

Prof. dr hab. Marek Konarzewski
Wydział Biologii
Uniwersytet w Białymstoku
15-950 Białystok
Ul. Ciołkowskiego 1J

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Andrzeja Antoła

pt. „**Life history, cell size and physiological performance of the common rough woodlouse
(*Porcellio scaber*) (Crustacea: Malacostraca: Isopoda)**”

Zgodnie z listem przewodnim Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego, prof. dr hab. Andrzeja Kozika, recenzję przedłożonej mi rozprawy doktorskiej mgr Andrzeja Antoła sporządziłem na podstawie zapisów Art. 13 ustawy z dnia 13 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Już na wstępie z przyjemnością stwierdzam, że przedłożona mi rozprawa spełnia z naddatkiem wymogi ustawowe: w jej skład wchodzi dwie pierwszo-autorskie publikacje Doktoranta, co świadczy o jego istotnym, indywidualnym wkładzie badawczym. Ponadto zawartość merytoryczna rozprawy stanowi cenny wkład w zrozumienie istotnych problemów naukowych. Tym nie mniej szereg szczegółowych wątków dysertacji wzbudziło moje wątpliwości i pytania które sprecyzuję w dalszej części recenzji.

Ocena naukowego znaczenia tematyki rozprawy

Biorąc pod uwagę bogactwo gatunkowe i rozmieszczenie geograficzne równonogów są one jedną z grup systematycznych, które odniosły największy sukces ewolucyjny. Stąd też skoncentrowanie się na własnościach ich historii życiowych oraz związanych z nimi cechach fizjologicznych może stanowić istotny przyczynek do zrozumienia ogólnych mechanizmów dostosowawczych. W recenzowanej rozprawie Autor podjął się takiego właśnie zadania obierając za gatunek modelowy prosionka szorstkiego- równonoga o stosunkowo dobrze poznanej biologii i ekologii. Należy jednak pamiętać, że współczesne prosionki z rodzaju *Porcellio* są wyspecjalizowanymi zwierzętami, a ich płuca pleopodalne niewiele mają wspólnego z przystosowaniami charakteryzującymi ich przodków, którzy byli jednymi z pierwszych zwierząt lądowych. Dlatego też nie do końca zgadzam się ze sformułowaniem celu

pracy zawartym w streszczeniu, wskazującym na identyfikację 'cech potencjalnie związanych ze zdolnością równonogów do skolonizowania i zasiedlenia różnorodnych środowisk lądowych'. Przedłożoną rozprawę postrzegam raczej jako solidną analizę przystosowań fizjologicznych konkretnego gatunku, wskazującą na znaczenie plastyczności fenotypowej cech fizjologicznych i anatomicznych jako przystosowania do warunków środowiskowych.

Postępujące globalne zmiany klimatyczne sprawiają, że biologia ewolucyjna, w tym kluczowe dla niej pojęcie adaptacji staje się coraz istotniejszym elementem rosnącej liczby programów badawczych. Właśnie w tym obszarze badań plasowałbym recenzowaną rozprawę. Mechanizmy dostosowawcze zyskują na biologicznym znaczeniu, gdyż zmiany klimatyczne będą manifestować się nie tylko wzrostem średnich temperatur, ale przede wszystkim ich rosnącą amplitudą sprawiającą, że zwierzęta będą coraz częściej eksponowane na rozszerzający się zakres czynników środowiskowych. Zatem określenie ich zdolności adaptacyjnych będzie kluczowe dla zrozumienia i przewidywania następstw perturbacji klimatycznych, w szczególności w odniesieniu do z natury zmiennocieplnych stawonogów.

2. Szczegółowa analiza osiągniętych rezultatów i poprawności wnioskowania

Podstawową część rozprawy doktorskiej A. Antoła stanowią cztery artykuły opublikowane, bądź złożone do redakcji w międzynarodowych czasopismach naukowych. Odniosę się do nich zgodnie z kolejnością zamieszczenia w drukowanej wersji dysertacji, poczynając od artykułu A. Antoła i M. Czarnołęski (2018) „Size dependence of offspring production in isopods: a synthesis” ogłoszonej w ZooKeys. Autorzy udokumentowali zmienność rozmiarów ciała samic prosionków szorstkich oraz jej współzależność z masą i liczbą potomstwa. Ponadto współzależność ta została przeanalizowana w wykorzystaniem całej dostępnej literatury na temat wzrostu i rozmnażania równonogów. Choć najważniejsze wnioski zawarte w omawianym artykule są w mojej ocenie przekonująco poparte uzyskanymi rezultatami, to kilka aspektów relacjonowanych w nim analiz budzi moje wątpliwości, które pozwolę sobie ująć w następujących punktach:

