

Autoreferat

dr Aleksandra Walczyńska

Instytut Nauk o Środowisku

Wydział Biologii

Uniwersytet Jagielloński

Kraków, marzec 2019

1. Imię i Nazwisko

Aleksandra Walczyńska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- **1996-2002:** Jednolite studia magisterskie, kierunek biologia, Uniwersytet Jagielloński. Praca magisterska zatytułowana „*Bioenergetyka larw chrząszczy drewnojadów*” została wykonana i obroniona pod kierunkiem prof. dr. hab. Januarego Weinera.

- **2002-2009:** studia doktoranckie, Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński. Praca doktorska zatytułowana „*Strategia życiowa zmorsznika czerwonego Corymbia rubra L. (Coleoptera: Cerambycidae)*” została wykonana i obroniona pod kierunkiem prof. dr. hab. Januarego Weinera. Recenzenci: prof. dr hab. Jan Kozłowski, prof. dr hab. Jerzy R. Starzyk. Stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biologii nadany przez Wydział Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego dnia 22 września 2009 r.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

2011-obecnie: asystent naukowy w Instytucie Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a. tytuł osiągnięcia naukowego

PROKSYMALNE I ULTYMATYWNE MECHANIZMY WYSTĘPOWANIA TERMICZNEJ REGUŁY WZROSTU

b. autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

W Tabeli 1 przedstawiono listę sześciu publikacji wchodzących w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego, wraz z podaniem pięcioletniego *Impact Factor* (z roku 2018), aktualnej punktacji MNiSW czasopism oraz liczby cytowań wg *Web of Science*TM *Core Collection* (stan na 11.03.2019). Wszystkie publikacje powstały w związku z realizacją projektu „*Proximate and ultimate factors influencing the relation between body size and temperature of organisms from the activated sludge*”, finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej (POMOST/2011-3/12). Oświadczenia współautorów publikacji określające wkład autora w każdą z prac są zawarte w Załączniku 6.

Tabela 1. Prace opublikowane, uwzględnione w dorobku habilitacyjnym, wraz z podaniem wskaźników bibliograficznych.

Lp.	dane bibliograficzne	IF_5	punkty MNiSW	liczba cytowań
1	Walczyńska A. , Serra M. 2014. Species size affects hatching response to different temperature regimes in a rotifer cryptic species complex. Evolutionary Ecology , 28: 131-140.	2,22	25	7
2	Walczyńska A. , Serra M. 2014. Inter- and intraspecific relationships between performance and temperature in a cryptic species complex of the rotifer <i>Brachionus plicatilis</i> . Hydrobiologia , 734: 17-26.	2,44	30	11
3	Kiełbasa A., Walczyńska A. , Fiałkowska E., Pajdak-Stós A., Kozłowski J. 2014. Seasonal changes in the body size of two rotifer species living in activated sludge follow the Temperature-Size Rule. Ecology and Evolution , 4: 4678-4689.	2,79	25	9
4	Walczyńska A. , Labecka A.M., Sobczyk M., Czarnoleski M., Kozłowski J. 2015. The Temperature-Size Rule in <i>Lecane inermis</i> (Rotifera) is adaptive and driven by nuclei size adjustment to temperature and oxygen combinations. Journal of Thermal Biology , 54: 78-85.	2,18	30	17
5	Walczyńska A. , Sobczyk M., Czarnoleski M., Kozłowski J. 2015. The temperature-size rule in a rotifer is determined by the mother and at the egg stage. Evolutionary Ecology , 29: 525-536.	2,22	25	5
6	Walczyńska A. , Kiełbasa A., Sobczyk M. 2016. 'Optimal thermal range' in ectotherms: Defining criteria for tests of the temperature-size-rule. Journal of Thermal Biology , 60: 41-48.	2,18	30	7
łącznie:		14,03	165	56

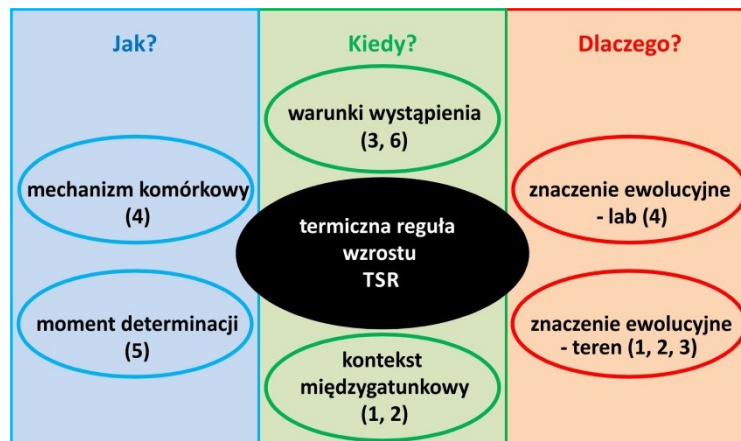
c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Temperatura jest podstawowym parametrem środowiskowym kształtującym życie na każdym poziomie jego organizacji, począwszy od procesów fizyko-chemicznych, poprzez wpływ na osobnika, populację i wreszcie cały ekosystem. Organizmy żywe dysponują fizjologicznym arsenałem detekcji zmian temperatury oraz odpowiedniej na nie reakcji. Jednym z przykładów takich mechanizmów obserwowanych w naturze jest tzw. termiczna reguła wzrostu (ang. *temperature-size rule*; TSR). Zjawisko to polega na tym, że w niskiej temperaturze organizmy charakteryzuje powolny wzrost, długi rozwój i względnie duże rozmiary ciała w momencie dojrzewania, zaś w wysokiej temperaturze rosną one stosunkowo krótko, szybko i osiągają względnie mniejsze rozmiary. Wzorzec ten obserwowano zarówno w badaniach laboratoryjnych jak i w naturze. Pomimo powszechności występowania tej reguły, wciąż kluczowe kwestie z nią związane pozostają niewyjaśnione. Dlaczego niektóre organizmy (gatunki lub populacje) wykazują TSR, a inne nie? Jakie mechanizmy fizjologiczne są za ten wzorzec odpowiedzialne? Czy jest on wynikiem ograniczeń rozwojowych czy ma charakter adaptacyjny? Znalezienie odpowiedzi na powyższe pytania umożliwi nie tylko lepsze poznanie mechanizmów ewolucyjnych, ale także pozwoli przewidzieć możliwe konsekwencje globalnych zjawisk klimatycznych dla zespołów organizmów.

