



Instytut Biologii Ssaków
Polskiej Akademii Nauk
Białowieża

ul. Waszkiewicza 1
17-230 Białowieża
tel. 48 (85) 682-77-50
fax 48 (85) 682-77-52
www.ibs.bialowieza.pl

dr hab. Andrzej Zalewski
Instytut Biologii Ssaków PAN
Ul. Waszkiewicza 1
17-230 Białowieża

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Stanisława Pagacza pt. „Struktura genetyczna i dyspersja
wydry *Lutra lutra* w górskim krajobrazie Bieszczadów” wykonanej w Muzeum i
Instytucie Zoologii PAN w Warszawie**

Istotny rozwój technologii stosowanej w badaniach ekologii i biologii zwierząt, między innymi telemetrii satelitarnej czy genetyki molekularnej, umożliwił znaczące poszerzenie naszej wiedzy na temat wielu gatunków. Jednak ograniczenia związane z zastosowaniem tych metod w badaniach niektórych gatunków (np. wydry europejskiej) spowodowały, że nasza wiedza na ich temat nadal jest niewielka. Celem rozprawy Pana mgr. Stanisława Pagacza było określenie wpływu naturalnych barier na strukturę genetyczną oraz dyspersję wydry europejskiej na podstawie analiz genetycznych materiału zebranego metodami nieinwazyjnymi. Doktorant podjął się ambitnego i bardzo trudnego zadania mającego na celu uzupełnienia wiedzy na temat pospolitego gatunku ssaka drapieżnego. Było to zadanie trudne, ponieważ DNA pochodzące z odchodów jest niskiej jakości i nastęrcza wielu kłopotów podczas analiz laboratoryjnych. Z tych względów analizy DNA z tak zebranego materiału, powinny być przeprowadzone z zachowania odpowiedniej, rygorystycznej metodyki, a interpretację wyników należy przeprowadzić bardzo ostrożnie. Moim zdaniem Doktorant w pełni sprostał temu zadaniu, uzyskując nowe i ciekawe wyniki.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Stanisława Pagacza pt. „Struktura genetyczna i dyspersja wydry *Lutra lutra* w górskim krajobrazie Bieszczadów” ma formę

maszynopisu i liczy łącznie 78 stron, w tym 15 rycin, 4 tabele oraz jeden załącznik. Składa się z 5 rozdziałów: wstęp, materiał i metody, wyniki, dyskusja, literatura. Układ pracy jest przejrzysty, a wszystkie główne części rozprawy napisane są w sposób prawidłowy, nie mam większych zastrzeżeń ani do ich zawartości merytorycznej, ani do sposobu przedstawienia zawartych w nich treści. We wstępie Autor rozprawy przedstawił problem badawczy w sposób kompetentny i z wykorzystaniem aktualnej literatury. Teren badań został odpowiednio opisany i scharakteryzowany, chociaż zbrakło mi zbiorczej tabeli zawierającej zestawienie podstawowych parametrów rzek, na których prowadzono badania (długości, szerokości czy głębokości). Metody badań zostały opisane w sposób bardzo szczegółowy i precyzyjny. Skrupulatnie zostały opisane metody zbierania prób, metody izolacji i amplifikacji DNA oraz metody szacowania błędów genotypowania, jak również metody statystyczne użyte do analizy struktury genetycznej i dyspersji. W tym miejscu chciałbym podkreślić, że metody badań (zarówno laboratoryjne, jak i metody analizy wyników) zostały starannie dobrane i zastosowane w trakcie badań i analiz. Między innymi izolacja DNA została wykonana w innym miejscu niż analizy PCR i rozdziały mikrosatelitów w celu uniknięcia kontaminacji próbek o niskim stężeniu DNA. Niezależne reakcje PCR zostały kilkakrotnie powtórzone w celu uzyskania wiarygodnych genotypów. Wybór i wykorzystanie odpowiednich metod i rygorystyczne ich przestrzeganie wskazuje na obszerną wiedzę i szeroki zakres umiejętności Doktoranta, obejmujący zarówno prace laboratoryjne, jak i analizy statystyczne.

Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej uważam:

1. Wykazanie, że wododziały w górach nie stanowią bariery ograniczającej dyspersję i nie wpływają na strukturę genetyczną wydry europejskiej, gatunku ssaka ściśle związanego ze środowiskiem ziemno-wodnym. Wyniki te zostały potwierdzone przez różnorodne analizy statystyczne materiału genetycznego.
2. Udowodnienie, że wydry w czasie dyspersji pokonują znaczne dystanse i poruszają się nie tylko wzdłuż cieków wodnych, ale mogą oddalać się od rzek. Wyniki te wskazują, że populacje wydry nie są istotnie narażone na utratę zmienności genetycznej w wyniku fragmentacji i izolacji środowiska przez pasma górskie.
3. Część osobników z populacji wydry zasiedlającej badany obszar podejmuje dyspersję na długie dystanse, co potwierdzają zarejestrowane obserwacje dyspersji tych samych osobników określonych na podstawie analiz ich DNA oraz analizy osobników spokrewnionych. Maksymalny stwierdzony dystans dyspersji wynosił 40 km.

4. Wykazanie różnic w długości lub częstości dyspersji u samców i samic. Podobnie jak u wielu innych gatunków ssaków drapieżnych, samice okazały się bardziej filopatryczne w porównaniu z samcami. Zależności te zostały statystycznie potwierdzone.