1. Zgodnie z teorią historii życiowych niezdeteminowany wzrost może ewoluować w środowisku sezonowym, bądź też być konsekwencją optymalizacji alokacji zasobów w tkanki wegetatywne i generatywne następującej ze względu na ewolucję opieki rodzicielskiej (wzmacnianej obniżoną śmiertelnością potomstwa). Zatem potwierdzenie istnienia ogólnie dodatniej korelacji między rozmiarami ciała matki i

wielkością potomstwa nie pozwala na jednoznaczne wskazanie mechanizmu ewolucji takiej korelacji, w tym na potwierdzenie wpływu opieki rodzicielskiej jako czynnika selekcyjnego.

2. Opisane zależności między wielkością ciała matki, wielkością oraz liczbą potomstwa różnią się dla najmniejszych i największych osobników rodzicielskich, co znajduje dobre wytłumaczenia na gruncie teorii historii życiowych tylko przy założeniu wpływu śmiertelności zależnej od wielkości ciała. W tym kontekście udokumentowanie istotności opieki rodzicielskiej jako mechanizmu ewolucyjnego wymagałoby znajomości tempa śmiertelności badanej populacji, a także wykazania, że jest ono zależne od wielkości ciała. Jednakże tempo śmiertelności nie było przedmiotem badań Doktoranta. Ponadto w pracy brakuje wyraźnego rozdzielenia przewidywań płynących z teorii historii życiowych od tych, wynikających np., z efektu ograniczeń fizycznych, takich jak ograniczenie wielkości i liczby potomstwa przez objętość komory lęgowej.
3. Niezdeteminowany charakter wzrostu prosionków został w dysertacji założony, ale nie udokumentowany. Brakuje w niej odniesień do prac, które to wykazują (najlepiej badań własnych, na przykład wykorzystania wyników analiz wzrostu osobniczego prowadzonych w hodowli).
4. Korelacje na poziomie międzygatunkowym: przynajmniej część z nich (np., zależność między wielkością samicy i wielkością miotu) dałaby się efektywniej przeanalizować za pomocą metod meta-analitycznych. Nie rozumiem, dlaczego Doktorant ich nie wykorzystał.

Pomniejsze uwagi:

1. Str. 6, we fragmencie streszczenia odnoszącym się do omawianej publikacji Doktorant napisał: „... projekt miał na celu zbadanie wpływu opieki rodzicielskiej (rozwój potomstwa w strukturach ciała matki) na ewolucję (i) niezdeteminowanego wzrostu oraz (ii) pozytywnej korelacji między wielkością matki a wielkością jej potomstwa.”. Otóż przedstawione rezultaty mają *stricte* korelacyjny charakter, a wobec tego nie pozwalają na bezpośrednie zidentyfikowanie przyczynowo- skutkowej natury badanych zależności. Dobrze się stało, że przytoczone, nieprecyzyjne sformułowanie nie powtarza się w dalszych częściach rozprawy.
2. Dlaczego korelowano suchą masę potomstwa ze świeżą masą samic? Jeśli większe i mniejsze samice różniły się zawartością wody (co jest możliwe ze względu na np.,

zmiany proporcji egzoszkieletu, por. praca wykonana w grupie badawczej, do której należy Doktorant: Schramm i in. 2018. *J. Insect Biology*), to mogło to wpłynąć na obserwowane asocjacje.

3. Rezultaty, str. 22: 'When we centred the model at the minimum female body mass...'. Nie rozumiem, na czym wzmiankowane tu (i w innych miejscach) 'centrowanie' modelu polegało. Będę prosił o wyjaśnienie w trakcie obrony. Ponadto warta zauważenia jest duża zmienność masy miotów przy tej samej masie ciała samic (np., zawierająca się w zakresie między 2 i 8 mg przy masie ok. 70 mg). Czym może być ona powodowana?

Druga w kolejności publikacja składająca się na dysertację A. Antoła (Antoń i in. Thermal and oxygen conditions during development cause common rough woodlice (*Porcellio scaber*) to alter the size of their gas-exchange organs. *Journal of Thermal Biology*, w recenzjach) prezentuje wyniki ciekawego eksperymentu mającego na celu analizę wpływu temperatury otoczenia i hipoksji na wzrost osobniczy prosionków oraz wielkość narządów wymiany gazowej (płuc pleopodalnych). To właśnie skupienie się na zmianach powierzchni wymiany gazowej, określanej z wykorzystaniem zaawansowanych technik obrazowania i pomiaru wydaje mi się najbardziej nowatorską częścią omawianej pracy. Wyniki nie potwierdziły modyfikacji *Temperature Size Rule* przez dostępność tlenu, ani też (wbrew tytułowi maszynopisu) jednoznacznego związku wielkości płuc warunkami termicznymi i hipoksji. Stąd też konkluzje artykułu osłabione zostały niejednoznacznością cząstkowych rezultatów. W odniesieniu do tej publikacji chciałbym sformułować następujące uwagi:

1. W pracy nie znalazłem uzasadnienia wyboru warunków termicznych (15°C vs. 22°C) i gazowych (10% vs. 22% O₂). Wybór 10% O₂ dla wywołania hipoksji wydaje mi się szczególnie dyskusyjny, choćby ze względu na zastosowanie poziomu tlenu równego 7% w czwartej pracy wchodzącej w skład dysertacji (Antoń i in. 2019, PloS). Jedynie poziom wilgotności wiernie koresponduje ze środowiskiem naturalnym (Horvathova i in. 2015). W rozprawie nie przedyskutowano prac analizujących skład powietrza w ściółce, które mogłyby urealnić warunki eksperymentu. Pogłębienie zagrożenia hipoksją w wysokiej temperaturze również wynika z rozważań teoretycznych, a nie obserwacji w środowisku naturalnym. W sumie trudno więc określić jak często temperatura i hipoksja stają się czynnikami selekcyjnymi w naturalnych populacjach prosionków,

choć być może dogłębnější dyskusja oparta na literaturze przedmiotu (np., praca Wright i Ting 2006, cytowana w dysertacji) mogłaby coś wyjaśnić.

2. Biorąc pod uwagę środowisko życia proسیونków spodziewałbym się, że konieczność usuwania dwutlenku węgla może stwarzać poważniejsze ograniczenia niż dostępność tlenu. Być może jego ciśnienie parcjalne w tkankach bywa niższe od tego, w otoczeniu. Tymczasem CO₂ nie był obecny w mieszaninie gazów użytych w eksperymencie.
3. Brak systematycznego, ujemnego wpływu hipoksji na względną wielkość płuc jest zastanawiający. Również zmniejszenie względnych rozmiarów płuc w wyższej temperaturze jest sprzeczne z przewidywaniami. Jedynie u samców hipoksja wywołała powiększenie płuc. Dyskusja tego wątku niewiele mi wyjaśniła, szczególnie w kontekście odniesień do gatunków o zupełnie innej fizjologii oddychania i anatomii organów oddechowych (w tym ryb i ssaków sic!).
4. Str. 58: "Nevertheless, the pattern of these responses suggests a compromise between the rates of oxygen uptake and water loss..." Z informacji zawartych w opisie metod wynika, że niezależnie od temperatury otoczenia proسیونki były hodowane w warunkach bardzo wysokiej wilgotności względnej, wynoszącej 98%. Jak autorzy sami przyznają (str. 61) : In nature, isopods are challenged with desiccation risk, which was minimized in our experiment, as we kept the animals under conditions with the highest possible humidity." Czy zatem mógł być to czynnik wpływający na rozwój płuc poprzez ograniczenia związane z ewaporacją wody?
5. Statystyczna analiza krzywych wzrostu w oparciu o porównanie residualnych sum kwadratów jest poprawna, ale pozwalająca na wychwycenie jedynie ogólnych różnic w kształcie tych krzywych. Stąd moim zdaniem omawiana część rezultatów niewiele wnosi. Słabość prezentowanej analizy wynika z braku danych na temat wzrostu osobniczego, które umożliwiłyby indywidualne określenie parametrów wzrostu i poddanie ich znacznie bardziej miarodajnej obróbce statystycznej.

Publikacja 3: Antol i in. Effects of thermal and oxygen conditions during development on cell size in the common rough woodlice *Porcellio scaber*. Ecology & Evolution, w recenzjach.

Kolejna publikacja wchodząca w skład ocenianej dysertacji przedstawia wyniki eksperymentu, którego celem było zidentyfikowanie wpływu temperatury otoczenia i hipoksji na architekturę komórkową proسیونków. Jej lektura skłoniła mnie do sformułowania dwóch komentarzy, do których mam nadzieję Doktorant odniesie się w trakcie obrony. Po pierwsze, przy