Uważa się, że czynnikiem proksymalnym, czyli opisującym mechanizm powstania TSR, jest manipulacja wielkością komórek. Zaś najbardziej prawdopodobnym spośród proponowanych czynników ultymatywnych, czyli wyjaśniających ewolucyjne znaczenie tego zjawiska, jest malejąca wraz ze wzrostem temperatury względna dostępność tlenu. W takich warunkach, zapotrzebowanie na tlen u organizmów żywych rośnie szybciej, niż jego dostępność, zwłaszcza w środowisku wodnym. Powoduje to spadek efektywności transportu tlenu do wnętrza komórek, spowalniając procesy metaboliczne. Według hipotez, mniejsze rozmiary komórek mają zwiększać efektywność zaopatrywania tkanek i komórek w tlen. Słuszności tej tezy dowodziły nieliczne dowody empiryczne, jednak całościowy kształt zrozumienia zjawiska był wciąż daleki od pełnego.

Celem mojego projektu było ustalenie czynników proksymalnych, odpowiedzialnych za mechanizm, oraz ultymatywnych, informujących o ewolucyjnych przyczynach występowania termicznej reguły wzrostu u organizmów eukariotycznych będących elementem osadu czynnego – specyficznego ekosystemu odgrywającego kluczową rolę w procesie biologicznego oczyszczania ścieków. Poniżej przedstawiam schemat zagadnień, które poruszałam w projekcie, z informacją o tym, która z opublikowanych prac jest związana z danym problemem badawczym.

Ryc. 1. Schemat publikacji składających się na osiągnięcie habilitacyjne, wraz z kontekstem badawczym. Numery w nawiasach odpowiadają numerom publikacji w Tabeli 1.



Moje osiągnięcie habilitacyjne można podzielić na kategorie dotyczące trzech różnych zagadnień: jakie są mechanizmy TSR, w jakich warunkach ta reguła jest realizowana, oraz jaki jest jej sens ewolucyjny. Każda z publikacji przechodzi płynnie pomiędzy wyżej wymienionymi kategoriami, jednak każdej z nich można przypisać jedno z powyższych pytań jako główne. Dlatego też poniżej omówię publikacje nie przedstawiając ich w sposób chronologiczny, ale w kontekście problemów badawczych, którym odpowiadają. Odnosząc się do konferencji, na których prezentowane były wyniki, podaję w nawiasie kwadratowym numer konferencji z Tabeli 4 w Załączniku 5.

PROKSYMALNE MECHANIZMY TERMICZNEJ REGUŁY WZROSTU

Spośród wielu możliwych aspektów dotyczących mechanizmów, jakie są uruchamiane w związku z realizacją zadania „jest ciepło, więc rośnij mniejszy”, wybrałam do testowania eksperymentalnego dwa: w jakim momencie cyklu życiowego dochodzi do determinacji, czy też uruchomienia, strategii związanej z dopasowaniem rozmiarów ciała do istniejących warunków termicznych oraz czy temperaturowo determinowanej zmianie rozmiarów ciała towarzyszy zmiana rozmiarów komórek.

W badaniach przedstawionych w **publikacji (5)** podzieliłam cykl życiowy wrotka *Lecane inermis* na cztery etapy: okres rozwoju matki (pokolenie F0), okres składania jaj, okres rozwoju jaja (pokolenie F1) oraz okres rozwoju po wylęgnięciu się z jaja. Stosując trzy zabiegi temperaturowe, temperaturę niską, pośrednią i wysoką, testowałam, czy na danym etapie dochodzi do dopasowania rozmiarów ciała do warunków termicznych. Eksperyment polegał na odpowiednim manipulowaniu wrotkami lub ich jajami, aby odpowiednio włączać lub wyłączać bodziec związany ze zmianą temperatury w każdym ze stadiów. Cechą badaną był rozmiar ciała dojrzałych samic (cechą świadczącą o osiągnięciu dojrzałości była obecność jaja) z pokolenia F1. Na podstawie wyników stwierdziłam, że do korygowania rozmiarów ciała w odpowiedzi na bodziec zmiany temperatury dochodzi w dwóch etapach cyklu życiowego wrotka: jest to kontrolowane przez matkę oraz na etapie rozwoju embrionalnego

(w jaju). Co więcej, brak jest takiej kontroli w rozwoju pozazarodkowym – u wrotków, które od poprzedzającego pokolenia były hodowane w tej samej (pośredniej) temperaturze, zaś rozdzielone zostały po wylęgnięciu się z jaja, nie stwierdziłam różnicy w rozmiarach ciała pomimo tego, że wrotki rozwijające się w niższej temperaturze potrzebowały więcej czasu na osiągnięcie dojrzałości. Dodatkowym ciekawym wynikiem było stwierdzenie, że matki nie dostosowują rozmiarów potomstwa do aktualnej temperatury, tylko do kierunku zmiany temperatury, jakiej same doświadczyły. Potomstwo samic F0 hodowanych w wysokiej temperaturze, ale doświadczających spadku temperatury w momencie rozpoczęcia składania jaj poprzez przeniesienie do temperatury pośredniej było, wbrew oczekiwaniom, większe, niż potomstwo samic hodowanych w niskiej temperaturze, a doświadczających wzrostu temperatury. Ten wynik staje się zrozumiały, jeśli weźmiemy pod uwagę kierunek działania bodźca, a nie samą wartość temperatury, w której samice F0 były hodowane. Wyniki pracy stanowią pierwsze całościowe podejście do badanego zagadnienia. Co warto podkreślić, dwustopniowa kontrola rozmiarów ciała w zależności od temperatury przypomina mechanizm kontroli płci u gadów, co może świadczyć o uniwersalnym charakterze pewnych mechanizmów determinowanych temperaturowo. Wyniki prezentowałam na konferencji ICCPB w Krakowie w 2015 r. [10].

W eksperymencie przedstawionym w **publikacji (4)** postawiłam sobie dwa cele: sprawdzenie czy wielkość samic wrotków ma wpływ na liczbę złożonych jaj (miara dostosowania) w warunkach niskiej/wysokiej temperatury i niskiego/wysokiego stężenia tlenu, oraz stwierdzenie, czy odpowiedzi w postaci zmiany rozmiarów ciała, w warunkach ekspozycji na ww. warunki, towarzyszy adekwatna odpowiedź w postaci zmiany rozmiarów komórek. W pierwszym etapie wrotki były przeze mnie selekcionowane pod kątem fenotypowej zmiany rozmiarów ciała poprzez hodowlę w czterech różnych zabiegach temperaturowych, w dwóch „niższych” i dwóch „wyższych” temperaturach. Pomiary wielkości wskazały, że udało mi się otrzymać oczekiwany efekt w postaci tym mniejszych rozmiarów ciała wrotków, im wyższa temperatura, w której były hodowane. W następnym etapie wrotki zostały umieszczone w czterech zabiegach eksperymentalnych będących kombinacją wysokiej/niskiej temperatury i wysokiego/niskiego stężenia tlenu. Hodowla w dwóch niskich i dwóch wysokich temperaturach w poprzedzającym etapie miała na celu to, aby wrotki przeniesione do warunków eksperymentalnych zawsze doświadczały tej samej różnicy temperatury (w tym przypadku, ± 5 °C), bez względu na to, czy zostaną umieszczone w wysokiej, czy w niskiej temperaturze docelowej. Po 1 dobie oszacowana została rozrodczość samic w każdym z zabiegów, zaś po kolejnej dobie odłowione wrotki z pokolenia F1 zostały utrwalone pod kątem pomiarów wielkości ciała i wielkości jąder komórkowych, będących w tym przypadku przybliżeniem wielkości komórek. Wyniki dotyczące rozrodczości przedstawię w kolejnej sekcji. Jeśli chodzi o wielkość jąder komórkowych, stwierdziłam, że a. generalnie zmieniają swój rozmiar w stosunku do temperatury zgodnie z przewidywaniami, b. wzorec ten jest czytelniejszy i dokładniejszy niż w przypadku zmiany rozmiarów ciała (co może oznaczać, że rozmiar komórek nie jest jedynym mechanizmem wpływającym na końcowy rozmiar ciała), c. wzorec ten jest bardziej klarowny w obu zabiegach z niższą temperaturą, niż w tych z

