



Zastosowanie analiz kopalnego DNA w badaniach osadów czwartorzędowych

Ewa Julia Demianiuk¹, Wojciech Majewski¹

Applications of sedimentary ancient DNA analyses in geological Quaternary research. *Prz. Geol.*, 66: 680–691; doi: 10.7306/2018.11

Abstract. During the past few decades genetic research has been developed in parallel with paleogenetics. A dynamic progress in this field of studies is possible due to the advance in laboratory and computer technologies. Today, scientists have the Next Generation Sequencing methods at their disposal, which enable them to read millions of sequences at the same time, thus furthermore significantly reducing time needed for laboratory procedures. Concurrently, costs of analysis and equipment have been decreasing, which makes paleogenetical analyses widely available. They are commonly used in medicine, biotechnology, genetic engineering, food industry and forensics, as well as in life sciences like biology, paleobiology, archeology, geology and environmental protection sciences. This paper presents sedaDNA (sedimentary ancient DNA) analyses and their use in Quaternary research, as well as describes sources of DNA in sediments and main processes contributing to its degradation or preservation.

Keywords: *sedimentary ancient DNA, Next Generation Sequencing, paleogenetic, paleoenvironments, paleobiodiversity*

Zapoczątkowane przez Grzegorza Mendla w latach 60. XIX w. badania i eksperymenty dotyczące mechanizmów dziedziczenia oraz wyizolowanie w 1869 r. przez Friedricha Mieschera *nucleina* z jąder komórkowych były pierwszymi udokumentowanymi odkryciami dotyczącymi genetyki. Początkowo nie zdawano sobie sprawy z powiązania cząsteczek kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) z funkcją, którą pełni on w organizmach żywych (Dahm, 2005). Dopiero odkrycie w 1953 r. struktury DNA doprowadziło do stwierdzenia, że DNA jest podstawowym nośnikiem informacji genetycznej, mającym zdolność do samopowielania (Watson, Crick, 1953). Pod koniec lat 70. XX w. Friedrich Sanger, Allan Maxam i Walter Gilbert opracowali pierwsze metody sekwencjonowania – sposobu odczytywania sekwencji nukleotydów w DNA (Maxam, Gilbert, 1977; Sanger i in., 1977; Dahm, 2005). Naukowcy zaczęli sekwencjonować pojedyncze fragmenty genomów, głównie obszary kodujące istotne geny. W latach 80. XX w. publikowano już pełne sekwencje genomowe, począwszy od składającego się z ponad 170 tys. zasad genomu wirusa Epstein-Barr (Baer i in., 1984) przez genomy bakteryjne (Fleischmann i in., 1995) i te należące do prostych organizmów eukariotycznych (Goffeau i in., 1996). Na przełomie XX i XXI w. opublikowano wyniki trwającego ponad 10 lat sekwencjonowania genomu ludzkiego, składającego się z ponad 3 mld par zasad (pz) (International Human..., 2001; Venter i in., 2001).

Pierwsze badania fragmentów DNA zachowanych w szczątkach organicznych (kopalne DNA, ang. *ancient DNA*, aDNA) dotyczyły materiału z niespełna stuletnich ówczesnie tkanek zebry *quagga*, pochodzących z próbek muzealnych (Higuchi i in., 1984), oraz z mumii egipskich liczących ponad 2 tys. lat (Pääbo, 1985). Prace te zapoczątkowały dynamiczny rozwój badań nad aDNA, włączając sekwencjonowanie całych mitochondrialnych genomów (ang. *mitochondrial DNA*, mtDNA) wymarłych

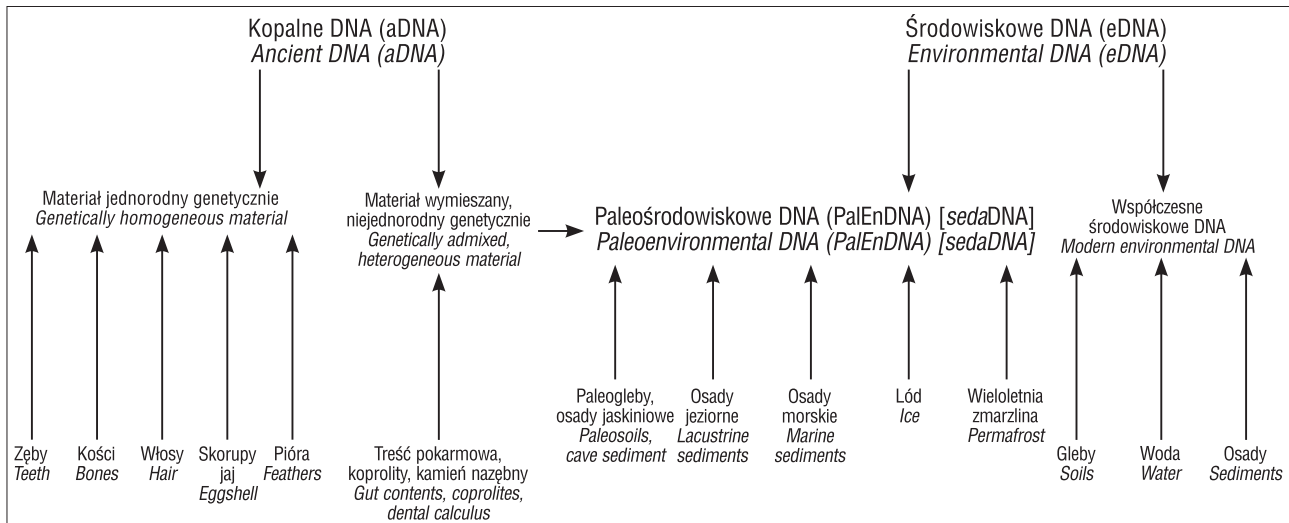
gatunków, np. mamuta (Gilbert i in., 2008), czy genomów ludzkich przodków (np. Green i in., 2010; Rasmussen i in., 2014). W tym samym czasie zaczęły się pojawiać pierwsze publikacje dotyczące badań współczesnego środowiskowego DNA (ang. *environmental DNA*, eDNA) (np. Lorenz i in., 1981; Ogram i in., 1987), czyli wolnych fragmentów materiału genetycznego rozproszonych m.in. w wodzie, powietrzu czy osadach (Rawlence i in., 2014). Na przełomie XX i XXI w. wyizolowano aDNA z rdzeni lodowych (Willerslev i in., 1999), następnie z osadów wieloletniej zmarzliny (Willerslev i in., 2003), co stanowiło przełom w badaniach nad aDNA pochodzącym z próbek środowiskowych. Prace te wykazały, że mimo nieobecności makro- i mikroszczątków w środowisku zostaje genetyczny ślad po bytności organizmów żywych (Pedersen i in., 2015).

W literaturze pojawiło się wiele określeń na różne typy i rodzaje DNA, wraz z propozycjami podziału materiału genetycznego m.in. ze względu na jego występowanie w wolnej formie poza komórkami organizmu (ang. *extracellular DNA*) i pozostawanie w nich (ang. *intracellular DNA*) (np. Torti i in., 2015). Rawlence i in. (2014) podjęli próbę ogólnego usystematyzowania terminologii związanej z różnymi formami DNA znajdującego się w środowisku (ryc. 1). I tak:

– eDNA – są to niejednorodne (pochodzące z różnych organizmów) fragmenty materiału genetycznego rozproszone w środowisku (m.in. w wodzie i osadach) (Rawlence i in., 2014; Thomsen, Willerslev, 2014);

– aDNA – to materiał genetyczny znajdujący się w szczątkach organicznych. Rawlence i in. (2014) podzielili je na materiał jednorodny (pochodzący od jednego osobnika), znajdujący się w pojedynczych szczątkach kopalnych, tj. kości, włosy czy pióra, oraz na materiał niejednorodny (obecny np. w treściach pokarmowych jako mieszanina fragmentów DNA różnego pochodzenia

¹ Instytut Paleobiologii PAN im. Romana Kozłowskiego, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa; ejdemianiuk@gmail.com; wmaj@twarda.pan.pl



Ryc. 1. Źródła i rodzaje DNA w środowisku (na podstawie Rawlence i in., 2014)

Fig. 1. Source and types of DNA in the environment (based on Rawlence et al., 2014)

zarówno z organizmu właściciela, jak i organizmów wchodzących w skład jego diety);

– PalEnDNA (ang. *paleoenvironmental* DNA) – to fragmenty aDNA pochodzącego z różnych organizmów i rozproszonego w środowisku, tj. w glebie, glebach kopalnych, osadach jaskiniowych, jeziornych i morskich, wieloletniej zmarzlinie i w lodzie.

Powyższy podział przedstawia różnicę między omawianymi rodzajami DNA, jednak często stosowany w literaturze termin *sedaDNA* (ang. *sedimentary ancient* DNA), określający krótkie fragmenty aDNA (poniżej 300 pz) (Slon i in., 2017), rozproszone w niewielkich ilościach w różnego rodzaju osadach (Haile i in., 2009; Boessenkool i in., 2014), zdaniem autorów lepiej oddaje charakter znajdującego się w osadach kopalnego materiału genetycznego.

Niniejsza praca ma na celu przybliżenie specyfiki *sedaDNA* jako materiału badawczego oraz zaprezentowanie potencjału i możliwości, jakie niesie ze sobą wykorzystanie analiz genetycznych w badaniach czwartorzęd, m.in. w paleobiologii, rekonstrukcjach paleośrodowiskowych, zmienności ekosystemów i badaniach zmian klimatu.

DNA W ŚRODOWISKU

Źródłem fragmentów DNA w środowisku mogą być wszelkiego rodzaju szczątki organiczne oraz wydzieliny produkowane przez organizmy żywe, tj. ślina, mocz, odchody, włosy i sierść, skorupki jaj, wylinki owadów, komórki złuszczonego naskórka, szczątki drobnych korzeni roślin, rzadziej pyłki (Willerslev i in., 2003, 2014; Pedersen i in., 2015). DNA może być też uwalniane bezpośrednio z komórek mikroorganizmów prokariotycznych i eukariotycznych (Pietramellara i in., 2009). Rozproszone w środowisku fragmenty DNA stanowią więc mieszaninę elementów genetycznych różnego pochodzenia i o różnym stanie zachowania, który wynika z zaawansowania procesów degradacji zachodzących w środowisku lądowym, kolumnie wody i w osadach (Vuillemin i in., 2017).

Procesy odpowiedzialne za degradację i zachowanie wolnego DNA w środowisku są od wielu lat przedmiotem intensywnych badań (Blum i in., 1997; Willerslev, Cooper, 2005). Poza czynnikami fizykochemicznymi, tj. promie-

niowaniem UV, dodatnią temperaturą, procesami hydroлізу czy deaminacji (Willerslev, Cooper, 2005), fragmenty DNA są degradowane na drodze biochemicznej, głównie za pośrednictwem aktywności DNaz bakterii i grzybów – enzymów katalizujących hydrolizę DNA i jego rozpad na krótsze łańcuchy bądź pojedyncze nukleotydy (Blum i in., 1997; Vuillemin i in., 2017), które mogą posłużyć jako składniki odżywcze roślinom i mikrobom (Levy-Booth i in., 2007). Wolne odcinki DNA mogą też zostać włączone do genomów bakteryjnych w wyniku procesu naturalnej transformacji (Lorenz, Wackernagel, 1994; Blum i in., 1997). Ochroną DNA przed degradacją mikrobiologiczną jest bardzo szybkie (poniżej dwóch godzin) adsorbowanie go na powierzchni zarówno organicznych, jak i nieorganicznych cząstek osadu (Blum i in., 1997; Levy-Booth i in., 2007; Vuillemin i in., 2017; Slon i in., 2017). Blum i in. (1997) w trakcie swoich eksperymentów odnotowali znacznie niższą aktywność DNaz bakteryjnych w przypadku cząsteczek DNA zaadsorbowanych przez cząstki mineralne w stosunku do cząsteczek DNA rozproszonych w roztworze, gdzie aktywność enzymów była istotnie podwyższona, skutkującą szybką degradacją DNA.