projektowaniu eksperymentu oraz formułowaniu hipotez badawczych założono, że mniejsze komórki będą miały ułatwiony transport tlenu ze względu na korzystny stosunek powierzchni do objętości. Spodziewano się zatem mniejszych komórek w wyższej temperaturze otoczenia wymuszającej wyższe tempo metabolizmu. Zgodnie z tą logiką w przypadku zwierząt hodowanych w hipoksji, w temperaturze 15° C można by się spodziewać adaptacji w postaci zwiększenia wielkości komórek. Jednakże równie dobrze w tej grupie eksperymentalnej mogło nastąpić jedynie obniżenie tempa metabolizmu (i tempa wzrostu) bez znaczącego zwiększenia rozmiarów komórek. Na taki scenariusz wskazują wyniki pomiaru tempa konsumpcji tlenu w warunkach 10% hipoksji uzyskane u pokrewnego gatunku *Porcellio dilatatus* przez Wrighta i Tinga (Comp. Biochem. Physiol. 2006). Dlatego też efekt eksperymentalnie wygenerowanej zmienności grupy 15°C/hipoksja na wnioskowanie mógł być istotny i niekoniecznie zgodny z oczekiwaniami. By to wykluczyć, należałoby porównać tempo metabolizmu czterech grup kończących cykl hodowlany. Niestety, w omawianej pracy nie przedstawiono takich wyników, poprzestając wyłącznie na zbiorczej analizie głównych składowych syntetyzujących zmienność wielkości komórek oraz wskaźnika MMI, który nie oddaje międzygrupowej, początkowej zmienności tempa metabolizmu.

Po drugie, cele pracy w mało precyzyjny sposób rozróżniają plastyczność fenotypową (którą w istocie manipulowano), od adaptacji na poziomie ewolucyjnym. Konfuzję tą dobrze ilustruje fragment streszczenia: „Consequently, warm and hypoxic environments should favour ectotherms with small cells to meet increased metabolic demand by oxygen supply. To test these predictions, we compared cell size (hindgut epithelium, hepatopancreas B cells, ommatidia) in common rough woodlice (*Porcellio scaber*)..” Pierwsze zdanie przytoczonego fragment sugeruje nieuprawione uogólnienie odnoszące się do wszystkich ektotermów. Tymczasem omawiany artykuł odpowiada na pytania dotyczące zakresu zmienności osobniczej u konkretnego, badanego gatunku.

Czwarta, pierwszo-autorska publikacja Doktoranta (Antoń i in. 2019, PLoS One) zdaje relację z solidnie zaplanowanego i przeprowadzonego eksperymentu polegającego na przetrzymywaniu prosionków w gradiencie temperatury zewnętrznej przy dwóch poziomach dostępności tlenu- hipoksji na poziomie 7% O₂ i warunków kontrolnych (21% O₂). Rezultaty tego eksperymentu wydają mi się najbardziej jednoznaczne w całej dysertacji, choć jednocześnie najmniej frapujące. Różnica w koncentracji tlenu 7% względem 10% zastosowanych we wcześniejszych eksperymentach dodatkowo nastrocza potencjalnie istotne

problemy interpretacyjne. Trudno bowiem stwierdzić, na ile obniżona o 3% dostępność tlenu wpłynęła na metabolizm, a przez to zachowanie zwierząt. Uniemożliwia to bezpośrednio powiązanie wyników prac 2-4 w jedną, spójną całość.

Forma prezentacji rozprawy

Pod względem redakcyjnym i estetycznym rozprawa nie budzi większych zastrzeżeń. Najważniejsze rozdziały składające się na dysertację są *de facto* wydrukami czterech opublikowanych, bądź zgłoszonych do druku anglojęzycznych artykułów naukowych. Poprzedzające je polskojęzyczne omówienie rezultatów, a w szczególności rozdział „General Introduction” są siłą rzeczy wtórne względem treści zawartych w publikacjach i być może mogło by się ograniczyć do ich streszczenia, powielonego z resztą w pewnym stopniu w ostatniej części dysertacji- ‘General discussion’.

Wnioski końcowe

Wartość naukową dysertacji oceniam wysoko, gdyż podjęta w niej tematyka plasuje się w centrum ważnego kierunku badań światowej biologii, który dopiero od niedawna uprawiany jest również w Polsce. Rozprawa mgr Andrzeja Antoła jest oryginalnym dziełem spełniającym warunki wymagane do uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk biologicznych i dyscyplinie ekologia. Sformułowane wyżej uwagi i wątpliwości nie umniejszają znacząco jego wartości merytorycznej, a raczej wskazują na częściowe niedostatki w kontekście tego, co wydaje mi się w fizjologii ekologicznej najważniejsze—identyfikowania tam, gdzie jest to możliwe, proksymalnych zależności przyczynowo- skutkowych wpisujących się w teorię historii życiowych.

Z przekonaniem wnoszę o dopuszczenie mgr Andrzeja Antoła do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok, 20.03.2020

Prof. dr hab. Marek Konarzewski