wysoką temperaturą. W tym eksperymencie potwierdziłam istnienie mechanizmu komórkowego regulacji rozmiarów ciała w odpowiedzi na temperaturę, a także wykazałam, że odpowiedź ta nie jest jednakowa w całym zakresie – w wyższych temperaturach reakcje wydają się być bardziej chaotyczne i mniej precyzyjne, co może świadczyć o współdziałaniu innych mechanizmów. Wyniki tej części eksperymentu zostały przedstawione na konferencji SEB w 2014 r. [8].

WARUNKI WYSTĘPOWANIA TERMICZNEJ REGULY WZROSTU

W swoich badaniach zajęłam się dwoma zagadnieniami związanymi z określeniem warunków, w których organizmy zachowują się według termicznej reguły wzrostu: występowaniem tego zjawiska na poziomie międzygatunkowym oraz zakresem temperatur optymalnym dla występowania TSR.

W cyklu dwóch **prac (1, 2)** zajęłam się obserwacją zjawisk związanych z rozmiarem i temperaturą u trzech gatunków wrotków reprezentujących tzw. kompleks gatunków kryptycznych *Brachionus plicatilis*. Badania prowadziłam w Instytucie Cavanilles Bioróżnorodności i Biologii Ewolucyjnej w Uniwersytecie w Walencji, we współpracy z prof. Manuelem Serra. Gatunki kryptyczne stanowią bardzo cenny obiekt w badaniach ekologicznych ze względu na duże podobieństwo ewolucyjne. Gatunki, które badałam, różnią się rozmiarem ciała, a ich nisze ekologiczne w znacznym stopniu się nachodzą. Ten system badawczy pozwolił mi testować hipotezy dotyczące fenotypowo kontrolowanej termicznej reguły wzrostu w powiązaniu z wzorcami ukształtowanymi genetycznie. Przykładem takiej genetycznie kontrolowanej reguły jest reguła Bergmanna. Według niej organizmy zamieszkujące wyższe szerokości geograficzne osiągają większe rozmiary ciała niż ich przedstawiciele z niskich szerokości geograficznych. Początkowo reguła ta dotyczyła jedynie kręgowców. Obecnie wiadomo, że dotyczy ona w zasadzie wszystkich grup organizmów żywych, zaś występującą w oryginalnej wersji szerokość geograficzną uważa się obecnie za przybliżenie warunków termicznych (im dalej na północ, tym zimniej).

W eksperymencie przedstawionym w **publikacji (1)** badałam w trzech temperaturach wzorzec wylęgania się z jaj przetrwalnych trzech gatunków wrotków należących do kompleksu *B. plicatilis*: *B. plicatilis sensu stricto* (największy), *B. ibericus* (pośredni) i *B. rotundiformis* (najmniejszy). Bank jaj, na który składają się jaja przetrwalne zdeponowane w osadach przez nieznaną, ale dłuższą niż 1 sezon, długość czasu, stanowią niezwykle cenne źródło informacji na temat adaptacji. W moim eksperymencie chciałam sprawdzić czy różny rozmiar gatunków będzie miał wpływ na a. czas potrzebny do wylęgnięcia oraz b. proporcję wylęgania się każdego z gatunków, w trzech różnych temperaturach. Przewidywałam, że wrotki reprezentujące największy gatunek będą się wylęgały najszybciej/z najwyższą frekwencją w najniższej temperaturze, wrotki z najmniejszego gatunku będą pod względem obu tych cech preferowały temperaturę najwyższą, zaś gatunek o średniej wielkości będzie prezentował pośrednie przystosowanie. Jaja przetrwalne wyizolowałam z sedymentu pochodzącego ze stawu, w którym wszystkie trzy gatunki współwystępują, według procedury

opracowanej w grupie badawczej prof. Serra. Następnie jaja były eksponowane na światło indukujące wylęganie się. Codziennie przez dwa tygodnie każdy świeżo wylęgły osobnik był przenoszony do pojedynczej studzienki i dokarmiony, tak aby możliwa była proliferacja klonu w celu określenia gatunku wrotka. Otrzymane wyniki potwierdziły moje przewidywania pod względem proporcji wrotków wylęgających się w różnej temperaturze, a także, w mniejszym stopniu, pod względem średniego czasu wylęgu. W tym drugim przypadku największy gatunek wyląkł się średnio wcześniej w najwyższej niż w średniej temperaturze. Wyniki wskazują na to, że charakterystyczne dla gatunku rozmiary ciała są adaptacją do termicznych warunków w jakich żyje, co stanowi pierwsze empiryczne potwierdzenie zastosowalności reguły Bergmanna do cech historii życia związanych z diapauzą. Ponadto, niejednoznaczność wyników w przypadku jednej z badanych cech wskazuje na obecność innych, współdziałających mechanizmów nie będących pod kontrolą eksperymentalną.

