

Ocena pracy doktorskiej
p. mgr Anny Magdaleny Najbar
pt. **Zmienność genetyczna i struktura populacji salamandry plamistej**
***Salamandra salamandra* (Linnaeus, 1758) na północnej granicy zasięgu w Karpatach**

Pandemia pokazuje, że wnioskowanie o obecności patogenu SARS-CoV-2 jedynie na podstawie objawów klinicznych nie jest wystarczające. Zaawansowane techniki molekularne (jak qRT-PCR i sekwencjonowanie masowe genomów) są niezbędne do wykrycia bezobjawowych nosicieli, a także do odtworzenia historii rozprzestrzeniania się SARS-CoV-2 i jego pochodzenia. Odizolowanie zakażonych, kwarantanna, zamknięcie się w domach, nabycie odporności czy wynalezienie szczepionki, mają w ostateczności doprowadzić do wymarcia SARS-CoV-2 i ustania pandemii.

Pytania zadawane przez Doktorantkę w swojej dysertacji mieszczą się w opisanym schemacie epidemiologicznym. Został on wypracowany w ostatnim półwieczu w konsekwencji odkrycia zmienności i tożsamości molekularnej i jest podstawą biologii konserwatorskiej, zmierzającej do zachowania różnorodności biologicznej. Rozporządzenie Ministra Środowiska o zmianie statusu ochronny salamandry (i innych gatunków) ze ścisłej na częściową jest tragiczne, tym bardziej, że w Belgii salamandra dziesiątkowana jest przez epidemię spowodowaną nowym patogenem grzybem *Batrachochytrium salamandrivorans* o azjatyckiej proweniencji. Epidemiologia i biologia konserwatorska są odwrotnymi stronami tego samego medalu. Pierwsza dąży do ograniczenia czy wręcz wytępienia patogennych organizmów (np. polio), druga przeciwnie do ich zachowania. Znajomość rozmaitych szczegółów z ich życia budzi nie tylko ciekawość, ale jest niezbędna.

Krajowa salamandra plamista, jak przedstawia Doktorantka we wstępie, jest jednym z kilku gatunków rodzaju, których pokrewieństwo wyjaśniono dopiero niedawno, o szczególnych właściwościach. Jest łatwo rozpoznawalna dzięki krępej sylwetce czarnej skóry z żółtymi plamami świadczącymi o toksyczności; prowadzi dość skryty, wybitnie lądowy, osiadły i mało ruchliwy tryb życia. Goduje, odróżnieniu od traszek, na lądzie. Po zimie, wiosną samice rodzą zaawansowane w rozwoju larwy, zwykle w małych górskich strumieniach. Płodność samic, mimo ich sporych rozmiarów jest mała. Rozdzą kilkanaście do kilkudziesięciu larw (wg eksperymentów autorki sudeckie znacznie mniej 2-43). Północne stoki Polskich Karpat stanowią północną granicę jej szerokiego w Europie zasięgu.

Skąd biorą się granice zasięgów i jaka jest dynamika liczebności osobników populacji skrajnych są pytaniami fundamentalnymi dla biogeografii, biologii ewolucyjnej czy konserwatorskiej. W jaki sposób demografia populacji lokalnych i migracje między nimi wpływają na zasoby zmienności; czy spadek zmienności może wykluczać adaptacje do zmieniających się warunków i w konsekwencji do śmierci populacji, są pytaniami powiązanymi z poprzednimi.

Charyzmatyczny obiekt badań został dobrze wybrany, a rozszerzenie analiz na populacje karpackie stanowi cenne uzupełnienie badań prowadzonych we wrocławskim zespole p. Promotor wcześniej nad salamandrami sudeckimi. Mamy więc porównanie stosunków w sąsiednich łańcuchach górskich o odmiennej geologii, rzeźbie i siedliskach rozdzielonych obniżeniem Bramy Morawskiej i doliny Odry.

