niskich temperaturach oraz zawiera bogate zespoły otwornic. Niskie temperatury oraz sprzyjające warunki wczesnej diagenety (warunki REDOX?) zapewne umożliwiły dobre zachowanie analizowanej materii organicznej, a co za tym idzie, zapisu molekularnego kopalnych zespołów organizmów.

Co ważne, najmłodsze badane osady są w praktyce współczesne, a to pozwoliło na dobre rozpoznanie otwornic kopalnych i ich porównanie z taksonami współczesnymi. Analiza zapisu molekularnego aDNA wykazała duże znaczenie otwornic jednokomorowych, należących do Monothalamea. Otwornice te bardzo rzadko pozostawiają zapis kopalny w postaci mikroskamieniałości. Nie jest to wynik zaskakujący, ponieważ są to organizmy bardzo liczne w obszarach polarnych współczesnych mórz i oceanów. Wyniki aDNA potwierdziły zatem bardzo liczne występowanie tej grupy otwornic w rejonie Spitsbergenu w czasie ostatniego milenium. Z jednej strony wyniki te potwierdzają skuteczność metody analizy kopalnego DNA, z drugiej jednak strony są niezwykle trudne do szczegółowego zinterpretowania. Można również wyczuć niedosyt Autorki, która słusznie zauważa, że obecna wiedza na temat ekologii grupy Monothalamea jest bardzo ograniczona.

Ta niepełna strona interpretacji, z powodu braku wiedzy na temat tej grupy organizmów, generuje nowe wyzwania badawcze. Właśnie to, że większość zidentyfikowanych gatunków Monothalamea żyje do dzisiaj, pozwala na poznanie preferencji środowiskowych. Dotychczas nie stanowiło to interesującego wyzwania badawczego, ponieważ grupa ta miała bardzo ograniczone znaczenie w zapisie kopalnym. Paradoksalnie jednak rola Monothalamea w

morskich środowiskach stref polarnych, na olbrzymich obszarach równi abysalnych oraz płytkich stref marginalnych jest niedoceniana. Organizmy te najprawdopodobniej mają znaczny wpływ na obieg węgla oraz zależności troficzne w strefie dna morskiego.

Wnioski z przedstawionej pracy doktorskiej ujawniają duży potencjał analizy aDNA jako nowego, wiarygodnego wskaźnika bioróżnorodności i paleośrodowiska. Odkrycie to nie byłoby możliwe bez odważnego podjęcia tematu oraz przełomu technologicznego w postaci zastosowania wysokowydajnych metod sekwencjonowania.

Uwagi metodyczne

Z metodycznego punktu widzenia zastanawia fakt relatywnie dobrego zachowania DNA w młodym osadzie kopalnym, przy braku zachowania organicznych, miękkich „skorupek” czy osłonek otwornic, zbudowanych z białkowych polisacharydów (m. in. proteoglikanów). Związki te w postaci „skórzastych” ścianek monothalamidów - przynajmniej teoretycznie - powinny zachowywać się w osadzie lepiej niż DNA. Jednym z potencjalnych powodów takiego stanu może być sposób preparatyki, w której przy szlamowaniu osadu zastosowano relatywnie duże oczko sita o wielkości 100 μm . Zastosowanie mniejszego oczka sita (np. klasycznego sita o średnicy 63 μm) lub przetestowanie metody odwirowywania zawiesiny w celu odseparowania miękkich fragmentów ścianek organicznych mogłoby przynieść dobre rezultaty, weryfikujące przyczynę zupełnego braku tych najbardziej odpornych na rozkład organicznych fragmentów otwornic jednokomorowych.

Niezależnie od powyższego problemu, do badań mikrofauny i analizy żywych otwornic rekomenduje się stosowanie drobniejszego sita o oczku 63 μm , ze względu na częste występowanie skorupki o frakcji 63-100 μm . Zastosowanie sita 100 μm mogło wyeliminować formy małe i znacząco zmienić proporcje taksonów w analizowanym materiale. Warto zauważyć, że analiza aDNA została wykonana z całości osadu, włączając w to fragmenty DNA, pochodzące z frakcji najmniejszej osadu, w którym najczęściej dominują liczne osobniki o wielkości dziesiątek mikrometrów.

Analizy izotopów trwałych tlenu i węgla wykonano na podstawie 10 do 12 dobrze zachowanych skorupki *Cibicidoides lobatulus*. Jest to metoda powszechnie stosowana w paleoceanografii w celu uniknięcia tzw. efektu życiowego (*vital effect*) różnych gatunków otwornic. Wyniki wskazują na liczne fluktuacje, ale nie ujawniają wyraźnych długoterminowych trendów. Pojawia się pytanie: czy zastosowanie do analiz izotopowych gatunku, będącego wskaźnikiem prądów dennych nie wprowadziło dodatkowej zmienności

spowodowanej dynamiką prądów? Dynamika ta mogła być niezależna od średnich temperatur wód w danym interwale czasowym.