W kolejnej **publikacji poświęconej kompleksowi gatunków *Brachionus plicatilis* (2)** przedstawiłam wyniki eksperymentu, w którym badałam a. tempo wzrostu populacji tych samych trzech gatunków w pięciu zabiegach temperaturowych oraz b. plastyczność fenotypową ich rozmiarów ciała. Tym sposobem połączyłam badanie mechanizmów działających na poziomie fenotypowym (TSR), z regulowanymi na poziomie genetycznym. Przewidywałam, że im większy gatunek, tym niższa będzie temperatura optymalna dla jego tempa wzrostu populacji (bezpośredniej miary dostosowania) oraz im wyższa temperatura tym mniejsze będą osobniki każdego z gatunków. Badania przeprowadziłam na klonach wyprowadzonych w tamtejszym laboratorium. Po podzieleniu gatunków na grupy eksperymentalne, wrotki były liczone dwukrotnie w różnych odstępach czasu, związanych z temperaturą w danym zabiegu (im wyższa temperatura, tym krótsze odstępy czasowe), czyli po 3-4 dniach (liczenie I) i po kolejnych 2-3 dniach (liczenie II). Tempo wzrostu było obliczane jako różnica między liczebnością w czasie II w stosunku do liczebności w czasie I. Dodatkowo, po liczeniu II próbki zostały utrwalone, a wrotki zmierzone. Wykazałam, że temperatura optymalna dla tempa wzrostu populacji jest zgodna z przewidywaniem dla dwóch gatunków, najmniejszego i pośredniego. Największy gatunek miał mniej więcej podobne dostosowanie we wszystkich zabiegach. Natomiast tylko największy gatunek wykazał istotne zmniejszenie rozmiarów ciała wraz ze wzrostem temperatury, potwierdzając termiczną regułę wzrostu. Powyższe wyniki zostały przeze mnie zinterpretowane w ten sposób, że generalnie rozmiar ciała jest adaptacją do warunków środowiskowych, jednak konkretne mechanizmy ewolucyjne zależą prawdopodobnie od zakresu tolerancji na temperaturę, który to zakres jest cechą specyficzną dla gatunku. Spodziewam się innych mechanizmów u generalistów i specjalistów. Wyniki tego eksperymentu są przy okazji jednym z nielicznych empirycznych dowodów na prawdziwość zasady „*jack of all, master of none*” mówiącej o tym, że gatunki będące generalistami mają podobnie wysokie dostosowanie w szerokim zakresie występowania, jednak w konkretnych warunkach wypadają gorzej w konfrontacji z gatunkiem wyspecjalizowanym do wąskich zakresów. Wyniki obu prac przedstawiłam na konferencji ESEB w 2013 r. [5].

Optymalny zakres warunków, w których występuje TSR opisałam w **publikacji (6)**. Tym razem porównałam tempo wzrostu populacji (bezpośrednią miarę dostosowania) w szerokim zakresie temperatur dla trzech gatunków organizmów wodnych reprezentujących różną budowę komórkową: jednokomórkowego pierwotniaka *Coleps hirtus*, wielokomórkowego eutelicznego (czyli posiadającego stałą dla gatunku liczbę komórek somatycznych) wrotka *Lecane inermis* i wielokomórkowej nie-eutelicznej pierścienicy *Aeolosoma hemprichi*. Różnica między dwoma ostatnimi gatunkami polega na tym, że teoretycznie pierścienica może manipulować masą ciała poprzez zmianę wielkości lub liczby komórek, podczas gdy wrotek może to robić wyłącznie manipulując ich rozmiarem. Wszystkie trzy gatunki wykazały termiczną regułę wzrostu, jednak tylko w pewnym określonym zakresie temperatur. Zakres ten zawierał się między temperaturą minimalną dla tempa wzrostu populacji (czyli taką, poniżej której osobniki przestają się rozmnażać) a wartością optymalną (taką, dla której tempo wzrostu populacji jest największe). Ta zależność była wspólna dla wszystkich trzech gatunków, bez względu na ich różną budowę komórkową. Ponieważ chciałam się upewnić na ile ta zasada jest uniwersalna, porównałam wzorce tempa wzrostu populacji i rozmiaru ciała dla 18 gatunków pierwotniaków, na danych udostępnionych mi przez prof. Davida Atkinsona (Liverpool University). Wyniki potwierdziły moje badania eksperymentalne. Podsumowując, po raz pierwszy wykazałam empirycznie istnienie optymalnego zakresu dla występowania TSR, określiłam ściśle jego granice (przy okazji wskazując na to, że warunki stresowe są znacznie bliższe wartości optymalnej, niż do tej pory sądzono), a także przedstawiłam graficznie jakie konsekwencje może mieć nieprawidłowy wybór temperatur dla określenia fenotypowej plastyczności rozmiarów ciała. Empiryczne wyniki zaprezentowałam na konferencji PEC w Krakowie w 2013 r. [6], zaś całość przedstawiłam na konferencji PEC w Poznaniu w 2015 r. [11].

Rozszerzenie ww. wyniku na inne parametry znalazłam dzięki badaniom pilotażowym przedstawionym w **publikacji (3)**. W eksperymencie sprawdzałam, czy *L. inermis* postępuje wedle TSR, wykorzystując dwa zabiegi temperaturowe i dwie różne pożywki. Wrotki rosły mniejsze w wyższej temperaturze, zgodnie z oczekiwaniami, ale tylko w zabiegu z pożywką lepszej jakości; w pożywce gorszej jakości nie znalazłam istotnej różnicy w rozmiarze ciała. Wynik ten świadczy o tym, że plastyczność fenotypowa, jaką jest reakcja zmniejszania rozmiarów ciała wraz z temperaturą, zachodzi w warunkach optymalnych również pod innymi, niż tylko warunki termiczne, względami. Ważnym czynnikiem jest tu wartość odżywcza dostępnego pokarmu, a być może również warunki świetlne. Ten ostatni parametr mógłby częściowo tłumaczyć dlaczego w środowisku lądowym rzadziej obserwuje się wzorec mniejszych rozmiarów ciała przy wyższej temperaturze, zwłaszcza u organizmów doświadczających sezonowości.

EWOLUCYJNE ZNACZENIE TERMICZNEJ REGUŁY WZROSTU

Adaptacyjny charakter TSR badałam w laboratorium, testując hipotezę o kluczowej roli tlenu w występowaniu tego zjawiska, oraz w terenie, sprawdzając sezonową odpowiedź

rozmiarów ciała na wahania temperatury i tlenu. Dodatkowo, znaczący wkład w to zagadnienie mają wyniki obu przedstawionych już przeze mnie artykułów dotyczących porównań międzygatunkowych, z których wynika, że specyficzna dla gatunku masa ciała jest adaptacją do warunków w kontekście zjawiska diapauzy **(1)** i dostosowania wyrażonego jako tempo wzrostu populacji **(2)**.

Opis badań laboratoryjnych zawarłam w **publikacji (4)**, którą w znacznej części przedstawiłam powyżej. Na podstawie wyników dotyczących liczby jaj składanych przez duże/małe samice w czterech zabiegach kombinacjach wysokiej/niskiej temperatury i wysokiego/niskiego stężenia tlenu stwierdziłam, że duże samice a. złożyły mniej jaj w wysokiej temperaturze, niż w niskiej oraz b. złożyły mniej jaj niż samice małe w warunkach wysokiej temperatury i niskiego stężenia tlenu. Wniosek ten potwierdza hipotezę, że małe rozmiary ciała są ewolucyjnie korzystne (przynoszą większe dostosowanie) w wyższej temperaturze i jednocześnie przy niskim stężeniu tlenu. Wyniki przedstawiłam na konferencji SEB w 2014 r. **[7]**.