Ilość DNA, która może zostać związana w osadzie, zależy od składu mineralogicznego i granulometrii osadu, jego właściwości fizykochemicznych oraz towarzyszących mu warunków środowiskowych (Lorenz, Wackernagel, 1987; Slon i in., 2017). Zdolność adsorpcji DNA rośnie w obecności soli (NaCl i MgCl₂) i zwiększa się wraz ze wzrostem ich stężenia (Lorenz, Wackernagel, 1987). W swoich eksperymentach Slon i in. (2017) wykazali, że spośród piasku (kwarc), minerałów ilastych (montmorylonit), skaleni (oligoklaz) i osadu wapiennego DNA jest adsorbowane zarówno najsilniej, jak i w największych ilościach przez osad wapienny, w następnej kolejności przez minerały z grupy oligoklaz, a najmniej przez kwarc. Badania te wykazały również, że mierzona zawartość DNA związanego z osadem jest wielokrotnie wyższa niż ta w roztworze otaczającym osad. Ponadto zaadsorbowane na powierzchni ziaren osadu DNA jedynie w znikomych ilościach przechodzi w skład eluentu, którym osad ten zostanie nawet kilkakrotnie przepłukany.

Podsumowując, mechanizm wiązania DNA na powierzchni komponentów osadu znacząco spowalnia procesy degradacji, dając szansę na jego zachowanie. W sprzyjających warunkach, m.in. w niskich, najlepiej ujemnych temperaturach, neutralnym pH, warunkach anoksycznych, suchym klimacie czy przy braku dostępu promieni słonecznych, fragmenty DNA mogą przetrwać setki tysięcy lat (Willerslev i in., 2003; Willerslev, Cooper, 2005; Willerslev i in., 2014; Harbert, 2018). W niektórych przypadkach jest możliwa identyfikacja fragmentów mających nawet powyżej miliona lat (Kirkpatrick i in., 2016).

METODYKA

Praca z kopalnym materiałem genetycznym wymaga restrykcyjnego podejścia na każdym etapie analiz, począwszy od odpowiedniego przygotowania sprzętu do pobierania próbek, skończywszy na precyzyjnie dobranych parametrach stosowanych w analizach bioinformatycznych. Próbkę osadu należy pobierać sterylnymi narzędziami w celu uniknięcia ich zanieczyszczenia. Materiał powinien być przechowywany w szczelnie zamkniętych opakowaniach i niskich temperaturach do czasu rozpoczęcia prac laboratoryjnych (Cooper, Poinar, 2000). Prace należy wykonywać w laboratoriach przeznaczonych dla badań kopalnego DNA. Niezbędne są sterylne pomieszczenia zarówno do przeprowadzenia izolacji materiału genetycznego, jak i do wykonywania pozostałych procedur przygotowania materiału do sekwencjonowania. Bez względu na wybraną metodykę, na każdym etapie prac laboratoryjnych należy stosować próbki kontrolne pozbawione materiału biologicznego (Cooper, Poinar, 2000).

Pierwszym etapem prac jest izolacja materiału genetycznego. Slon i in. (2017) poddali testom cztery z najbardziej popularnych metod ekstrakcji DNA z osadu, stosując jako bufony uwalniające DNA: (i) NaHPO₄ (wodorofosforan sodu), (ii) EDTA (kwas wersenowy), (iii) bufor 'Bulat' (Bulat i in., 2000) z dodatkiem proteiny K oraz (iv) zestaw do ekstrakcji PowerMax Soil Isolation Kit (MoBio/Qiagen). Ostatnia z wymienionych metod jest sposobem najprostszym, choć o średniej efektywności, i najbardziej kosztownym. Stosuje się w niej gotowe zestawy do izolacji, które zawierają niezbędne odczynniki i naczynia laboratoryjne wraz z protokołem producenta opisującym każdy etap izolacji. Najbardziej wydajne ekstrakcje uzyskano, bez względu na typ osadu, stosując odczynnik EDTA i wodorofosforan sodu. W przypadku stosowania buforu 'Bulat' ekstrakt uzyskano jedynie z osadu wapiennego, jednak zostały wyizolowane nawet bardzo krótkie odcinki DNA, o długości 25 pz. Najkrótsze fragmenty otrzymane pozostałymi metodami miały długość ok. 35 pz. W związku z powyższym, metodę ekstrakcji należy dobrać pod względem składu chemicznego/mineralogicznego osadu, jego granulometrii, wagi próbki (zazwyczaj 0,1–10 g), oraz mając na uwadze możliwy stopień degradacji materiału genetycznego. Ten zależny jest od źródła DNA, wieku osadu oraz od warunków środowiskowych, w których został zdeponowany (Slon i in., 2017). Ponieważ im DNA jest starsze, tym jest go mniej w osadzie i tym krótsze są jego fragmenty, w przypadku analiz *sedDNA* po ekstrakcji przeprowadza się zwykle koncentrację z użyciem kolumn krzemionkowych, bądź poprzez

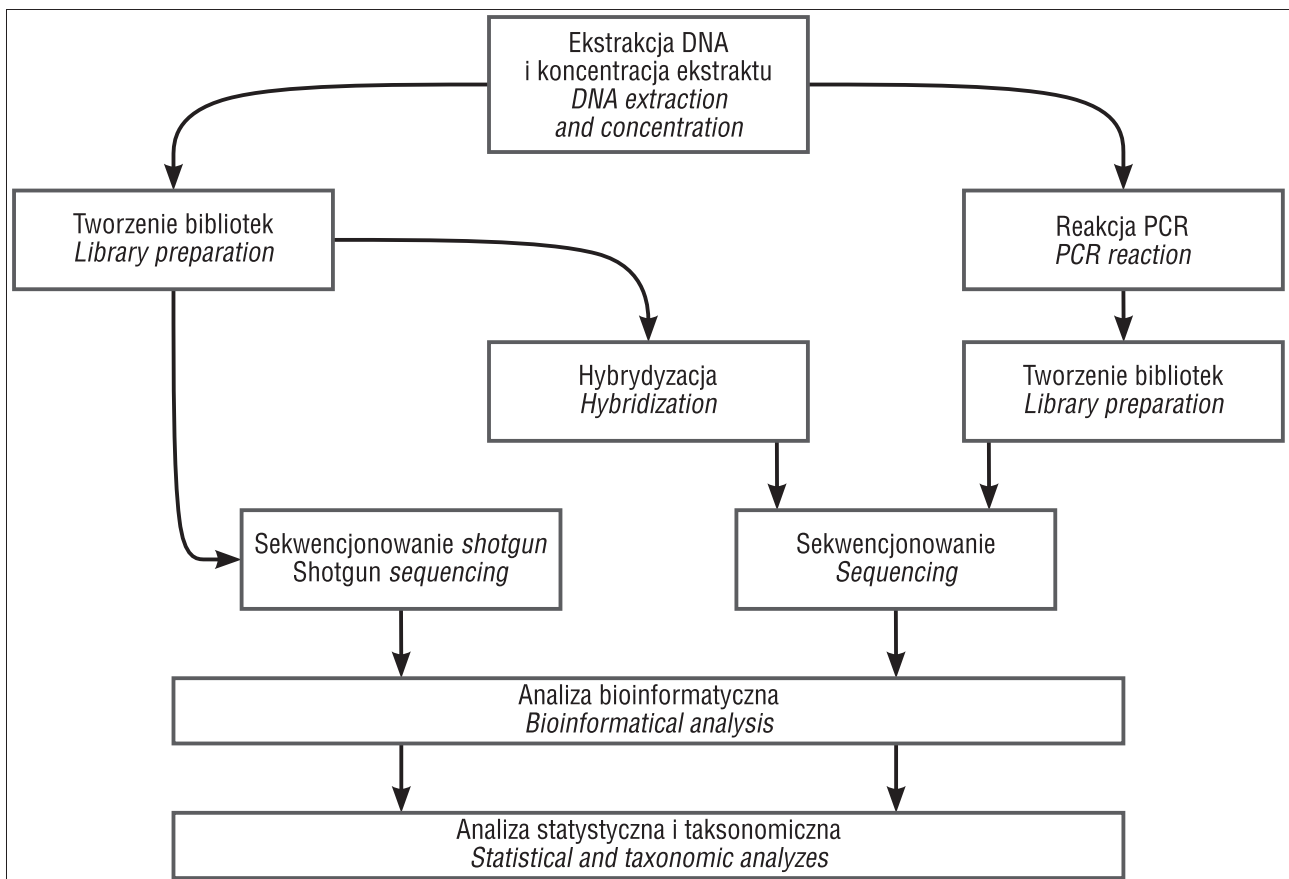
strącanie etanolem w obecności soli (np. NaCl), w celu zwiększenia stężenia DNA w próbce. Dalsze kroki zależą od celu badań i wybranej do jego osiągnięcia metodyki (ryc. 2). W zależności od długości sekwencjonowanych odcinków, a więc zarówno zależnie od stopnia degradacji materiału, jak i tego, czy przedmiotem badań jest krótki fragment genomu czy np. cały genom, należy dobrać odpowiednią platformę do sekwencjonowania. Od tego wyboru są uzależnione szczegółowe procedury przygotowujące sekwencje DNA do analiz, jednak ich ogólne założenia pozostają podobne.

Uzyskany po ekstrakcji materiał składa się z fragmentów DNA wszystkich organizmów bytujących na danym obszarze: bakterii, archeonów, mikroorganizmów eukariotycznych, roślin czy zwierząt. W celu poznania składu taksonomicznego reprezentowanego w danej próbce, należy zsekwencjonować wszystkie wyizolowane sekwencje, np. przeprowadzając tzw. sekwencjonowanie *shotgun*. Jeśli przedmiotem badań jest bioróżnorodność w obrębie konkretnej grupy organizmów czy zmienność genetyczna zawężona do jednego gatunku, przed sekwencjonowaniem z ekstraktu należy wyodrębnić DNA poszukiwanych organizmów, zwiększając zawartość badanych odcinków bądź odrzucając możliwie najwięcej niepotrzebnych sekwencji. Dwoma najczęściej stosowanymi w tym celu metodami są amplifikacja odpowiednich fragmentów genomu za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) oraz ukierunkowane wzbogacanie metodą hybrydyzacji (Maricic i in., 2010; Horn, 2012). Schemat przedstawiający kolejność wykonywania poszczególnych czynności zależnie od wybranej metodyki znajduje się na rycinie 2.

Sekwencjonowanie *shotgun*

Stosując w badaniach technologie sekwencjonowania wysokoprzepustowego (ang. *high-throughput sequencing*, HTS) bądź sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS), wyizolowany materiał należy w odpowiedni sposób przygotować do sekwencjonowania. Wyizolowane sekwencje konwertuje się za pośrednictwem szeregu reakcji chemicznych w zbiór sekwencji jedno- lub dwunucleotydowych (np. Meyer, Kircher, 2010; Gansauge, Meyer, 2013), głównie poprzez dołączenie do nich syntetycznych oligonukleotydów (odcinków kwasów nukleinowych o długości zazwyczaj od kilku do kilkudziesięciu nukleotydów), o sekwencji ustalonej w zależności od roli, którą mają spełniać. Każda sekwencja w zbiorze musi posiadać oznaczenia specyficzne dla próbki, z której pochodzi (nukleotydowe indeksy, znaczniki) (np. Gansauge, Meyer, 2013; Rohland i in., 2014) i być zakończona odcinkami DNA umożliwiającymi jej związanie się z matrycą sekwenatora (adaptery). Protokoły przeprowadzania kolejnych reakcji różnią się w zależności od typu sekwenatora używanego do analiz i wymagań producenta sprzętu. Zbiór odpowiednio przygotowanych sekwencji określa się mianem biblioteki do sekwencjonowania. Po przekształceniu badanych sekwencji w bibliotekę można ją bezpośrednio sekwencjonować, bądź użyć jako materiał np. do ukierunkowanego wzbogacania.