Dyskusja wyników jest, w mojej opinii, przeprowadzona w sposób wzorcowy. Tekst dyskusji został podzielony na dwa podrozdziały. W pierwszym Doktorant bardzo szczegółowo omówił problemy i ograniczenia wynikające z przyjętej metodyki badań. W tej części Autor wykazał, że w pełni zdaje sobie sprawę, że metody wykorzystane w tych badaniach obarczone są pewnymi ograniczeniami, o których należy pamiętać interpretując wyniki. Świadczy to o znajomości warsztatu naukowego i dużej dojrzałości w prowadzeniu badań i analizie wyników. W drugim podrozdziale uzyskane przez siebie wyniki Autor przedstawił na tle szerokiego przeglądu danych i informacji pochodzących z opublikowanych prac. Doktorant w bardzo systematyczny i rzetelny sposób odniósł się do wszystkich najważniejszych rezultatów, które osiągnął. Zwraca uwagę staranność i ostrożność wyciągania wniosków oraz duża rozważa w interpretowaniu wyników. Spis literatury obejmuje 158 pozycji piśmiennictwa, z których duża część to prace anglojęzyczne opublikowane w ostatnich latach. Cytowane piśmiennictwo świadczy o dobrej znajomości aktualnych trendów w badaniach światowych, nie tylko dotyczących omawianego gatunku, ale w ogóle odnoszących się do zagadnień z zakresu ekologii i genetyki krajobrazu.

W mojej opinii rozprawa jest generalnie opracowaniem bardzo dobrym i właściwie pozbawionym większych merytorycznych błędów, jednak pewne elementy czy aspekty budzą moje zastrzeżenia:

1. Jedynym poważniejszym mankamentem przedstawionej do oceny rozprawy jest niewielki sukces genotypowania nieinwazyjnie zebranego materiału, co bezpośrednio przekłada się na wielkość prób użytych do analizy. Łącznie zebrano aż 622 próbki do analiz genetycznych, z których tylko dla 107 próbek udało się uzyskać genotypy złożone z 5-11 loci. Na podstawie tego materiału stwierdzono występowanie na tym terenie 48 osobników (34 w polskiej części terenu badań i 14 w części Słowackiej). Po odrzuceniu próbek pochodzących od spokrewnionych osobników, duża część analiz została wykonana jedynie z wykorzystaniem 25 próbek pochodzących z Polski i 13 ze Słowacji. Niewielka liczba prób użytych do analizy może wpływać na istotność i znaczenie otrzymanych wyników.

2. Doktorant zbierał próby w latach 2008-2011, przy czym okres i sposób przechowywania próbek były bardzo różne. Dodatkowo zbierane były dwa rodzaje próbek (odchody i wydzieliny zapachowe). Czy okres i sposób przechowywania próbek miał wpływ na sukces amplifikacji DNA? Podobnie czy w przypadku analizy różnego rodzaju materiału sukces amplifikacji był różny? Wydaje mi się, że w wynikach należało przeanalizować wpływ sposobu zbierania próbek oraz rodzaju próbek na sukces amplifikacji DNA a w dyskusji powinno znaleźć się omówienie potencjalnego wpływu na otrzymane wyniki różnego sukcesu amplifikacji w zależności od różnych czynników.

3. Do analizy zmienności genetycznej została wykorzystana średnia liczba alleli w danym locus (Tabela 1), która jest w dużym stopniu zależna od liczebności próby. Porównanie średniej liczby alleli wskazuje na znacznie niższą zmienność genetyczną u wydr pochodzących ze Słowacji w porównaniu z populacją zasiedlającą Polskę, co prawdopodobnie wynika z różnej wielkości prób użytych do analizy. Być może należało wyliczyć również wskaźnik bogactwa alleli niezależny od wielkości próby w celu bardziej precyzyjnego porównania zmienności genetycznej na obu powierzchniach.

4. W dyskusji i wnioskach Doktorant sugeruje, że populacja wydr w Bieszczadach nie przechodziła drastycznego spadku liczebności, jaki odnotowano w wielu populacjach w Europie. Niestety, nie została przeprowadzona analiza statystyczna zebranego materiału mogąca potwierdzić taką sugestię. Być może wielkość próby nie pozwoliła na przeprowadzenie takich analiz.

Powyższe zastrzeżenia nie umniejszają jednak wartości naukowej przedstawionej rozprawy i jestem przekonany, że tak interesujące dane Autor będzie mógł w nieodległej przyszłości opublikować w renomowanych czasopiśmie międzynarodowych. Podsumowując całość oceny stwierdzam, że Doktorant z sukcesem zweryfikował hipotezy badawcze, w pełni zrealizował założone cele badań oraz osiągnął oryginalne i wartościowe wyniki naukowe. Rozprawa przynosi nowe dane dotyczące ekologii i biologii wydry zasiedlającej rzeki w górach. Doktorant udowodnił, że w pełni opanował złożony warsztat badawczy poczynając od stawiania jasnych hipotez, planowania badań, przeprowadzenia prac terenowych oraz analiz genetycznych, a skończywszy na przeprowadzeniu złożonych analiz statystycznych współcześnie stosowanych w badaniach genetycznych.

Uważam więc, że rozprawa doktorska Pana mgr. Stanisława Pagacza pt. „Struktura genetyczna i dyspersja wydry *Lutra lutra* w górskim krajobrazie Bieszczadów” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz w Ustawie z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę do Rady Naukowej Muzeum i Instytutu Zoologii PAN w Warszawie o dopuszczenie mgr. Stanisława Pagacza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białowieża, 10 kwietnia 2014 r.



dr hab. Andrzej Zalewski