Badania terenowe przedstawione w **publikacji (3)** przeprowadziłam w oczyszczalni ścieków Kraków-Płaszów. Były one jednocześnie tematem pracy magisterskiej mgr Anny Pasternak (*de domo* Kiełbasa). Praca ta była w całości realizowana w ramach mojego projektu, a promotorem naukowym pracy magisterskiej był prof. dr hab. Jan Kozłowski (z przyczyn formalnych nie mogłam być promotorem Pani Pasternak). W ramach eksperymentu pobierałyśmy próbki osadu czynnego raz na miesiąc przez okres jednego roku. W dniu poboru próbek pojedyncze wrotki *Lecane inermis* były izolowane, a następnie przyżyciowo filmowane. Z każdego filmu wybierana była klatka najlepiej przedstawiająca obiekt do pomiaru wielkości ciała, mierzonego jako powierzchnia. W trakcie badań okazało się, że inny gatunek wrotka, *Cephalodella gracilis*, występował równie licznie w osadzie, a ponieważ gatunek ten reprezentuje inny rodzaj, zaś z pokroju ciała można się domyślać, że zajmuje również inną niszę ekologiczną (brak jest prac naukowych, które mogłyby to przypuszczenie potwierdzić), *C. gracilis* została włączona do badań począwszy od siódmego miesiąca. Jednocześnie, na podstawie parametrów osadu otrzymanych od oczyszczalni wykonałyśmy analizę wielowymiarową (PCA) dla siedmiu parametrów. Analiza wykazała, że tlen i temperatura są głównymi czynnikami kształtującymi środowisko w osadzie czynnym. Ponadto, przeciwnie niż w naturze, nie są one ze sobą skorelowane, co jest związane z manipulowaniem przez operatorów oczyszczalni parametrami tlenu w sposób optymalizujący procesy rozkładu amoniaku, bez względu na temperaturę. Brak korelacji między tlenem i temperaturą pozwolił nam na testowanie zależności między rozmiarem ciała a tymi dwoma parametrami niezależnie. Analiza wykazała, że wielkość obu gatunków zmieniała się istotnie w ciągu sezonu wraz ze zmianami temperatury, zgodnie z przewidywaniami TSR (im cieplej, tym mniejsze). Ponadto, *C. gracilis* okazała się istotnie większa wraz ze wzrostem stężenia tlenu w osadzie, tym samym potwierdzając hipotezę o rozmiarach ciała będących przystosowaniem do dostępności tlenu w środowisku. Wydaje się, że istotną przyczyną braku takiej zależności u *L. inermis* jest tzw. wiek osadu, parametr

określający dzienną frakcję biomasy usuwaną z osadu. Parametr ten działa w osadzie jako czynnik powodujący śmiertelność zewnętrzną, natomiast nie jest on obliczany regularnie, dlatego nie mógł zostać uwzględniony w naszej analizie PCA. Stwierdziłyśmy, że *L. inermis* jest bardziej niż *C. gracilis* wrażliwy na zbyt krótki wiek osadu, co mogło zamaskować ewentualną zależność rozmiarów ciała od dostępności tlenu u tego gatunku. Wynik ten oznacza jednocześnie, jak ważnym parametrem z punktu widzenia ekologii osadu czynnego jest wiek osadu. Wyniki badań potwierdziły (po raz pierwszy) adaptacyjny charakter TSR w skali czasowej. Ponadto, z eksperymentu wynikł również ważny wniosek aplikacyjny. *L. inermis* jest uważany za gatunek o znaczeniu *biological agent* dla osadu czynnego, ponieważ jako jeden z nielicznych potrafi odżywiać się bakteriami w formie filamentów, które, występując w oczyszczalniach, powodują tzw. puchnięcie osadu, proces uniemożliwiający jego właściwą pracę, trudny do zwalczania w skali globalnej. Odkrycia tego dokonały dr E. Fiałkowska i dr hab. A. Pajdak-Stós, na których wiedzy eksperckiej oparty był aplikacyjny wątek badań. Problem w tym, że *L. inermis* jest z nieznanego powodu ograniczony w likwidowaniu puchnięcia osadu w warunkach niskiej temperatury. Powyższe badania, wraz z potwierdzonym wpływem tlenu na dostosowanie *L. inermis* przedstawionym powyżej (zawarte w **publikacji 4**), pokazują, że być może rozwiązaniem mogłoby być zwiększenie natlenienia osadu zimą oraz wydłużenie wieku osadu. Wyniki te przedstawiłam na konferencji PEC w Rogowie w 2014 r. [9].

UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione przeze mnie osiągnięcia habilitacyjne ma znaczący wkład w dyskusję na temat reakcji organizmów żywych na temperaturę. W swoich badaniach wykazałam, że tzw. termiczna reguła wzrostu jest adaptacją do zależnego od temperatury stężenia tlenu, przynajmniej w środowisku wodnym. Ten adaptacyjny charakter wykazałam zarówno dla dostosowania na poziomie gatunku, jak i poprzez porównanie międzygatunkowe, łącząc efekty genetyczne z fenotypowymi. Potwierdziłam również, że mechanizmem jest tu dopasowywanie wielkości komórek do warunków termicznych. Wykazałam również, że, w przypadku wrotków, to dopasowywanie odbywa się w dwóch etapach, poprzez strategię matki oraz w czasie rozwoju zarodkowego. Co ciekawe, bodźcem do reakcji w przypadku efektu matczynego nie jest odbiór konkretnej temperatury, ale kierunek bodźca zmiany warunków termicznych. Co więcej, choć mechanizm komórkowy jest w dużej części odpowiedzialny za ostateczne różnice w rozmiarach ciała ze względu na temperaturę, to nie jest to mechanizm jedyny. Wydaje się, że im bardziej stresowe warunki, tym większe prawdopodobieństwo, że włączane zostają alternatywne mechanizmy (fizjologiczne?) dopasowywania rozmiarów ciała do warunków środowiskowych. Fenotypowo kontrolowana termiczna reguła wzrostu wymaga warunków optymalnych, aby mogła zostać przez dany organizm zrealizowana. Warunki te są różne dla różnych gatunków i obejmują zakres temperatury między minimalną, a optymalną dla tempa wzrostu populacji. Dlatego też bardzo ważne jest, aby we wszelkich tego typu badaniach w pierwszej kolejności ustalić preferencje termiczne badanego gatunku, tak by odpowiednio zaplanować warunki