Po przeprowadzeniu sekwencjonowania, surowe dane są poddawane szczegółowej obróbce bioinformatycznej,



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie kolejnych etapów prac wykonywanych podczas analiz *sedaDNA*
Fig. 2. Schematic diagram of major steps of *sedaDNA* laboratory analysis

stanowiącej ostatni etap analiz przed analizą taksonomiczną, statystyczną i interpretacją wyników. Na tym etapie, za pomocą wybranych programów bioinformatycznych, z uzyskanych odczytów m.in. usuwa się sekwencje adapterów oraz wykorzystując dołączone wcześniej indeksy i znaczniki, przyporządkowuje się sekwencje do próbki, z której pochodzą. W zależności od indywidualnie dla danych badań dobranych parametrów, usuwa się sekwencje utworzone w wyniku błędów powstałych np. podczas tworzenia bibliotek czy w trakcie sekwencjonowania. Przygotowane sekwencje są porównywane z dostępną lub nowoutworzoną bazą danych, opartą przeważnie na danych zgromadzonych w National Center for Biotechnological Information (NCBI), np. GenBank.

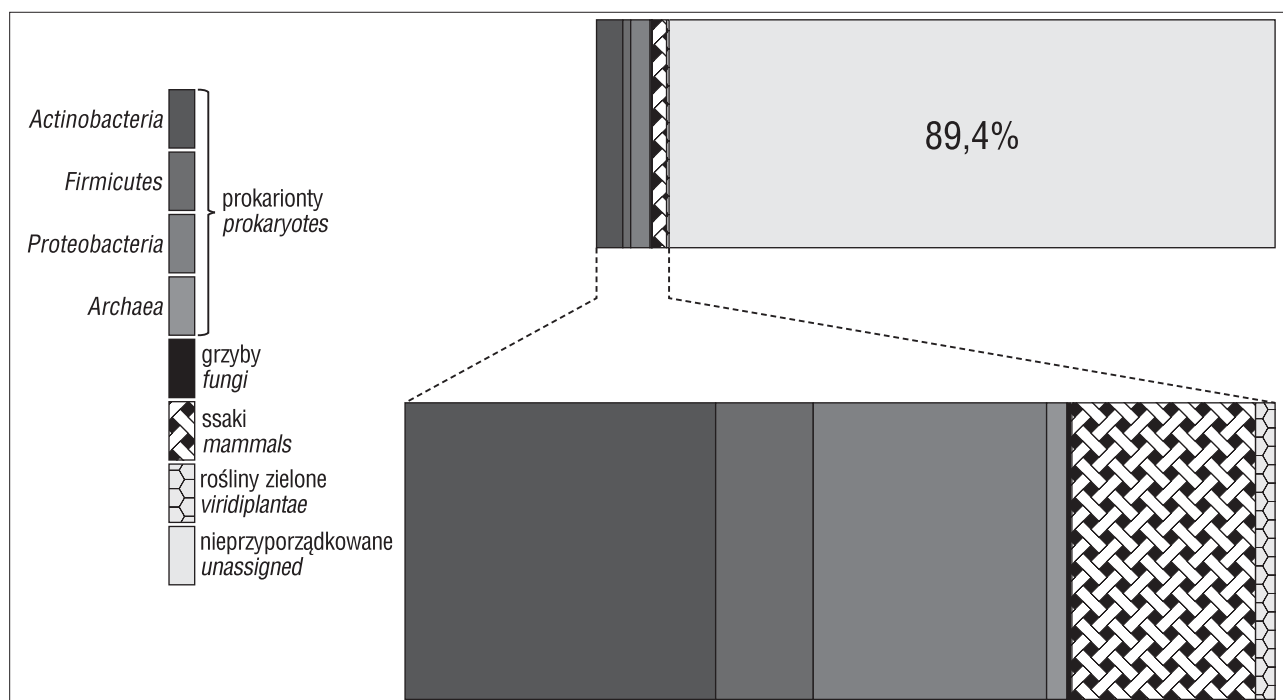
Przykładowy rozkład sekwencji należących do różnych grup organizmów żywych uzyskany metodą sekwencjonowania *shotgun* przedstawia rycina 3. Sekwencjonowanie *shotgun* i analizy taksonomiczne prób osadów zebranych z siedmiu jaskiń znajdujących się w Europie i środkowej Azji wykazały, że blisko 90% sekwencji z wszystkich wyizolowanych prób nie znajduje swoich odpowiedników w bazie NCBI, pozostając niezidentyfikowanymi (Slon i in., 2017). Trochę ponad 10% stanowią sekwencje zidentyfikowane, z których blisko 76% należy do prokariotów. Z pozostałych sekwencji przyporządkowanych, największy udział przypada ssakom, następnie roślinom zielonym. Grzyby stanowią znikomą część. Sekwencje pochodzące z organizmów z innych grup nie przekraczały w sumie 5% wszystkich zidentyfikowanych sekwencji i nie zostały uwzględnione na rycinie 3 (Slon i in., 2017).

We wspomnianych badaniach zdecydowana większość sekwencji nie została przyporządkowana nawet w randze królestwa (ryc. 3), co nasuwa przypuszczenie, że rozkład w obrębie sekwencji zidentyfikowanych może nie być reprezentatywny. Taki stan rzeczy może wynikać z wysokiego stopnia degradacji sekwencjonowanych fragmentów DNA lub dużych różnic między badanymi sekwencjami, a tymi znajdującymi się w bazie danych. Co więcej, mimo ogromnego zbioru rekordów NCBI, do tej pory niewiele genomów i fragmentów genomów współcześnie żyjących, a tym bardziej wymarłych już gatunków, zostało zsekwencjonowanych. Wskazuje to na potrzebę ciągłego powiększania zasobów baz danych, by móc uzyskać pełniejszy obraz zapisu paleobioróżnorodności w analizowanym materiale.

Powyższy przykład pokazuje, że sekwencjonowanie *shotgun* jest metodą użyteczną w analizach ilościowych i jakościowych ogólnego składu taksonomicznego, szczególnie na wyższych szczeblach klasyfikacji. Ponadto doskonale sprawdza się w roli badań pilotażowych przeprowadzanych przed właściwymi analizami. Nie jest jednak metodą wydajną w badaniach zawężonych do różnorodności genetycznej w obrębie jednego czy kilku konkretnych taksonów.

Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR)

W celu wyodrębnienia określonych fragmentów DNA przed sekwencjonowaniem, powszechnie stosowaną metodą jest reakcja PCR. Polega ona na syntezie *in vitro* syntetycznych kopii badanych fragmentów DNA w kilkudziesięciu powtarzających się cyklach termicznych. Do

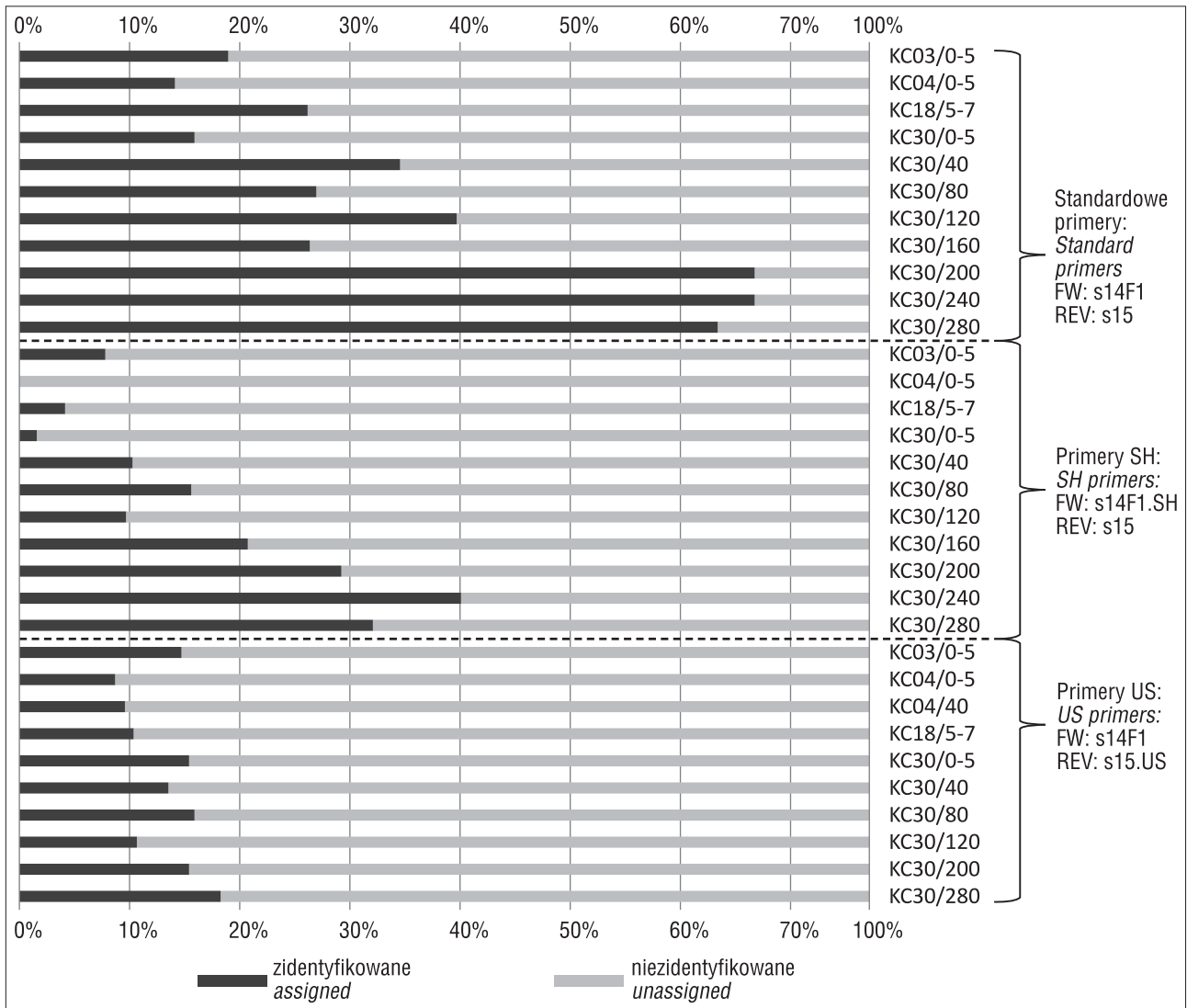


Ryc. 3. Procentowa zawartość sekwencji DNA zaklasyfikowanych do: prokaryotów, grzybów, ssaków i roślin zielonych, uzyskanych po sekwencjonowaniu *shotgun* materiału z osadów jaskiniowych (na podstawie Slon i in., 2017)

Fig. 3. Percentage amount of sequences derived from: prokaryotes, fungi, mammals and vertebrates, obtained from cave sediments after *shotgun* sequencing (based on Slon et al., 2017)

przeprowadzenia tej reakcji niezbędne jest zaprojektowanie pary (bądź kilku par) specyficznych dla badanej grupy organizmów starterów (primerów), czyli oligonukleotydów komplementarnych do fragmentów otaczających analizowany region DNA, oraz wprowadzenie do mieszaniny enzymu (najczęściej Taq polimerazy), wolnych nukleotydów (dNTP) i innych niezbędnych odczynników (Mullis i in., 1987; Clark, Pazdernik, 2012). Wynikiem reakcji PCR jest uzyskanie milionów kopii odcinków DNA będących przedmiotem badań oraz niewielkiej liczby sekwencji należących do pozostałych taksonów. Podobnie jak w przypadku sekwencjonowania *shotgun*, produkt reakcji PCR należy przekształcić w biblioteki do sekwencjonowania, dodając do sekwencji adaptery, pary indeksów i znaczniki, a po sekwencjonowaniu przeprowadzić obróbkę bioinformatyczną, uwzględniając również usunięcie sekwencji starterów, i analizy taksonomiczne. Należy podkreślić fakt, że PCR jest reakcją o charakterze losowym: jedne sekwencje mogą zostać powielone więcej razy niż inne, część może w ogóle nie ulec amplifikacji, przez co przeprowadzenie analiz ilościowych jest niemożliwe przy stosowaniu konwencjonalnej reakcji PCR. Pewien obraz ilościowy dla produktów reakcji PCR daje przeprowadzenie tzw. qPCR (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy, ang. *quantitative PCR*), podczas którego można monitorować przyrost amplikonów w czasie rzeczywistym za pomocą fluorescencyjnych sond. Metoda ta umożliwia m.in. wychwycenie inhibicji (spowolnienia reakcji spowodowanego jakimś odczynnikiem czy substancją chemiczną) podczas PCR, wykorzystywana jest również do kwantyfikacji bibliotek do HTS/NGS (Bunce i in., 2012) i w pewnym przybliżeniu umożliwia oszacowanie ilości poszczególnych sekwencji w materiale wyjściowym (np. Beore i in., 2011).