Praca doktorska mgr Najbar liczy 66 numerowanych stron, w tym spis jej imponującego życiorysu naukowego (str. 60 - 66) oraz oświadczenia pięciorga współautorów o swoim udziale w trzech opublikowanych pracach, które składają się na rozprawę. Angielskojęzyczna dysertacja poprzedzona jest polskim i angielskim streszczeniem całej zawartości, a także napisanymi w jęz. polskim: Wstępem, Celami pracy, a kończą ją krótkie Podsumowanie, Wnioski i Literatura uzupełniająca. Ma więc charakter mozaikowy. Trzon dysertacji tworzą trzy niedawno opublikowane prace ujęte w dwa rozdziały:

6. Struktura genetyczna populacji *Salamandra salamandra* w Karpatach (praca 1.)

7. Struktura populacji i zmienność fenotypowa *Samandra salamandra* w Polsce (praca 2 i 3).

Problematykę, zamysł pracy i testowane hipotezy przedstawiła Doktorantka w polskojęzycznym Wstępie. Szczegółowe cele pracy, ujęte w 4 punkty to: -ocena zmienności wewnątrz i międzypopulacyjnej celem określenia wpływu czynników środowiskowych na zasoby zmienności (rola przepływu genów, dryfu, inbrodu czy wąskiego gardła); - identyfikacja linii rodowych salamandr w populacjach karpackich przy założeniu postglacjalnej kolonizacji z Bałkanów; - poznanie zmienności fenotypowej ubarwienia, rozmiarów, stopnia dimorfizmu płciowego oraz wieku, odrębności oczekiwanych z powodu rozdzielania łańcuchów górskich Sudetów i Karpat; - określenie związku między wzorami barwnymi plamistości a zróżnicowaniem genetycznym, do czego osiadły tryb życia salamandr mógłby wskutek izolacji prowadzić.

Taka forma pracy doktorskiej ma wiele zalet, zarówno dla Doktorantki, Pani Promotor jak i recenzenta. Doktorantka nie tylko uczy się jak przygotowywać prace do druku, ale także jak prowadzić korespondencję z redakcją, odpowiadać na krytykę recenzentów, ponownie konsultować ze współautorami, przygotowywać rewizje etc. Jest to metoda typu 'hands-on', dodajmy, odbywającą się języku angielskim. (Ogniowy test próby – *nomen omen* - wg dawnych wierzeń, salamandra miała gasić ogień). Ukazanie się pracy w wersji on-line, jest rzeczywistym, wymiernym, zakończeniem etapu badań, tak dla doktoranta, jak i promotora. Recenzent z kolei ma ułatwione zadanie, gdyż publikacje zostały uprzednio sprawdzone przez kompetentnych fachowców, co w pracach o poszerzonej, jak ta tematyce, stosujących rozmaite metodologie, techniki i metody analityczne jest dla jednej osoby niełatwe do ogarnięcia.

Z kolei napisanie *post factum* do składowych dysertacji Wstępu skłania doktoranta do refleksji nad całością, zarówno nad osiągnięciami, niezrealizowanymi zamierzeniami jak i implikacjami nowych odkryć czy potwierdzonych prawidłowości, oraz wyznaczeniem kierunków na przyszłość. Z tych zadań Doktorantka mgr A. Najbar wywiązała się znakomicie.

Pokrótkę streszczę zamierzenia, techniki i wyniki.