eksperymentalne, z uwzględnieniem optymalizacji innych czynników środowiskowych, takich jak dostępność tlenu i jakość pokarmu. Całość uzyskanych przeze mnie wyników rzuca nowe światło i pozwala lepiej interpretować ewolucyjnie termiczną regułę wzrostu, a także do pewnego stopnia łączyć ją z regułami opartymi na różnicach genetycznych (jak reguła Bergmanna). Zbliżyła nas to do zrozumienia efektu wpływu temperatury na najbardziej skomplikowaną cechę organizmów żywych, rozmiar ciała, w ujęciu holistycznym, bez przyglądania się tylko konkretnemu poziomowi zjawiska. Wreszcie, powyższe wyniki stanowią bazę do zrozumienia wpływu temperatury na całe zespoły organizmów, co pozwoli przewidywać skutki perturbacji w środowisku, zarówno naturalnych, jak i tych będących wynikiem działalności człowieka.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Wszystkie prace z bazy JCR, do których odnoszę się w tej części autoreferatu, są zebrane w Tabeli 2, Załączniku 5. Cytując te prace, odnoszę się do ich numerów z tabeli podanych w nawiasach okrągłych. Z kolei liczbami podanymi w nawiasach kwadratowych posługuję się odnosząc się do konferencji, na których prezentowałam wyniki, zebranych w Tabeli 4, Załączniku 5. Wreszcie, nawiązując do projektów, z których badania były finansowane, podaję liczby rzymskie w nawiasach okrągłych, odpowiednio do pozycji w Tabeli 3, w Załączniku 5. Publikacje spoza bazy JCR, na które się powołuję, zostały opisane w punkcie IIC w Załączniku 5.

STRATEGIE ŻYCIOWE OWADÓW ZAMIESZKUJĄCYCH WNĘTRZE PNIA DRZEWA

Owady zamieszkujące wewnątrz drzew stanowią fascynujący obiekt badań ekologicznych. Ich środowisko życia jest unikatowe, ponieważ z jednej strony jest ono względnie bezpieczne pod względem presji ze strony drapieżników i pasożytów, z drugiej, zdrewniałe tkanki stanowią bardzo ubogie i trudnostrawne źródło pokarmu. Strategią ekologiczną owada-drewnojada zainteresowałam się na tyle, że w ramach pracy magisterskiej skonstruowałam budżet energetyczny dla gatunku odżywiającego się najbardziej wewnętrzną i najuboższą w składniki odżywcze tkanką, drewnem (xylem). W swoich badaniach ustaliłam, że powodem powolnego wzrostu larw zmorsznika czerwonego *Aredolpona* (= *Corymbia*) *rubra* (Coleoptera, Cerambycidae) jest w większym stopniu niska jakość pokarmu (o czym świadczą względnie niska wydajność asymilacji oraz niskie tempo konsumpcji), niż wysokie koszty metaboliczne trawienia pokarmu, o czym świadczy z kolei względnie wysoka wydajność produkcji netto **[1, 2]**. Wyniki moich badań zaprezentowałam na konferencji ISEPEP w Roskilde (Dania) w 2005 r. **[2]**. Tematykę tę postanowiłam kontynuować w czasie swojego doktoratu, tym razem stawiając sobie za cel opisanie strategii życiowej *A. rubra* uwzględniającej nie tylko bioenergetykę, ale również demografię i strategię rozrodczą oraz umieszczając tę strategię na tle owadów zajmujących inną niszę we wnętrzu pnia, a wreszcie na szerszym tle strategii życiowych owadów. Projekt badań przedstawiłam na spotkaniu PhD Meeting of Evolutionary Biology w Fiesch (Szwajcaria) w 2003 r. **[1]**. Projekt ten otrzymał finansowanie ówczesnego Ministerstwa Nauki i Informatyzacji **(I)**. W samodzielnie zaplanowanych i zrealizowanych badaniach terenowo-laboratoryjnych uzyskałam wyniki po

raz pierwszy kompleksowo opisujące strategię owada-drewnojada. Poniżej przedstawiam najważniejsze rezultaty moich badań, zaprezentowane również na konferencji BES w 2008 r. [3], wraz z podaniem numeru publikacji z Tabeli 2, Załącznik 5:

- larwy *A. rubra* uruchamiają inne mechanizmy fizjologiczne w przypadku suboptymalnych warunków termicznych (bazujące na manipulacji tempem konsumpcji) niż w przypadku stresujących warunków wodnych (bazujące na obniżaniu tempa respiracji), zaś trawienie celulozy jest kosztowne energetycznie (3);
- dymorfizm płciowy jest związany z dłuższym okresem rozwoju larwalnego u samic (6), dla których sukces rozrodczy jest pozytywnie związany z rozmiarem ciała, jednak tylko jeśli sukces ten mierzony jest jako rozmiar ciała świeżo wylęgłych larw a nie jako wielkość lęgu (Walczyńska 2008, *Norwegian Journal of Entomology*) – być może przyczyną jest tu fakt, że rozrodczość samic jest zależna od temperatury, której doświadczają podczas okresu składania jaj (6);
- wnętrze pnia drzewa jest silnie heterogeniczne; presja śmiertelności zewnętrznej maleje w kierunku wnętrza pnia, zaś odwrotnie układa się wzorzec odżywczej jakości tkanki jako źródła pokarmu (5, 6);
- owady zamieszkujące wnętrze pnia drzewa są w różnym stopniu zależne od trzech kluczowych czynników: temperatury, wilgotności i jakości pokarmu (3);
- owady te są generalnie bezpieczniejsze w swoim środowisku, niż owady zamieszkujące inne typy siedlisk (5).

Dodatkowo, wraz z dr. Maciejem Dańko i prof. dr. hab. Janem Kozłowskim stworzyliśmy oparty na moich danych empirycznych model teoretyczny wyjaśniający zjawisko wielosezonowości u owadów zamieszkujących wnętrze pnia drzewa (4). Nasze wyniki wyjaśniły występowanie większej wewnątrzgatunkowej zmienności rozmiarów ciała u chrząszczy-drewnojadów, w porównaniu z owadami reprezentującymi inne środowisko życia oraz wielosezonowość tych gatunków. Obie powyższe cechy są konsekwencją optymalizacji rozmiarów ciała w warunkach jednocześnie niskiej jakości pokarmu i niskiej presji śmiertelności zewnętrznej, oraz obecności warunków niekorzystnych dla rozwoju (zim) w doświadczanych w czasie trwania rozwoju. Nasz model teoretyczny przewidywał dodatkowo, że większa wewnątrzgatunkowa zmienność rozmiarów ciała będzie cechowała gatunki zamieszkujące pod korą, niż te żyjące głębiej we wnętrzu pnia. Ten wynik jest w sprzeczności z ogólnie przyjętym poglądem, jednak wyniki empiryczne wskazują na to, że nasz wynik jest bliższy rzeczywistym zależnościom.