Na rycinie 4 przedstawiono wstępne wyniki analiz 11 próbek osadów z dna Morza Rossa w Antarktyce. Do badań pobrano zarówno próbki osadów powierzchniowych (KC03: 0–5 cm; KC04: 0–5 cm; KC18: 5–7 cm; KC30: 0–5 cm), jak i podpowierzchniowych (KC30 z głębokości: 40, 80, 120, 160, 200, 240 i 280 cm). Analizy wykonano w celu zidentyfikowania w zapisie DNA gatunków otwornic (Demianiuk i in., 2018). W pracy przeprowadzono konwencjonalne reakcje PCR, stosując trzy pary specyficznych dla otwornic starterów, ograniczających trzy różne odcinki w obrębie hiperzmiennego regionu 37f rDNA (ang. *ribosomal DNA*). Region ten jest odcinkiem DNA małej podjednostki rybosomowej 18S, którego sekwencje różnią się w zależności od gatunku i rodzaju otwornic, oraz w wyższych rangach klasyfikacyjnych u eukariontów (np. Pawłowski i in., 2002). Wyrażony procentowo stosunek przyporządkowanych i nieprzyporządkowanych taksonomicznie OTUs (operacyjne jednostki taksonomiczne, ang. *Operational Taxonomic Units*), czyli zbiorów powtarzających się sekwencji, zwiększa się z głębokością, z której pochodzi próbka, niezależnie od zastosowanej pary starterów. Świadczy to najprawdopodobniej o zmianach w składzie zespołów otwornic, co mogło być wynikiem zmian środowiskowych. Stosunki procentowe przyporządkowanych i nieprzyporządkowanych OTUs zmieniają się również w zależności od stosowanej pary starterów. Może to być wynikiem sugerowanej w literaturze selektywności starterów podczas reakcji PCR (np. Hoshino, Morimoto, 2010), która może powodować zaburzenie rekonstruowanego składu taksonomicznego badanej grupy organizmów. Ponieważ zmniejsza to wiarygodność wyników badań, w analizach składu gatunkowego powinno się stosować kilka par starterów, przeznaczonych do różnych grup organizmów w badanym zespole (np. Holzmann i in., 2003). Jednak w przy-



Ryc. 4. Procentowy stosunek zidentyfikowanych i niezidentyfikowanych OTUs (operacyjne jednostki taksonomiczne, ang. *operational taxonomic units*) dla 11 próbek pobranych z dna Morza Rossa, z sekwencji uzyskanych po amplifikacji PCR z zastosowaniem 3 różnych par starterów specyficznych dla otwornic (na podstawie Demianiuk i in., 2018); KC (nr rdzenia)/(głębokość próbki spod powierzchni osadu, podana w cm)

Fig. 4. Proportion of assigned and unassigned OTUs (operational taxonomic units) in 11 samples from Ross Sea, obtained by PCR amplification used 3 different primer pairs specific for foraminifera (based on Demianiuk et al., 2018); KC (core number)/(sample depth in cm)

padku badań nad zmiennością czy ewolucją genetyczną zachodzącą w obrębie jednego gatunku, ewentualna selektywność starterów, o ile są skuteczne, nie jest istotna, czyniąc analizę ampikonów (produktów) uzyskanych w reakcji PCR metodą zdecydowanie użyteczną.

Wzbogacanie kierunkowe metodą hybrydyzacji

W ostatnich latach coraz szerzej stosuje się metodę ukierunkowanego wzbogacania ekstraktu DNA z użyciem hybrydyzacji (Maricic i in., 2010; Horn, 2012). Procedura ta pozwala nawet kilkusetkrotnie zwiększyć w ekstrakcie DNA udział sekwencji pochodzących od badanego gatunku czy grupy taksonomicznej (Ávila-Arcos i in., 2011). W pierwszej kolejności, analogicznie jak w przypadku przygotowania materiału do sekwencjonowania *shotgun*, DNA jest przekształcane w biblioteki do sekwencjonowania. Następnie poddaje się je wzbogaceniu z zastosowaniem odpowiednich sond. Sondami są fragmenty DNA

charakteryzujące się wysokim stopniem podobieństwa do badanego gatunku lub grupy taksonomicznej (np. Fu i in., 2012; Palkopoulou i in., 2015; Slon i in., 2017; Baca i in., 2018). Sondy muszą być odpowiednio przygotowane chemicznie, żeby można było je w prosty sposób usunąć później z reakcji. Sonda działa jak „przynęta” – pożądane fragmenty DNA hybrydują do niej komplementarnie. Niezhybrydowane fragmenty DNA, pochodzące z innego rodzaju organizmu czy grupy, niż badane, pozostają w roztworze. W ten sposób materiał poddawany sekwencjonowaniu jest w znacznym stopniu wzbogacony w interesujące nas fragmenty DNA. Ukierunkowane wzbogacanie metodą hybrydyzacji jest doskonałym narzędziem do odtwarzania genomów kopalnych gatunków. W przypadku badań środowiskowych i analiz większej grupy organizmów metoda ta daje pełniejsze i bardziej wiarygodne wyniki, niż reakcja PCR, również w kwestii składu gatunkowego danej grupy (Maricic i in., 2010; Horn, 2012).

ZASTOSOWANIE ANALIZ *sedaDNA*

W jednej z pierwszych prac, w których zastosowano analizę *sedaDNA* (Willerslev i in., 2003), materiał do badań uzyskano z obszaru wieloletniej zmarzliny z obszaru syberyjskiej tundry oraz z Nowej Zelandii z osadów jaskiniowych, nadmorskich wydm i piasku wypełniającego kość wymarłego rodzaju ptaka, moa. Próbkę wieloletniej zmarzliny obejmowały osady od współczesnych do datowanych na 1,5–2 mln lat, a wiek próbek nowozelandzkich wynosił od 600 do 3000 lat. Przy pobieraniu próbek zastosowano wszelkie niezbędne środki zapobiegające kontaminacji, m.in. rdzenie z wieloletniej zmarzliny pozyskane zostały w kontrolowanej obecności laboratoryjnych szczepów *Serratia marcescens*. Prace laboratoryjne były prowadzone równolegle w dwóch niezależnych od siebie ośrodkach. Do amplifikacji metodą PCR wybrano odcinek chloroplastowego DNA (gen *rbcL*) oraz cztery fragmenty mitochondrialnego genomu kręgowców. Zmienność w obrębie wybranych fragmentów genomów umożliwia klasyfikację taksonomiczną odczytanych sekwencji odpowiednio roślin i zwierząt.

Produkty reakcji PCR dla sekwencji genu *rbcL* uzyskano z próbek mających maksymalnie do 300–400 tys. lat, natomiast dla odcinków pochodzących z kręgowców – do 20–30 tys. lat. Odczytane sekwencje genu *rbcL* porównano z bazą GenBank, stosując $\geq 96\%$ próg zgodności na możliwie najniższym szczeblu taksonomicznym. Sekwencje fragmentów mitochondrialnego DNA kręgowców wyszukano w bazie NCBI za pomocą platformy BLAST (ang. *The Basic Local Alignment Search Tool*), szukając najbardziej podobnych sekwencji (przeważnie powyżej 96% zgodności). Analizując wyniki, nie wykryto śladów *Serratia marcescens*, co potwierdziło znikomą możliwość zanieczyszczenia prób współczesnym materiałem genetycznym. Wszystkie zidentyfikowane sekwencje *rbcL* przyporządkowano w sumie do 19 klas/podklas, 23 rzędów i 28 rodzin, obejmujących rośliny nago- i okrytonasienne oraz mchy. W porównaniu do próbek syberyjskich, w próbkach z Nowej Zelandii zanotowano znacznie większą różnorodność taksonomiczną fragmentów DNA na podstawie analizy genu *rbcL*. Wyniki analiz DNA kręgowców uzyskane z obydwu lokalizacji przedstawiały wiarygodne dane: na obszarze Syberii zidentyfikowano m.in. DNA mamuta, renifera czy piżmowoła arktycznego, a w próbkach pochodzących z nowozelandzkiej jaskini – DNA dwóch śródłądowych gatunków moa i jednego gatunku papugi. Analizy piasku wydymowego dały wynik negatywny, natomiast w próbce piasku wypełniającego kość moa zidentyfikowano DNA moa żyjącego niegdyś u wybrzeży Nowej Zelandii, innego niż rozpoznane w próbkach z jaskini.

Uzyskane z próbek wieloletniej zmarzliny DNA taksonów roślinnych autorzy podzielili na 3 grupy: rośliny zielne (przeważnie jednoroczne, nieposiadające części zdrewniałych), krzewy oraz mchy. Diagram na rycinie 5 przedstawia wyraźny trend zmian w udziale roślin zielnych i krzewów, wskazujący na zmianę warunków środowiskowych po maksimum ostatniego zlodowacenia (ang. *Last Glacial Maximum*, LGM), które na półkuli północnej miało miejsce ok. 20 tys. lat temu. Zwiększające się proporcje taksonów nie wykrytych w każdym kolejnym przedziale czasowym, wskazują na zasiedlanie terenów przez coraz to większą