Zmienność genetyczną salamander (382 osobniki, 13 stanowisk) badała Doktorantka analizując różnorodność dwu kategorii markerów genetycznych: kodowanych w jądrze 10 loci mikrosatelitów o dziedziczeniu biparentalnym, oraz niekodującego segmentu mtDNA, regionu kontrolnego (758 bp), zlokalizowanego w cytopalźmie o dziedziczeniu matczynym. Obie kategorie charakteryzują się dużą zmiennością, są więc właściwe do badania zróżnicowania populacji w małej skali przestrzennej, czy identyfikacji linii genealogicznych (mtDNA) i ich pochodzenia. Skwantyfikowała zmienność mikrosatelitów posługując się takimi miarami jak: bogactwo alleliczne, oczekiwana heterozygotyczność, liczba alleli prywatnych, celem scharakteryzowania zmienności wewnątrzpopulacyjnej. (Spadek zmienności może być wynikiem dryfu wskutek inbrodu następstwem spadku liczebności). Współczynnik F_{ST}

zastosowała do porównanie zróżnicowania wewnątrz- i międzypopulacyjnego (AMOVA), dzieląc wariację molekularną na komponenty, w dwu zestawach populacji. I tak, aż 86-92% zmienności zawarta jest w obrębie populacji, 6.5% między dwoma grupami populacji karpackich; wariacja międzypopulacyjna wzrosła z 2 do 8% jeśli do analizy włączyć populację 3 z Pogórza Strzyżowskiego. Małe zróżnicowanie międzypopulacyjne świadczy o stosunkowo dużym przepływie genów, słabym udziale dryfu. Odrębność populacji 3, wynika zapewne z dryfu wskutek długotrwałej izolacji. Analiza zmienności rozpatrująca genotypy łączne (kombinacje alleli w 10 loci razem) oparta na Bayesowskiej metodzie łączenia (clustering) genotypów STRUCTURE, dla K=5 wykryła subtelne zróżnicowanie między populacjami wschodnimi i zachodnimi polskiej części Karpat, choć z częstą admiksją (obecnością podobnych genotypów); populacja nr 3 okazuje się również w tym kontekście mało zmienna, natomiast próba sudecka nr 11 wyraźnie odrębna. Segment mtDNA był identyczny u wszystkich 17 badanych osobników; zaklasyfikowano go jako haplotyp II b. Na podstawie wykrytego wzoru zmienności mikrosatelitów i segmentu mtDNA, Doktorantka ze współautorami ostrożnie sugerują postglacjalną kolonizację Sudetów i Karpat z zachodnich Bałkanów drogą przez dzisieją Austrię, Czechy i Bramę Morawską, w której miałyby dojść do rozdziału w kierunku zachodnim (Sudety) i wschodnim (Karpaty). Jest to hipoteza śmiała, zważywszy ogromny niezbadany obszar północnych Bałkanów i Karpat.

Struktura populacji i zmienność fenotypowa salamander w Polsce

Szeroko rozmieszczone, jak salamandra, gatunki często objawiają wyraźne zróżnicowanie fenotypowe rozmaitych, nierzadko skorelowanych ze sobą cech, takich jak rozmiary ciała, tempo wzrostu, czas osiągnięcia dojrzałości płciowej, płodność, długość życia, stopień dymorfizmu płciowego itd. Powodów zróżnicowania, lokalnego czy regionalnego upatruje się m.in. w reakcji selekcyjnej na gradienty środowiskowe, lokalne warunki siedliskowe, czy czynniki antropogenne itp.

Doktorantka badała rozmiary ciała salamander u 2012 osobników z 23 populacji rozproszonych na odcinku 550 km od zachodniej granicy kraju w Sudetach po wschodnią w Karpatach. U 768 dojrzałych płciowo samców określiła też wagę ciała, co posłużyło do określenia SMI (Scaled Mass Index) jako wyznacznika kondycji. Amputowane palce kończyny tylnej - (Urodela mają duże zdolności regeneracyjne!, zastosowano właściwą zaakceptowaną metodę, co należy podkreślić) - posłużyły m.in. do określenia wieku osobników metodą skeletochronologiczną, a wiek w porównaniu z rozmiarami także do wyznaczenia tempa wzrostu. U prawie wszystkich osobników ustalono wcześniej profil genetyczny w 10 loci mikrosatelitów. Szczegóły analiz statystycznych, przeprowadzonych na logarytmicznej transformacji pomiarów, uwzględniających takie czynniki jak długa rozpiętość pobierania prób w czasie (2004-2016) oraz odmiennym okresie aktywności, od wiosny do jesieni, pominę.