Dodatkowym problemem interpretacji analiz izotopowych może być również sezonowość wzrostu otwornic, uzależniona od dostępności pożywienia. Można spodziewać się, że najintensywniejszy wzrost otwornic następuje w okresie arktycznego lata. Sygnał izotopowy może zatem być zapisem warunków w miesiącach najcieplejszych, skorelowanych z zakwitami fitoplanktonu. Otwornice zawiesinożerne, takie jak *C. lobatulus* również podlegały tym sezonowym fluktuacjom, dodatkowo powiązanych ze zmienną dynamiką prądów morskich. To wszystko mogło wpłynąć na zatarcie zasadniczych trendów w zapisie izotopowym przedstawionym na rycinie 5 (str. 36). Należy podkreślić, że uwagi te nie podważają przedstawionych interpretacji, ale podkreślają złożoność zapisu kopalnego, z którym przyszło Autorce się zmierzyć.

Ocena formy rozprawy

Rozprawa została napisana dobrym naukowym językiem angielskim. Całość jest przedstawiona klarownie, według obowiązujących zasad prezentacji wyników badań naukowych. Dokumentacja graficzna i opisowa rezultatów badań jest wystarczająca. Tekst zawiera tylko nieliczne usterki, m. in.:

- na str. 19 „reticulopodia” zostały napisane przez literę „k”, a nie „c”,
- na str. 33 w ostatnim zdaniu brakuje słowa „current”; zdanie powinno się zaczynać następująco „The bottom current indicators ...”

Dokumentacja graficzna jest wykonana starannie, chociaż ryciny 1 i 2 (Fig. 1 oraz Fig. 2) powinny zawierać podziałkę liniową, niezależnie od przedstawienia siatki geograficznej. Siatka geograficzna ustala skalę mapy, ale nie ułatwia czytelnikowi szybkiej oceny odległości. Opis ryc. 2 (Fig. 2) nie zawiera odniesienia do źródła mapy.

Ryc. 6, w kolumnach gatunków *E. excavatum*, *C. lobatulus* i *A. galloway*, zawiera niedozwolone fragmenty krzywych (3 odcięte wartości na jednym poziomie chronostratygraficznym). Usterki te najprawdopodobniej wiążą się z etapem obróbki graficznej wykresów. Precyzyjne wartości liczebności tych gatunków zostały jednak dołączone w elektronicznych załącznikach do pracy, co eliminuje wątpliwe wartości na wykresach.

Stanowisko końcowe

Analiza całości rozprawy dowodzi, że cele rozprawy zostały w pełni osiągnięte. Autorka, pod efektywną opieką promotorów oraz przy współpracy z zespołem prof. Jana Pawłowskiego z Uniwersytetu Genewskiego, jednego z najlepszych ośrodków badań filogenezy molekularnej pierwotniaków, wprowadziła nowatorską metodę analizy aDNA do rekonstrukcji przeszłości środowisk polarnych. Dokonała właściwej oceny tej metody, porównując wyniki z danymi mikropaleontologicznymi. Dzięki takiej metodyce stało się możliwe zweryfikowanie zapisu kopalnego zupełnie niezależnymi metodami badawczymi. Jestem przekonany, że praca ta przejdzie do klasyki tej nowej specjalności badawczej.

Poziom naukowy pracy oceniam bardzo wysoko. Kandydatka do stopnia naukowego doktora wykazała się zastosowaniem profesjonalnego, interdyscyplinarnego warsztatu badawczego. Wykazała się uzdolnieniami do prowadzenia samodzielnych badań naukowych, a w szczególności do umiejętnego planowania badań, integracji metod badawczych oraz do wszechstronnej interpretacji wyników. Warte jest również podkreślenie aktywności publikacyjnej młodej badaczki. Jest współautorką co najmniej 4 recenzowanych artykułów w uznanych czasopismach indeksowanych przez *Web of Science* oraz rozdziału w publikacji monograficznej wydawnictwa Springer. Część z tych publikacji ma ścisły związek z ukończoną pracą doktorską. Jest to dorobek znaczący, potwierdzający aktywność naukową mgr Joanny Pawłowskiej.

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Joanny Pawłowskiej, pt. *Palaeoenvironmental changes over the last millenium in Horsund fjord (Spitsbergen). New insight from ancient DNA* jest oryginalnym opracowaniem Autorki i jednoznacznie wnosi poważny wkład do nowej metodyki badawczej oraz wiedzy o ewolucji paleośrodowiska w rejonie Spitsbergenu w czasie ostatniego millenium. Rozprawa całkowicie spełnia warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). W tej sytuacji stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Joanny Pawłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie proponuję rozpatrzenie wniosku o wyróżnienie pracy doktorskiej, ze względu na znaczący wkład we wdrażanie nowej metody badawczej, przy skutecznym wykorzystaniu zintegrowanej metodyki analitycznej.



Jarosław Tyszka