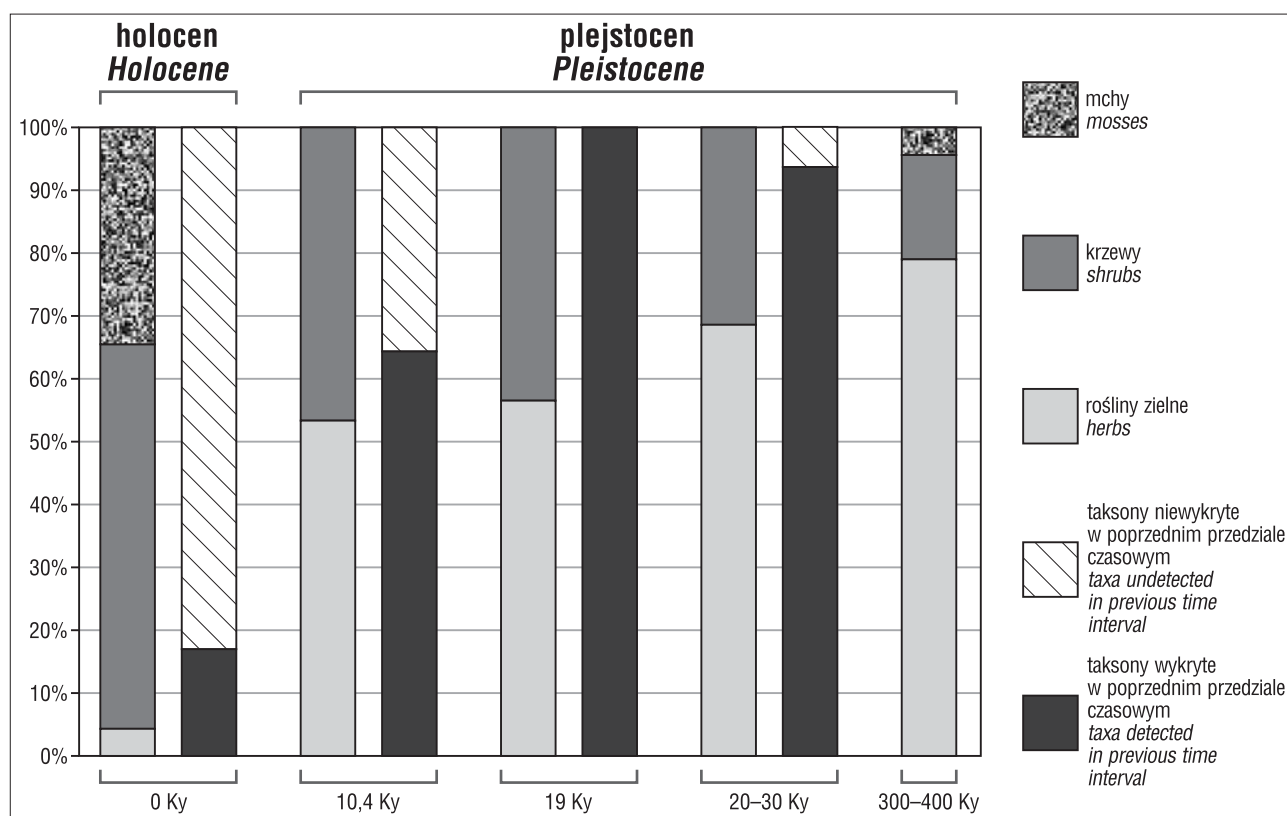
ilość nowych taksonów, co mogło być odpowiedzią na zmiany klimatu. Obecność mchów zarówno w przedziale 300–400 tys. lat, jak i w próbkach współczesnych odpowiada cieplejszym, ale przede wszystkim wilgotnym okresom interglacjalnym. Należy zaznaczyć, że tak duże różnice w zespołach roślinnych, reprezentowanych w próbkach różnego wieku, podkreślają zgodność stratygraficzną badanego materiału genetycznego z warstwami osadów (Willerslev i in., 2003).

W omawianej pracy (Willerslev i in., 2003) wykazano, że analiza *sedaDNA* może być z powodzeniem stosowana w określaniu zmian bioróżnorodności na podstawie materiału uzyskanego ze środowisk lądowych i przybrzeżnych, znajdującego się w osadach zarówno w klimacie subpolarnym, jak i umiarkowanym. Jednakże w przypadku wszystkich sekwencji pochodzących z próbek zachowanych w klimacie umiarkowanym, autorzy zaobserwowali znaczące zmiany w obrębie sekwencji, wskazujące na ich degradację, podczas gdy w próbkach z klimatu subpolarnego uszkodzenia takie były pojedyncze. Podkreśliło to odnotowywane wcześniej znaczenie odpowiednich warunków fizykochemicznych i klimatycznych na stopień zachowania DNA.

W swojej późniejszej pracy Willerslev i in. (2014) zbadał 242 próbki wieloletniej zmarzliny datowane na maksymalnie 50 tys. lat, uzyskane z różnych obszarów tundry otaczających Ocean Arktyczny. Analizowali krótki fragment genu *trnL* w obrębie genomu chloroplastowego, pętlę P6 o długości ok. 40 pz (Taberlet i in., 2007). Pętla P6 ma sekwencję krótszą o ok. 90 pz niż fragment genu *rbcL*, badany w pracy Willerslev i in. (2003). Niewielka długość pętli P6 sprawia, że jest ona bardzo użyteczna w identyfikacji w przypadku zdegradowanego materiału. Ponadto na podstawie sekwencji tego odcinka możliwe jest jej przyporządkowanie nawet na poziomie gatunku (Taberlet i in., 2007).

Zarówno próbki z okresu poprzedzającego LGM, jak i po LGM, posiadały wyraźnie większe zróżnicowanie genetyczne w obrębie poszczególnych grup roślin, niż te z samego LGM. Okresy interglacjalów charakteryzowały się kompozycją taksonomiczną bogatszą w rośliny o bardziej skomplikowanej budowie (drzewa, krzewy), w stosunku do okresu ostatniego glacjału, zdominowanego przez rośliny charakterystyczne dla stepowej tundry: drobne rośliny zielne i trawy (Willerslev i in., 2014).

Willerslev i in. (2003, 2014) w obydwu przytoczonych pracach zwracają uwagę na istotny z punktu widzenia geologa czy palinologa fakt, że większość roślin nagonasiennych, jak trawy czy turzyce, produkuje znaczne ilości pyłków rozprzestrzeniających się wraz z wiatrem i wodami, dominując w analizach palinologicznych udział pyłków produkowanych przez rośliny zapyłane przez owady. Może to powodować błędne interpretacje składu taksonomicznego i zawartości poszczególnych rodzajów roślin na podstawie danych palinologicznych. W pyłkach roślinnych zasadniczo nie występuje chloroplastowe DNA, nie mogąc tym samym być jego źródłem w osadzie. Ponadto stosując analizę DNA, istnieje duże prawdopodobieństwo identyfikowania sekwencji na poziomie gatunku czy rodzaju, podczas gdy niewielkie zróżnicowanie morfologiczne pyłków pozwala na klasyfikację jedynie na wyższych szczeblach taksonomicznych (Taberlet i in., 2007; Willerslev i in.,



Ryc. 5. Procentowy udział krzewów, roślin zielnych i mchów w badanych przedziałach czasowych (słupki po lewej stronie) oraz proporcja taksonów wykrytych i niewykrytych w danym okresie czasowym w stosunku do okresu go poprzedzającego (słupki po prawej stronie); wiek w tysiącach lat (ky); (na podstawie Willerslev et al., 2003)

Fig. 5. The percentage contribution of shrubs, herbs and mosses for each time period (charts to the left), with proportion of all taxa detected/undetected in the previous time interval (charts to the right); age in thousands of years (ky); (based on Willerslev et al., 2003)

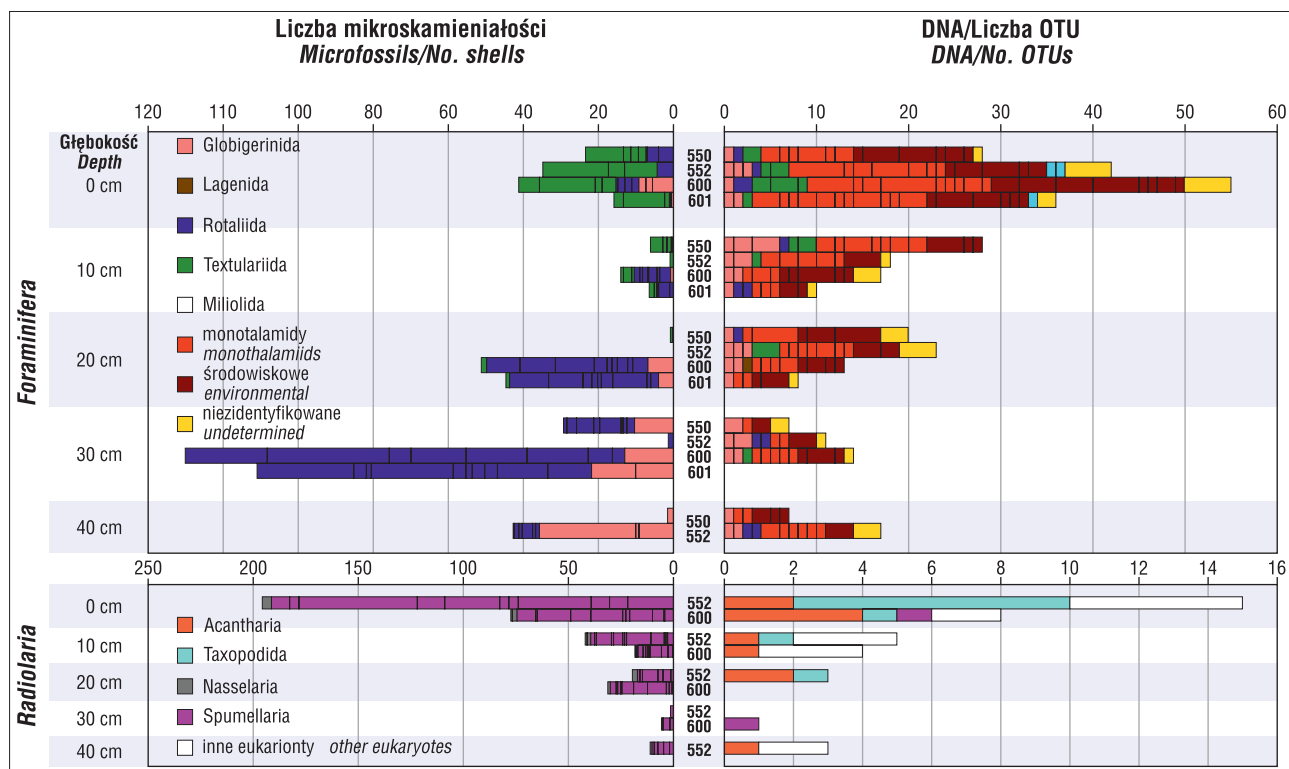
2014). Analiza fragmentów genu chloroplastowego może zatem stanowić niezwykle użyteczne i wiarygodne narzędzie do jakościowej weryfikacji wyników badań paleośrodowiskowych uzyskanych metodami palinologicznymi.

Analiza *sedaDNA* ma niezwykle szerokie zastosowanie w badaniach bioróżnorodności morskich paleośrodowisk. Lejzerowicz i in. (2013) przeprowadzili porównanie wyników analiz składu taksonomicznego otwornic i radiolarii, uzyskanych klasycznymi metodami mikropaleontologicznymi oraz otrzymanych z analiz *sedaDNA*. Próbkę osadów pochodziły z dna równi abysalnych w południowej części Oceanu Atlantyckiego. Pobrane zostały 4 rdzenie o numerach 550, 552, 600 i 601 (ryc. 6), z głębokości odpowiednio 4475,9; 4463; 5181,3 i 5189 m p.p.m. Wiek osadów na głębokości 30 cm w rdzeniu 550 wydatowany metodą AMS14C (ang. *accelerator mass spectrometry*) wyniósł 11870 ± 70 lat, dla osadów z tej samej głębokości z rdzenia 601 było to 28950 ± 260 lat.