Karpackie salamandry są okazały się dłuższe, cięższe i starsze niż sudeckie. Dymorfizm płciowy rozmiarów wykryto tylko w Karpatach, samice są tu większe. U samców kondycja ciała jest najlepsza w środku lata, gorsza po hibernacji wiosną, i jesienią (zapewne gody są energetycznie kosztowne). Wiek salamander wahał się od 2-16 lat, dominują osobniki 7-9 letnie. Krzywe wzrostu, jak należałoby oczekiwać u gatunków o ciągły wzrósć, są asymptotyczne; odmienne dla płci, ale równocześnie różnicujące Sudety i Karpaty. Różnice te najprawdopodobniej odzwierciedlają lepsze warunki siedliskowe dla salamander w Karpatach, zarówno dla larw jak i osobników młodocianych i dorosłych, a także większą szkodliwą antropopresję w Sudetach. Wpływ czynników genetycznych na obserwowane zróżnicowanie morfometryczne i tempo wzrostu, choć niewykluczony, ma wg Doktorantki raczej mniejsze znaczenie, z powodu spadku liczebności salamander w Sudetach.

Praca ta odkrywa istotne zróżnicowanie wielkości ciała i stopnia dymorfizmu płciowego, i tempa wzrostu salamander Sudetów i Karpat. Większe samice są zapewne płodniejsze, albo rodzą większe potomstwo. Dymorfizm płciowy może także wskazywać na odmienny nacisk selekcji płciowej na dwu obszarach, w postaci rywalizacji samców, czy wieloosobowca związanego z wyborem partnera przez samicę. Są to moim zdaniem obiecujące kierunki badań. Wysoce polimorficzne markery są dostępne, samce i samice łatwo identyfikować i śledzić przez wiele lat, a larwy przypisywać na podstawie genotypów do rodziców.

Potwierdzona długowieczność salamander ma także znaczenie ochroniarskie. Obecność dorosłych może sprawiać złudne wrażenie stabilności populacji. Konieczne jest śledzenie rekrutacji nowego pokolenia, pojawiania się larw, przeobrażonych i przezimowanych osobników młodocianych, których przeżywanie zależy bądź od dostępności kryjówek. Kryjówki letnie czy zimowe dla gatunków lądowych są równie ważne jak miejsca rozrodu, i można je konstruować w ochronie czynnej.

Zmienność wzorów ubarwienia, nazwany polimorfizmem w pracy jest trzecim zagadnieniem analizowanym u wyżej opisanych osobników z Sudetów i Karpat. Jest to usystematyzowana analiza rozmieszczenia żółtych plam na grzbietowej powierzchni ciała salamander u ponad 2 000 osobników. Doktorantka wyróżniła 4 typy ubarwienia; częstości ich występowania wyniosła: plamiste 50.1%, plamisto-paskowne 42.8%, zygzkowate 5.8%, a paskowane 1.3%. Formy plamiste dominują na wschodzie, stanowią blisko 70% osobników, częstość ich spada w kierunku zachodnim do 46%. Formy paskowane są wszędzie rzadkie, z wyjątkiem skraja zachodniego, gdzie stanowią ok. 16% (być może z powodu bliskości geograficznej i pokrewieństwa z populacjami zachodniej Europy, gdzie są częste). Nie znaleziono zależności pomiędzy typem ubarwienia a płcią, ani ubarwieniem a 10 genowym genotypem mikrosatelitowym u 557 osobników.