Badałam również zjawisko metanogenezy u *A. rubra*, czyli zdolności do wydzielania metanu będącego tak naprawdę produktem metabolicznym symbiontów jelitowych, ponieważ może ono potencjalnie występować u chrząszczy-drewnojadów z rodziny Cerambycidae, zaś nigdy wcześniej nie zostało u nich odkryte. W tym celu, we współpracy z dr. Jarosławem Nęckim

(AGH), szukaliśmy śladów metanogenezy u larw zmorsznika za pomocą metod chromatograficznych. Ponadto, w ramach otrzymanego przeze mnie stypendium w programie Young Scientists Programme, w laboratorium dr. Kevina Purdy (University of Reading, UK) podjęłam próbę detekcji genetycznych śladów archebakterii odpowiedzialnych za potencjalną metanogenezę. Choć wyniki są niejednoznaczne i stanowią raczej przyczynek do dużego projektu, to moim zdaniem udało nam się stwierdzić, że metanogeneza u owada-drewnojada nie jest wykluczona. Wskazują na to zarówno niewielkie, ale metodologicznie istotne ślady metanogenezy uzyskane za pomocą chromatografii, jak i intrygujące odkrycie obecności RNA archebakterii uprzednio odkrytych u produkujących metan termitów, jednak do tej pory nie poznanych jako mikroby zdolne do metanogenezy. Z tego materiału został przygotowany plakat, zaprezentowany następnie w 2008 r na konferencji BES w 2008 r. [4]. Przygotowałam również publikację przeglądową dotyczącą trawienia zdrewniałych tkanek przez owady i jego związków z różnorodnymi zależnościami symbiotycznymi (**Walczyńska, 2003, Wszechświat**).

BIOLOGICZNE METODY WALKI Z PUCHNIĘCIEM OSADU CZYNNEGO

Wątek aplikacyjny polegający na opracowaniu metody biologicznego zwalczania zjawiska puchnięcia osadu czynnego, do którego nawiązałam w projekcie POMOST, kontynuowałam jako wykonawca w projekcie finansowanym przez NCBiR w ramach programu GEKON (III).

Moje badania wpisywały się w zadanie polegające na określeniu warunków optymalizujących proliferację gatunku o charakterze *biological agent*, wrotka *Lecane inermis*. Konkretnie, zaplanowałam eksperyment, w którym testowany był wpływ gatunku pełzającego pierwotniaka, *Aspidisca cicada*, na trzy parametry pośrednio lub bezpośrednio związane z aktywnością *L. inermis*: jakość kłaczków, parametry fizyko-chemiczne układu oraz tempo wzrostu populacji wrotków. Eksperyment polegał na utrzymywaniu hodowli w czterech zabiegach (po trzy powtórzenia): obecność *L. inermis*, obecność *A. cicada*, obecność *L. inermis* + *A. cicada*, kontrola (brak obu gatunków). Eksperyment przeprowadzono w dwóch wersjach, w układzie zamkniętym oraz w układzie półotwartym. Dodatkowo, przeprowadziłam eksperyment mający na celu wykazanie wpływu różnej liczebności początkowej *A. cicada* na *L. inermis*: w czterech zabiegach hodowlę *A. cicada* rozpoczęłam od innej początkowej liczebności, a po dwóch dniach do każdego zabiegu dodałam taką samą liczebność wrotków. Każdy z eksperymentów trwał około 3 tygodni. Wyniki pokazały, że *A. cicada* ma wyraźny pozytywny wpływ na tempo wzrostu wrotków – w układzie zamkniętym maksymalna liczba wrotków była dwukrotnie większa w obecności *A. cicada*, niż w zabiegu bez tego pierwotniaka, zaś w układzie półotwartym początkowe tempo wzrostu wrotków było znacznie wyższe w zabiegu z obecnością *A. cicada*, wyrównało się dopiero po wypadnięciu pierwotniaka z układu eksperymentalnego. Wyniki dotyczące jakości kłaczków, wyrażone za pomocą dwóch miar: wielkości i zawartości, wykazały, że ten pozytywny wpływ ma najprawdopodobniej związek z unikatową rolą *A. cicada* w kształtowaniu kłaczków – obie

miary wykazały trend pośredni dla zabiegu *A. cicada* + *L. inermis*, w stosunku do monokultur: *A. cicada* (najwyższe wartości) i *L. inermis* (najniższe wartości). Badania parametrów fizykochemicznych wykazały, że obecność *A. cicada* znacząco przyspiesza proces nitrifikacji oraz poprawia warunki tlenowe, co dzieje się prawdopodobnie w wyniku selekcji konkretnych szczepów bakterii tworzących kłaczkę. Wszystkie powyższe wyniki wskazują na to, że *A. cicada* może być stosowana jako organizm mający pozytywny wpływ na wrotki *L. inermis* w osadzie czynnym. Bardziej ogólnie, wydaje się że ten gatunek pierwotniaka może być uważany za tzw. gatunek zwornikowy i to nie tylko w półnaturalnym ekosystemie jakim jest osad czynny, ale również w innych systemach związanych z obecnością kłaczek (takich jak na przykład śnieg morski), ponieważ jest to gatunek powszechnie występujący wszędzie, gdzie takie struktury się tworzą. Wyniki badań zostały opublikowane **(10)**.

Uczestniczyłam również w badaniach mających na celu określenie taksonomii i funkcji metabolicznych bakterii wyselekcjonowanych pod wpływem zgryzania przez wrotki. Dwa typy zespołów bakteryjnych tworzących biofilm dla hodowanych laboratoryjnie wrotków, jeden komercyjnie dostępny, a drugi wyselekcjonowany z optymalnie rosnącej hodowli wrotków, zostały przefiltrowane i zbadane pod kątem wybiórczości substratów metabolicznych przy użyciu płytek Biolog[®] ECO przez dr Beatę Klimek. Po wysianiu na płytkach agarowych, bakterie te tworzyły powtarzalne struktury, na które składały się dwa różne morfotypy. Morfotypy te zostały zidentyfikowane metodami molekularnymi jako *Aeromonas veronii* i *Pseudomonas mosselii*. Wyniki uzyskane na płytkach biolog wykazały, że oba zespoły bakterii, komercyjny i wyselekcjonowany, najchętniej zużywały węglowodany i polimery, zaś generalny wzorzec wykazał brak istotnych różnic między nimi. Zatem, intensywna selekcja poprzez zgryzanie przez wrotki doprowadziła do utworzenia zespołu bakteryjnego ubogiego gatunkowo, ale spełniającego metabolicznie podobną funkcję do zespołu pochodzącego z komercyjnego preparatu mikrobiologicznego. Na podstawie tych wyników został przygotowany manuskrypt, który obecnie jest procesowany w czasopiśmie *Journal of Basic Microbiology*.