Na rycinie 6 przedstawiono ilość zliczonych mikroskamieniałości otwornic i radiolarii z poszczególnych rodzajów oraz ilość OTUs utworzonych z powtarzających się sekwencji uzyskanych z analiz genetycznych. Wraz ze wzrostem głębokości pod powierzchnią osadu, malała zawartość szkieletów radiolarii, wzrastała natomiast ilość skorupki otwornic. Sekwencje DNA uzyskano ze wszystkich badanych próbek, jednak w przypadku obydwu grup organizmów zaznaczał się wyraźny spadek ilości OTUs wraz ze wzrostem głębokości pod powierzchnią osadu, co przekładało się na mniejszą różnorodność w starszych próbkach. W przypadku radiolarii w próbkach przyupo-

wierzchniowych sekwencje były skupione w 15 OTUs, w próbkach poniżej 10 cm głębokości w mniej niż 5 OTUs. Również długość sekwencji należących do otwornic, zamplifikowanych podczas reakcji PCR, malała wraz z głębokością próbki pod powierzchnią osadu. W przypadku próbek powierzchniowych uzyskano sekwencje długości ok. 1000 pz, w próbkach z 10 cm ok. 350 pz, w niższych warstwach osadów sekwencje miały ok. 100 pz. Zdecydowana większość, bo 77,5% przyporządkowanych sekwencji otwornic, należało do grupy monotalamidów, otwornic niewytwarzających skorupki, które mogłyby się zachować w stanie kopalnym. Nie obserwowane w zapisie kopalnym rodzaje radiolarii *Taxopodida* i *Acantharia* dominowały w próbkach powierzchniowych ilością odpowiednio 8 i 6 OTUs. W znakomitej większości przypadków taksony zachowane w postaci mikroskamieniałości były reprezentowane także w zapisie genetycznym.

Zmiany w ilości mikroskamieniałości i ich różnorodności w obrębie obydwu badanych grup mogły być wyrazem zmian środowiskowych w czasie i po LGM, tj. zmiany poziomu oceanu światowego, temperatur czy głębokości CCD (ang. *carbonate compensation depth*). Te zmiany środowiskowe mogły być odpowiedzialne również za znaczny wzrost różnorodności zespołów otwornic i radiolarii zidentyfikowany analizą *sedaDNA* w młodszych osadach. Badania Lejzerowicza i in. (2013) pokazują, że stosując analizy genetyczne, uzyskuje się bardziej kompletny obraz paleobioróżnorodności, obejmujący taksony, które nie mają możliwości zapisania się w stanie kopalnym, istotnie zmieniając proporcje w rekonstruowanych zespołach



Ryc. 6. Skład taksonomiczny otwornicy (*Foraminifera*) i radiarii (*Radiolaria*) w czterech badanych rdzeniach (numery w środkowej części wykresu). Po lewej: zliczenia mikroskamieniałości; po prawej: ilość odczytanych sekwencji pogrupowanych w OTUs (na podstawie Lejzerowicza i in., 2013); pozostałe objaśnienia w tekście

Fig. 6. Taxonomic composition of *Foraminifera* and *Radiolaria* in four analyzed cores (names of cores in the middle part of graph). On the left side: micropaleontological counts; on the right side: number of OTUs (based on Lejzerowicz et al., 2013); for more comment see the text

mikroorganizmów. Powyższe wyniki pozostały w zgodzie z opisywaną wcześniej postępującą degradacją DNA z biegiem czasu, co jednocześnie wykluczyło możliwość migracji materiału genetycznego w profilu pionowym, nawet w przestrzeni zaledwie 10 cm.

PODSUMOWANIE

Metody wykorzystywane w analizach *sedaDNA* zostały stosunkowo niedawno opracowane i obecnie są na etapie ciągłego rozwoju i doskonalenia. Mimo to, paleogenetyka jest niezwykle przyszłościową dziedziną badań, dostarczającą nowych możliwości w odtwarzaniu dawnych ekosystemów, ich bioróżnorodności oraz zmian, które w nich zachodziły.

Dotychczasowe prace wykazały jednoznacznie, że wiek osadów, dla których można stosować analizę *sedaDNA*, wzrasta ze wzrostem szerokości geograficznej. Klimat polarny i subpolarny daje największe szanse na zachowanie się fragmentów DNA, chroniąc je przed procesami degradacji. Ze względu na specyfikę budowy DNA, charakterystycznego dla jednego tylko organizmu, ale też posiadającego fragmenty unikatowe dla danej grupy, rodzaju, królestwa czy domeny, można wykorzystywać analizy materiału genetycznego do badań nad dowolnymi organizmami i, w zależności od celu badań, w wybranej randze taksonomicznej. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe publikacje prezentujące wyniki analiz *sedaDNA*, opartych na badaniach materiału genetycznego pochodzącego z różnych źródeł i środowisk.

Wiele aspektów związanych z paleośrodowiskowymi i paleobiologicznymi badaniami wykorzystującymi analizę *sedaDNA* nie jest do końca poznanych. Nie są w pełni rozpoznane procesy fizykochemiczne i biologiczne, które mają wpływ na degradację i przeobrażenie kwasów nukleinowych w osadzie oraz mechanizmy odpowiedzialne np. za sugerowaną w literaturze migrację DNA między warstwami sedymentacyjnymi (np. Haile i in., 2007). Potrzebne są dalsze badania nad przebiegiem degradacji DNA w zależności od różnych środowisk i warunków klimatycznych. Istnieje także potrzeba dopracowania metodyki uwzględniającej powyższe zróżnicowanie, dedykowanej *stricto* do analiz *sedaDNA*. Ponadto analizy genetyczne obarczone są możliwością zaistnienia szeregu błędów zarówno na etapie prac laboratoryjnych (inhibicja przy PCR, czy powstawanie tzw. artefaktów w trakcie kolejnych reakcji), które mogą zaburzać uzyskane wyniki. Błędy te są często trudne bądź niemożliwe do wychwycenia na etapie czynności laboratoryjnych czy podczas obróbki bioinformatycznej. Istotnym problemem jest również prowadzenie interpretacji ilościowych w analizach genetycznych, ponieważ ilość uzyskanych sekwencji w wyizolowanym materiale nie jest bezpośrednim odzwierciedleniem liczebności konkretnych gatunków czy grup organizmów – ilość uzyskanych po sekwencjonowaniu sekwencji może zależeć od liczby kopii materiału genetycznego czy długości pewnych odcinków, a te są różne dla różnych gatunków (Pawłowski i in., 2014). Największym wyzwaniem jest dalsze budowanie ogólnodostępnych, międzynarodowych baz danych genomowych, powiększając je zasoby o sek-

Tab. 1. Przykłady publikacji, w których wykorzystano analizę *sedDNA*
 Table 1. Examples of publications using *sedDNA* analysis

Przykład pracy <i>References</i>	Cel badań <i>Research goal</i>	Źródło badanego DNA <i>Source of DNA</i>	Przybliżony wiek osadów [w latach] <i>Approximate age of sediments [years]*</i>	Typ osadów <i>Sediment type</i>	Klimat <i>Climate</i>
Willerslev i in. (2003) <i>Willerslev et al. (2003)</i>	zmiany klimatu, paleobioróżnorodność <i>climate change, paleobiodiversity</i>	chloroplasty <i>chloroplast</i>	2 mln do współczesnych <i>2 Ma to modern</i>	ładowe przybrzeżne, jaskiniowe, wieloletnia zmarzlina <i>coastal, cave sediments, permafrost</i>	subpolarny, umiarkowany <i>subpolar; temperate</i>
Boere i in. (2011) <i>Boere et al. (2011)</i>	paleoekologia <i>paleoecology</i>	eukariota, bruzdnice, haptofity <i>eukariota, dinoflagellate, haptophytes</i>	125 tys. do 9 tys. <i>125 Ka to 9 Ka</i>	morskie <i>marine</i>	podzwrotnikowy <i>subtropical</i>
Coolen (2011) <i>Coolen (2011)</i>	paleoekologia <i>paleoecology</i>	wirusy, algi <i>viruses, algae</i>	7 tys. do współczesnych <i>7 Ka to modern</i>	morskie <i>marine</i>	umiarkowany <i>temperate</i>
Lejzerowicz i in. (2013) <i>Lejzerowicz et al. (2013)</i>	paleoekologia, zmiany w bioróżnorodności <i>paleoecology, biodiversity changes</i>	otwornice, radiolarie <i>foraminifera, radiolaria</i>	33 tys. do 12 tys. <i>33 Ka to 12 Ka</i>	głębokomorskie <i>deep sea</i>	zwrotnikowy <i>subtropical</i>
Willerslev i in. (2014) <i>Willerslev et al. (2014)</i>	rekonstrukcja paleośrodowisk, zmiany klimatu <i>paleoenvironmental reconstruction, climate change</i>	chloroplasty, treść pokarmowa i koprolity dużych ssaków <i>chloroplast, mammalian coprolites and gut contents</i>	50 tys. do współczesnych <i>50 Ka to modern</i>	ładowe, wieloletnia zmarzlina <i>land, permafrost</i>	subpolarny <i>subpolar</i>
Boessenkool i in. (2014) <i>Boessenkool et al. (2014)</i>	paleoekologia <i>paleoecology</i>	chloroplasty <i>chloroplast</i>	7,8 tys. do współczesnych <i>7.8 Ka to modern</i>	bagienne, jeziorne <i>swamp, lacustrine</i>	równikowy <i>tropical</i>
Alsos i in. (2015) <i>Alsos et al. (2015)</i>	zmiany klimatu <i>climate change</i>	chloroplasty <i>chloroplast</i>	8 tys. do 1,3 tys. <i>8 Ka to 1.3 Ka</i>	jeziorne <i>lacustrine</i>	polarny <i>polar</i>
Pawlowska i in. (2015) <i>Pawlowska et al. (2015)</i>	zmiany klimatu, paleoceanografia <i>climate change, paleoceanography</i>	otwornice <i>foraminifera</i>	1 tys. do współczesnych <i>1 Ka to modern</i>	morskie <i>marine</i>	polarny <i>polar</i>
Kirkpatrick i in. (2016) <i>Kirkpatrick et al. (2016)</i>	paleoekologia <i>paleoecology</i>	chloroplasty <i>chloroplast</i>	1,4 mln do 1 tys. <i>1.4 Ma to 1 Ka</i>	morskie <i>marine</i>	subpolarny/umiarkowany <i>subpolar/temperate</i>
Szczuciński i in. (2016) <i>Szczuciński et al. (2016)</i>	identyfikacja geozagrożeń <i>geohazards</i>	otwornice <i>foraminifera</i>	2,8 tys. do współczesnych <i>2.8 Ka to modern</i>	ładowe przybrzeżne <i>coastal</i>	umiarkowany <i>temperate</i>
Slon i in. (2017) <i>Slon et al. (2017)</i>	paleogeografia hominidów <i>hominid paleogeography</i>	wszystkie grupy organizmów żywych; ssaki, hominidy <i>all groups of living organisms, mammals, hominids</i>	690 tys. do 14 tys. <i>690 Ka to 14 Ka</i>	jaskiniowe <i>cave sediments</i>	umiarkowany <i>temperate</i>
Vuillemin i in. (2017) <i>Vuillemin et al. (2017)</i>	paleoekologia <i>paleoecology</i>	bakterie, archeony <i>bacteria, archaea</i>	1750 do współczesnych <i>1750 BP to modern</i>	jeziorne <i>lacustrine</i>	równikowy <i>tropical</i>

* Ka – thousands of years ago; Ma – millions of years ago; BP – before present

wencje DNA należące zarówno do organizmów współcześnie żyjących, jak i pochodzące ze szczątków kopalnych. Rozbudowanie baz danych przyczyni się do postępu w badaniach współczesnych organizmów i środowisk, a także w paleobiologii ewolucyjnej, paleogenetyce czy geologii, ponieważ może w istotnym stopniu odsłonić skład taksonomiczny, kryjący się dotychczas pod hasłem „niezidentyfikowane”.

Autorzy pragną podziękować dr Danijeli Popović i dr. Mateuszowi Bacy za wsparcie merytoryczne udzielone podczas pracy nad tą publikacją oraz dr Joannie Pawłowskiej i dr. hab. Witoldowi Szczucińskiemu za wartościowe uwagi poczynione w recenzjach. Wstępne wyniki analiz przedstawione na rycinie 4 są częścią badań wykonywanych i finansowanych z projektu NCN-2015/17/B/ST10/03346: *Otwornice bentosowe spod lodowca szelfowego jako klucz do odtworzenia zmian środowiskowych i ich chronologii po Maksimum Ostatniego Zlodowacenia, Morze Rossa, Antarktyka* (kierownik dr hab. Wojciech Majewski).