Wyniki tej części rozprawy przedyskutowane są w szerszym kontekście geograficznej zmienności plamistości, odrębnych wzorów u opisanych form (podgatunków), czy podobnego w odległych regionach geograficznych. Tę zagmatwaną wzorzystość uporządkowały niedawno badania sekwencji DNA, prowadzące do gruntownej rewizji taksonomicznej rodzaju. Zmieniło się także wyjaśnienie adaptacyjne ubarwienia, z kryptycznego na ostrzegawczy (aposematyczny), związany z toksycznością salamander przyskających wydzieliną alkaloidów zawartą w gruczołach ziarnistych (jadowych) skoncentrowanych w zaocznych parotydach, gdy salamandry chwytane są zębami czy dziobem przez drapieżniki.

Poza nowymi odkryciami z szeroko pojętej biologii gatunku porzerzającymi naszą wiedzę i zrozumienie złożonych procesów demograficznych i genetyczno-populacyjnych, z implikacjami dla praktyk konserwatorskich, Doktorantka, A. M. Najbar, wykazała się szeregiem umiejętności koniecznych do efektywnej pracy. Najpierw w terenie, zbierając materiał i przeprowadzając pomiary, a potem w laboratorium ucząc się technik badania zmienności sekwencji DNA. Opanować musiała również nowe sposoby analiz i opracowania danych testujących alternatywne modele powstawania zróżnicowania w różnej skali geograficznej. Na końcu napisała i zredagowała trzy zwarte agielskojęzyczne prace, rozpatrujące badane zagadnienia

i nowe obserwacje w szerokim kontekście czynników bliższych i dalszych. Nie byłoby to możliwe bez rozległej wiedzy i znajomości najnowszej literatury z kilku dziedzin biologii.

Podkreślić trzeba, że udział pięciorga współpracowników z innych uczelni był nie tylko niezbędny do wykonania badań, ale był dodatkową szkołą pracy zespołowej, bez której trudno sobie wyobrazić współczesną naukę. Oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości o dominującym udziale doktorantki w badaniach i na wszystkich etapach powstawania trzech opublikowanych prac. Nie chciałbym negować roli p. Promotor, wokół której skryształizował się prężny zespół młodych badaczy.

Rozprawę czytałem z ogromnym zainteresowaniem i podziwem dla uzyskanych wyników oraz ich wszechstronnego wyjaśniania. Nie mam uwag krytycznych. Są to raczej pytania do Doktorantki, rodzące się z refleksji po przeczytaniu Jej pracy.

1. Jakże może być znaczenie systemu rozrodu salamander z udziałem wieloojcostwa i długiego życia w zwiększaniu efektywnej wielkości populacji, co zapobiegać może dryfowi.
2. Rola katastrof – gwałtowne ulew i mikropowodzie - charakteryzujące Karpaty na przełomie wiosny i lata, zapewne znoszą larwy w dół potoków – mogą sprzyjać przepływowi genów przy małej ruchliwości dorosłych salamander.
3. Ogromny obszar Karpat i półn. Bałkanów zasiedlany przez salamandry nie był badany (por. Steinfartz et al. 2000). Wydaje mi się, że pochodzenie tak Sudeckich jak i Karpaccich populacji salamandry nie jest dostatecznie wyjaśnione, choć rozumiem konieczność hipotez *ad hoc* w czym celował Karol Darwin, a z czego Emma Wedgwood się naśmiewała.

Wnioski końcowe: praca p. mgr Anny Magdaleny Najbar spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o jej przyjęcie i dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu.

Biorąc pod uwagę zawartość dysertacji, obfitującej w nowe odkrycia i wielowątkowe wyjaśnienia a także praktyczne implikacje dla praktyk ochrony salamandry* wnoszę o jej wyróżnienie.

Jacek M. Szymura

prof. dr hab. Jacek M. Szymura
członek PAU
Zakład Anatomii Porównawczej UJ

Kraków, 24 kwietnia 2020 r.

*od zarazy *Batrachochytrium salamandrivorans* zachowaj ją Panie! (suplikacja w czasie pandemii);
- mogłaby służyć jako gatunek parasolowy (umbrella species) związana jest z czystymi potokami Karpat i Sudetów.