Zdjęcia zaprezentowane na str. 713 wykonano podczas zaokrętowania i rejsu NBP1502 na statku Nathaniel B. Palmer w 2015 roku. Rejs był finansowany z projektów National Science Foundation (USA): *Evidence for Paleo Ice Stream Collapse in the Western Ross Sea since the Last Glacial Maximum* (kierownik prof. John B. Anderson) oraz *Timing and duration of LGM and post-LGM grounding events in the Whales Deep paleo ice streams, Eastern Ross Sea continental shelf* (kierownik dr Phil Bart). Udział w rejsie E. Demianiuk był dofinansowany ze środków Centrum Studiów Polarnych.

LITERATURA

- ALSOS I.G., SJÖGREN P., EDWARDS M.E., LANDVIK J.Y., GIELLY L., FORWICK M., COISSAC E., BROWN A.G., JAKOBSEN L.V., FØREID M.K., PEDERSEN M.W. 2015 – Sedimentary ancient DNA from Lake Skartjorna, Svalbard: Assessing the resilience of arctic flora to Holocene climate change. *The Holocene*. DOI: 10.1177/0959683615612563.
- ÁVILA-ARCOS M.C., CAPPELLINI E., ROMERO-NAVARRO J.A., WALES N., MORENO-MAYAR J.V., RASMUSSEN M., FORDYCE S.L., MONTIEL R., VIELLE-CALZADA J.P., WILLERSLEV E., GILBERT M.T.P. 2011 – Application and comparison of large-scale solution-based DNA capture-enrichment methods on ancient DNA. *Scientific Reports*, 1 (74). DOI: 10.1038/srep00074.
- BACA M., POPOVIĆ D., PANAGIOTOPOULOU H., MARCISZAK A., KRAJCARZ M., KRAJCARZ M.T., MAKOWIECKI D., WĘGLEŃSKI P., NADACHOWSKI A. 2018 – Human-mediated dispersal of cats in the Neolithic Central Europe. *Heredity (The Gen. Soc.)*. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0071-4>
- BAER R., BANKIER A.T., BIGGIN M.D., DEININGER P.L., FARRELL P.J., GIBSON T.J., HATFULL G., HUDSON G.S., SATCHWELL S.C., SÉGUIN C., TUFFNELL P.S., BARRELL B.G. 1984 – DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310: 207–211.
- BLUM S., LORENZ M.G., WACKERNAGEL W. 1997 – Mechanism of Retarded DNA Degradation and Prokaryotic Origin of DNases in Non-sterile Soils. *System. Appl. Microbiol.*, 20: 513–521.
- BOERE A.C., RIJSTRA W.I.C., DE LANGE G.J., SINNINGHE DAMSTE J.S., COOLEN M.J.L. 2011 – Preservation potential of ancient plankton DNA in Pleistocene marine sediments. *Geobiology*, 9: 377–393.
- BOESSENKOOL S., McGLYNN G., EPP L.S., TAYLOR D., PIMENTEL M., GIZAW A., NEMOMISSA S., BROCHMANN C., POPP M. 2014 – Use of Ancient Sedimentary DNA as a Novel Conservation Tool for High-Altitude Tropical Biodiversity. *Conserv. Biol.*, 28 (2): 446–455.
- BULAT S., LÜBECK M., ALEKHINA I.A., JENSEN D.F., KNUDSEN I.M.B., LÜBECK P.S. 2000 – Identification of a Universally Primed-PCR-Derived Sequence-Characterized Amplified Region Marker for an Antagonistic Strain of *Clonostachys rosea* and Development of a Strain-Specific PCR Detection Assay. *Appl. Env. Microbiol.*, 66 (11): 4758–4763.
- BUNCE M., OSKAM C.L., ALLENTOFT M.E. 2012 – Quantitative Real-Time PCR in aDNA Research. [W:] Shapiro B., Hofreiter M. *Ancient DNA. Methods and protocols, methods in molecular biology*. Clifton, N.J., Humana Press, Totowa, NJ. 840: 121–132.
- CLARK D., PAZDERNIK N. 2012 – *Molecular Biology*, 2nd Edition. Academic Cell. Chapter 6: Polymerase Chain Reaction, 163–193.
- COOLEN M.J.L. 2011 – 7000 years of *Emiliana huxleyi* viruses in the Black Sea. *Science*, 333: 451–452.
- COOPER A., POINAR H.N. 2000 – Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, 289: 1139.
- DAHM R. 2005 – Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278: 274–288.
- DEMIANIUK E., MAJEWSKI W., BACA M., POPOVIĆ D., PROTHRO L., SIMKINS L., ANDERSON J. 2018 – Complementary eDNA and micropaleontological foraminiferal record from Ross Sea. POLAR 2018: SCAR&IASC Open Science Conference. 15–26.06.2018r., Davos. Abstract No. A-938-0021-01441.
- FLEISCHMANN R.D., ADAMS M.D., WHITE O., CLAYTON R.A., KIRKNESS E.F., KERLAVAGE A.R., BULT C.J., TOMB J.F., DOUGHERTY B.A., MERRICK J.M., MCKENNEY K., SUTTON G., FITZHUGH W., FIELDS C., GOCAYNE J.D., SCOTT J., SHIRLEY R., LIU L.L., GLODEK A., KELLEY J.M., WEIDMAN J.F., PHILLIPS C.A., SPRIGGS T., HEDBLUM E., COTTON M.D., UTTERBACK T.R., HANNA M.C., NGUYEN D.T., SAUDEK D.M., BRANDON R.C., FINE L.D., FRITCHMAN J.L., FUHRMANN J.L., GEOGHAGEN N.S.M., GNEHM C.L., MCDONALD L.A., SMALL K.V., FRASER C.M., SMITH H.O., VENTERT J.C. 1995 – Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269: 496–512.
- FU Q., MEYER M., GAO X., STENZEL U., BURBANO H.A., KELSO J., PÄÄBO S. 2012 – DNA analysis of an early modern human from Tianyuan Cave, China. *PNAS*, 110 (6): 2223–2227.
- GANSAUGE M.T., MEYER M. 2013 – Single-stranded DNA library preparation for the sequencing of ancient or damaged DNA. *Nature Protocols*, 8 (4): 737–748.
- GILBERT M.T.P., DRAUTZ D.I., LESK A.M., HO S.Y.W., QI J., RATAN A., HSU C., SHER A., DALÉN L., GÖTHERSTRÖM A., TOMSHO L.P., RENDULIC S., PACKARD M., CAMPOS P.F., KUZNETSOVA T.V., SHIDLOVSKIY F., TIKHONOV A., WILLERSLEV E., IACUMIN P., BUIGUES B., ERICSON P.G.P., GERMONPRÉ M., KOSINTSEV P., NIKOLAEV V., NOWAK-KEMP M., KNIGHT J.R., IRZYK G.P., PERBOST C.S., FREDRIKSON K.M., HARKINS T.T., SHERIDAN S., MILLER W., SCHUSTERB S.C. 2008 – Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105 (24): 8327–8332.
- GOFFEAU A., BARRELL B.G., BUSSEY H., DAVIS R.W., DUJON B., FELDMANN H., GALIBERT F., HOHEISEL J.D., JACQ C., JOHNSTON M., LOUIS E.J., MEWES H.W., MURAKAMI Y., PHILIPPSEN P., TETTELIN H., OLIVER S.G. 1996 – Life with 6000 genes. *Science*, 274 (5287): 546–567.
- GREEN R.E., KRAUSE J., BRIGGS A.W., MARICIC T., STENZEL U., KIRCHER M., PATTERSON N., LI H., ZHAI W., FRITZ M.H., HANSEN N.F., DURAND E.Y., MALASPINAS A.S., JENSEN J.D., MARQUES-BONET T., ALKAN C., PRÜFER K., MEYER M., BURBANO H.A., GOOD J.M., SCHULTZ R., AXIMU-PETRI A., BUTTHOF A., HÖBER B., HÖFFNER B., SIEGEMUND M., WEIHMANN A., NUSBAUM C., LANDER E.S., RUSS C., NOVOD N., AFFOURTIT J., EGHOLM M., VERNA C., RUDAN P., BRAJKOVIC D., KUCAN Ž., GUŠIĆ I., DORONICHEV V.B., GOLOVANOVA L.V., LALUEZA-FOX C., DE LA RASILLA M., FORTEA J., ROSAS A., SCHMITZ R.W., JOHNSON P.F., EICHLER E.E., FALUSH D., BIRNEY E., MULLIKIN J.C., SLATKIN M., NIELSEN R., KELSO J., LACHMANN M., REICH D., PÄÄBO S. 2010 – A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science*, 328 (5979): 710–722.
- HAILE J., HOLDAWAY R., OLIVER K., BUNCE M., GILBERT M.T.P., NIELSEN R., MUNCH K., HO S.Y.W., SHAPIRO B., WILLERSLEV E. 2007 – Ancient DNA Chronology within Sediment Deposits: Are Paleobiological Reconstructions Possible and Is DNA Leaching a Factor? *Mol. Biol. Evol.*, 24 (4): 982–989.
- HAILE J., FROESE D.G., MACPHEE R.D.E., ROBERTS R.G., ARNOLD L.J., REYES A.V., RASMUSSEN M., NIELSEN R., BROOK B.W., ROBINSON S., DEMURO M., GILBERT M.T.P., MUNCH K., AUSTIN J.J., COOPER A., BARNES I., MÖLLER P., WILLERSLEV E. 2009 – Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106 (52): 22352–22357.
- HARBERT R. 2018 – Algorithms and strategies in short-read shotgun metagenomic reconstruction of plant communities. *Appl. Plant. Sci.*, 6 (3): e1034.
- HIGUCHI R., BOWMAN B., FREIBERGER M., RYDER O.A., WILSON A.C. 1984 – DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312: 282–284.
- HOLZMANN M., HABURA A., GILES H., BOWSER S.S., PAWLOWSKI J. 2003 – Freshwater Foraminifera revealed by analysis of environmental DNA samples. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 50 (2): 135–139.

- HORN S. 2012 – Target enrichment via DNA hybridization capture. [W:] Shapiro B., Hofreiter M., Ancient DNA. Methods and protocols, methods in molecular biology. Clifton, N.J., Humana Press, Totowa, NJ. 840: 189–195.
- HOSHINO Y.T., MORIMOTO S. 2010 – Soil clone library analyses to evaluate specificity and selectivity of PCR primers targeting fungal 18S rDNA for denaturing-gradient gel electrophoresis (DGGE). *Microbes Environ.*, 25 (4): 281–287.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM 2001 – Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860–92.
- KIRKPATRICK J. B., WALSH E.A., D'HONDT S. 2016 – Fossil DNA persistence and decay in marine sediment over hundred-thousand-year to million-year time scales. *Geology*, 44 (8): 615–618.
- LEJZEROWICZ F., ESLING P., MAJEWSKI W., SZCZUCIŃSKI W., DECELLE J., OBADIA C., ARBIZU P.M., PAWŁOWSKI J. 2013 – Ancient DNA complements microfossil record in deep-sea subsurface sediments. *Biol. Lett.*, 9: 20130283.
- LEVY-BOOTH D.J., CAMPBELL R.G., GULDEN R.H., HART M.M., POWELL J.R., KLIRONOMOS J.N., PETERPAULS K., SWANTON C.J., TREVORS J.T., DUNFIELD K.E. 2007 – Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biol. Biochem.*, 39 (12): 2977–2991.
- LORENZ M. G., AARDEMA B.W., KRUMBELIN W.E. 1981 – Interaction of marine sediment with DNA and DNA availability to nucleases. *Marine Biology*, 64 (2): 225–230.
- LORENZ M.G., WACKERNAGEL W. 1987 – Adsorption of DNA to Sand and Variable Degradation Rates of Adsorbed DNA. *Appl. Env. Microbiol.*, 53 (12): 2948–2952.
- LORENZ M.G., WACKERNAGEL W. 1994 – Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.*, 58 (3): 563–602.
- MARICIC T., WHITTEN M., PÄÄBO S. 2010 – Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PloS one*, 5 (11): e14004.
- MAXAM A., GILBERT W. 1977 – A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (2): 560–564.
- MEYER M., KIRCHER M. 2010 – Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing. *Cold Spring Harb. Protoc.*, 2010 (6): 1–10.
- MULLIS K.B., ERLICH H.A.; GELFAND D.A., HORN G., SAIKI R.K. 1987 – Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences using a thermostable enzyme. United States Patent. No. 4,965,188; z dn. 23.10.1990.
- OGRAM A., SAYLER G.S., BARKAY T. 1987 – The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods.*, 7: 57–66.
- PALKOPOULOU E., MALLICK S., SKOGLUND P., ENK J., ROHLAND N., LI H., OMRAK A., VARTANYAN S., POINAR H., GÖTHERSTRÖM A., REICH D., DALÉN L. 2015 – Complete Genomes Reveal Signatures of Demographic and Genetic Declines in the Woolly Mammoth. *Current Biology*, 25 (10): 1395–1400.
- PAWŁOWSKI J., HOLZMANN M., BERNEY C., FAHRNI J., CEDHAGEN T., BOWSER S.S. 2002 – Phylogeny of Allogromiid Foraminifera inferred from SSU rRNA gene sequences. *J. Foraminiferal Research*, 32 (4): 334–343.
- PAWŁOWSKI J., LEJZEROWICZ F., ESLING P. 2014 – Next-Generation Environmental Diversity Surveys of Foraminifera: Preparing the Future. *Biol. Bull.*, 227: 93–106.
- PAWŁOWSKA J., ZAJĄCZKOWSKI M., ŁĄCZKA M., LEJZEROWICZ F., ESLING P., PAWŁOWSKI J. 2015 – Palaeoceanographic changes in Hornsund Fjord (Spitsbergen, Svalbard) over the last millennium: new insights from ancient DNA. *Clim. Past Discuss.*, 11: 3665–3698.
- PÄÄBO S. 1985 – Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314: 644–645.
- PEDERSEN M.W., OVERBALLE-PETERSEN S., ERMINI L., SARKISSIAN C., HAILE J., HELLSTROM M., SPENS J., THOMSEN P.F., BOHMANN K., CAPPELLINI E., B'RHOLM SCHNELL I., WALES N.A., CARØE C., CAMPOS P.F. SCHMIDT A.M.Z., GILBERT M.T.P., HANSEN A.J., ORLANDO L., WILLERSLEV E. 2015 – Ancient and modern environmental DNA. *Phil. Trans. R. Soc. B 370*: 20130383.
- PIETRAMELLARA G., ANSCHER J., BORGOGNI F., CECCHERINI M.T., GUERRI G., NANNIPIERI P. 2009 – Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biol. Fertil. Soils*, 45: 219–235.
- RASMUSSEN M., ANZICK S.L., WATERS M.R., SKOGLUND P., DeGIORGIO M., STAFFORD T.W. JR, RASMUSSEN S., MOLTKE I., ALBRECHTSEN A., DOYLE S.M., POZNIK G.D., GUDMUNDS-
- DOTTIR V., YADAV R., MALASPINAS A.S., STOCKTON WHITE V.S., ALLENTOFT M.E., CORNEJO O.E., TAMBETS K., ERIKSSON A., HEINTZMAN P.D., KARMIN M., KORNELIUSSEN T.S., MELTZER D.J., PIERRE T.L., STENDERUP J., SAAG L., WARMUTH V.M., LOPES M.C., MALHI R.S., BRUNAK S., SICHERITZ-PONTEN T., BARNES I., COLLINS M., ORLANDO L., BALLOUX F., MANICA A., GUPTA R., METSPALU M., BUSTAMANTE C.D., JAKOBSSON M., NIELSEN R., WILLERSLEV E. 2014 – The genome of a Late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana. *Nature*, 506: 225–229.
- RAWLENCE N.J., LOWE D.J., WOOD J.R., YOUNG J.M., CHURCHMAN G.J., HUANG Y., COOPER A. 2014 – Using palaeoenvironmental DNA to reconstruct past environments: progress and prospects. *J. Quatern. Sci.*, 29 (7): 610–626.
- ROHLAND N., HARNEY E., MALLICK S., NORDENFELT S., REICH D. 2014 – Partial uracil-DNA-glycosylase treatment for screening of ancient DNA. *Phil. Trans. R. Soc. B 370*: 20130624.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. 1977 – DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (12): 5463–5467.
- SLON V., HOPFE C., WEIß C.L., MAFESSONI F., RASILLA M., LALUEZA-FOX C., ROSAS A., SORESSI M., KNUL M.V., MILLER R., STEWART J.R., DEREVIANKO A.P., JACOBS Z., LI B., ROBERTS R.G., SHUNKOV M.V., LUMLEY H., PERRENOUD C., GUŠIĆ I., KUČAN Ž., RUDAN P., AXIMU-PETRI A., ESSEL E., NAGEL S., NICKEL B., SCHMIDT A., PRÜFER K., KELSO J., BURBANO H.A., PÄÄBO S., MEYER M. 2017 – Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science*, 356: 605–608.
- SZCZUCIŃSKI W., PAWŁOWSKA J., LEJZEROWICZ F., NISHIMURA Y., KOKOCIŃSKI M., MAJEWSKI W., NAKAMURA Y., PAWŁOWSKI J. 2016 – Ancient sedimentary DNA reveals past tsunami deposits. *Marine Geology*, 381: 29–33.
- TABERLET P., COISSAC E., POMPANON F., GIELLY L., MIQUEL C., VALENTINI A., VERMAT T., CORTIER G., BROCHMANN C., WILLERSLEV E. 2007 – Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, 35 (3): e14.
- THOMSEN P.F., WILLERSLEV E. 2014 – Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, 183 (2015): 4–18.
- TORTI A., LEVER M.A., JØRGENSEN B.B. 2015 – Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments. *Marine Genomics*, 24: 185–196.
- WATSON J.D., CRICK F.H.C. 1953 – The structure of DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 18: 123–131.
- WILLERSLEV E., COOPER A. 2005 – Ancient DNA. *Proc. R. Soc. B*. 272: 3–16.
- WILLERSLEV E., DAVISON J., MOORA M., ZOBEL M., COISSAC E., EDWARDS M.E., LORENZEN E.D., VESTERGARD M., GUSSAROVA G., HAILE J., CRAINE J., GIELLY L., BOESSENKOOL S., EPP L.S., PEARMAN P.B., CHEDDADI R., MURRAY D., BRÄTHEN K.A., YOCOZ N., BINNEY H., CRUAUD C., WINCKER P., GOGLAR T., ALSOS I.G., BELLEMAIN E., BRYSTING A.K., ELVEN R., SØNSTEBØ J.H., MURTON J., SHER A., RASMUSSEN M., RØNN R., MOURIER T., COOPER A., AUSTIN J., MÖLLER P., FROESE D., ZAZULA G., POMPANON F., RIOUX D., NIDDERKORN V., TIKHONOV A., SAVVINOV G., ROBERTS R.G., MACPHEE R.D.E., GILBERT M.T.P., KJÆR K.H., ORLANDO L., BROCHMANN C., TABERLET P. 2014 – Fifty thousand years of Arctic vegetation and megafaunal diet. *Nature*, 506: 47–51.
- WILLERSLEV E., HANSEN A.J., BINLADEN J., BRAND T.B., GILBERT M.T.P., SHAPIRO B., BUNCE M., WIUF C., GILICHINSKY D.A., COOPER A. 2003 – Diverse Plant and Animal Genetic Records from Holocene and Pleistocene Sediments. *Science*, 300: 791–795.
- WILLERSLEV E., HANSEN A.J., CHRISTENSEN B., STEFFENSEN J.P., ARCTANDER P. 1999 – Diversity of Holocene life forms in fossil glacial ice. *PNAS*, 96 (14): 8017–8021.
- VENTER J.C., ADAMS M.D., MYERS E.W. et al. 2001 – The Sequence of the Human Genome. 291 (5507): 1304–1351.
- VUILLEMIN A., HORN F., ALAWI M., HENNY C., WAGNER D., CROWE S.A., KALLMEYER J. 2017 – Preservation and Significance of Extracellular DNA in Ferruginous Sediments from Lake Towuti, Indonesia. *Front Microbiol.*, 8: 1440.

Praca wpłynęła do redakcji 25.08.2018 r.
Akceptowano do druku 9.10.2018 r.

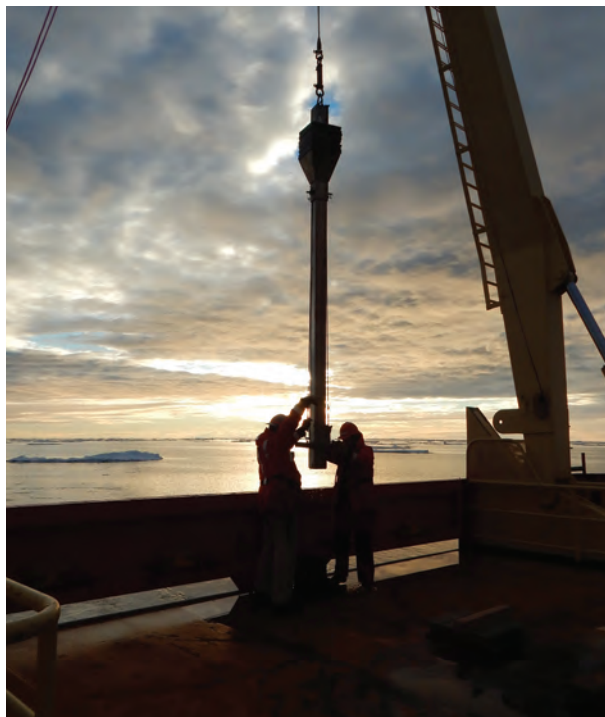
Zastosowanie analiz kopalnego DNA w badaniach osadów czwartorzędowych – patrz str. 680

Applications of sedimentary ancient DNA analyses in geological Quaternary research – see p. 680



Ryc. 1. Wulkan Erebus – najbardziej aktywny wulkan na Antarktydzie z aktywnym jeziorem lawowym. Wyspa Rossa, widok z Castle Rock (od strony amerykańskiej stacji McMurdo)

Fig. 1. The Erebus Volcano – the most active volcano on Antarctica. Ross Island, view from Castle Rock (from the American McMurdo station)



Ryc. 2. Wyciąganie na pokład kasy z rdzeniem (ang. *kasten core*) zawierającym osady z dna Morza Rossa. Ryc. 1 i 2 fot. E. Demianiuk

Fig. 2. Recovering the kasten core with sea floor sediments from the bottom of the Ross Sea. Figs 1 and 2 photo by E. Demianiuk



Ryc. 3. Krzyż upamiętniający George'a T. Vince'a, uczestnika wyprawy Roberta Scott'a z lat 1901–1904, w tle statek *Nathaniel B. Palmer* i amerykańska stacja McMurdo. Fot. W. Majewski

Fig. 3. Cross commemorating George T. Vince, member of the Robert Scott expedition in 1901–1904. The *Nathaniel B. Palmer* research vessel and the McMurdo Station in the background. Photo by W. Majewski