ROLA TLENU W WYSTĘPOWANIU TERMICZNEJ REGUŁY WZROSTU

Konsekwencją projektu, z którego pochodzi prezentowane przeze mnie osiągnięcie habilitacyjne, było przygotowanie projektu, w którym zajęłam się szczegółowym zbadaniem na ile tlen odgrywa rolę w tzw. odpowiedzi na temperaturę. Projekt ten uzyskał finansowanie w programie NCN OPUS 10 **(IV)** i obejmował zarówno badania laboratoryjne jak i terenowe. W projekcie sprawowałam nieformalną opiekę nad dwojgiem stypendystów-magistrantów. Konkretnie cele i otrzymane wyniki opisuję poniżej:

1. **Określenie z wykorzystaniem ewolucji eksperymentalnej, czy ekspozycja na hipoksję, przy takiej samej temperaturze, może wywołać genetyczne zmniejszenie rozmiarów ciała.** W tym celu 11 klonów należących do gatunku wrotka *Lecane*

inermis zostało zmieszanych w równych proporcjach i umieszczonych w trzech zabiegach eksperymentalnych. W każdym z nich temperatura zmieniała się w cyklu trzydniowym od wysokiej, poprzez pośrednią, do niskiej i znów poprzez pośrednią do wysokiej. Zabiegi różnicował reżim tlenowy, stanowiły je: normoksja, hipoksja polegająca na zmniejszonej o połowę ilości tlenu w całym zakresie temperatury oraz hipoksja, gdzie zmniejszenie ilości tlenu o połowę dotyczyło jedynie temperatury wysokiej. W takich warunkach wrotki były utrzymywane przez okres sześciu miesięcy. W tym okresie sześć razy pobierane były próbki do pomiarów wielkości. Za każdym razem z każdej linii eksperymentalnej (sześć linii na zabieg) pobierane było ok. 60 samic, które były utrzymywane w warunkach niskiego zagęszczenia i karmione *ad libitum*, transferowane do pokolenia F3. Samice z tego pokolenia były fotografowane na materiale utrwalonym a następnie mierzone w celu stwierdzenia ewentualnych różnic w rozmiarach ciała. Powyższa procedura ma na celu wyeliminowanie efektów matczyńskich i środowiskowych, tak aby uzyskać pewność, że ewentualne różnice zostały utrwalone genetycznie w drodze ewolucji kierunkowej. Wyniki tego eksperymentu nie zostały jeszcze w całości przeanalizowane. Analiza rozmiarów z pierwszych dwóch serii pomiarowych wskazuje na brak różnic między zabiegami.

- 2. Mechanizmy i adaptacyjny charakter selekcji na rozmiar ciała w warunkach hipoksji.** Ogólna hipoteza była następująca: hipoksja selekcjonuje w kierunku fenotypowo mniejszych rozmiarów ciała, poprzez redukcję rozmiarów komórek (mechanizm proksymalny), w celu utrzymania szerokiego zakresu dla metabolizmu tlenowego (mechanizm ultymatywny). Trzy klony należące do gatunku *L. inermis* różniące się preferencjami termicznymi poddałam trzem reżimom hipoksji: łagodna hipoksja w warunkach optymalnej temperatury, głęboka hipoksja związana z temperaturą powyżej optymalnej, oraz głęboka hipoksja w optymalnej temperaturze, ale z bardzo niskim stężeniem tlenu. Wraz z zespołem badaliśmy efektywność metabolizmu tlenowego (spektrofotometryczna analiza metabolizmu związanego z trawieniem, tzw. Specific Dynamic Action, SDA), dostosowanie (tempo wzrostu populacji i rozrodczość), oraz rozmiary ciała i wielkość komórek. Wyniki wykazały, że a. wrotki reagują na hipoksję inaczej w zależności od tego, czy znajdują się w warunkach optymalnych, czy stresowych, b. klony wykazują podobną reakcję w przypadku pierwszym, zaś różnią się reakcją na hipoksję gdy są poddane stresowi polegającemu na ekspozycji na zbyt wysoką temperaturę lub zbyt niskie stężenie tlenu, c. efektywność metabolizmu tlenowego jest związana z dostosowaniem (im większa efektywność, tym wyższe dostosowanie), jednak d. utrzymanie tej wysokiej efektywności metabolicznej może być uzyskane za pomocą innych mechanizmów, niż tylko zmniejszanie rozmiarów własnych komórek, zwłaszcza w warunkach stresu. Podsumowując, mniejsze rozmiary komórek i, co za tym idzie, rozmiary ciała w odpowiedzi na hipoksję zwiększają efektywność metabolizmu tlenowego utrzymując wysokie dostosowanie, jednak tylko w warunkach łagodnej hipoksji. Warunki

stresowe powodują uruchomienie alternatywnych (prawdopodobnie) fizjologicznych procesów, które nie są uniwersalne lecz zależne od preferencji wykazywanych przez dany organizm (klon). Powyższe wyniki zostały zaprezentowane na konferencji BES w Gandawie (Belgia) w 2017 r. [12] i są przygotowywane do publikacji.

3. **Ekologiczna zależność między rozmiarami ciała a parametrami termiczno-tlenowymi w warunkach naturalnych.** Badania terenowe przeprowadziłam we współpracy z prof. Manuelem Serra z Uniwersytetu w Walencji. Dotyczyły one sześciu gatunków należących do kompleksu gatunków kryptycznych grupy wrotka *Brachionus plicatilis*, różniących się rozmiarami ciała, zasiedlających kompleks dziesięciu stawów położonych na hiszpańskim wybrzeżu Morza Śródziemnego, różniących się warunkami środowiskowymi. Badania polegały na wyizolowaniu jaj przetrwalnych z osadów, a następnie założeniu hodowli klonów pochodzących od pojedynczych wrotków, które się z tych jaj wylęgły. Kilkanaście do trzydziestu osobników z każdego klonu reprezentującego dany gatunek sfotografowałam, a następnie zmierzyłam (w sumie około 6000 osobników) w celu przetestowania hipotez: a. rozmiary ciała danego gatunku różnią się między stawami, b. różnice te są związane ze specyficznymi warunkami środowiskowymi. Analiza PCA dla parametrów: temperatura, tlen, zasolenie, pH wykazała, że stawy różnią się pod względem warunków tlenowych bardziej niż pod względem warunków termicznych. Dla trzech z sześciu gatunków stwierdziliśmy zgodne z przewidywaniami większe rozmiary ciała przy większej zawartości tlenu w wodzie, zaś dla trzech gatunków stwierdziliśmy większe rozmiary przy wyższej temperaturze. Ten ostatni wynik wydaje się być wbrew naszym przewidywaniam, jednak okazuje się, że w badanym systemie stawów brak jest negatywnej zależności między temperaturą a tlenem, najprawdopodobniej związany z różną trofią tych zbiorników, podczas gdy istnienie tej zależności jest warunkiem koniecznym do zaistnienia przyczynowo-skutkowego rozumowania w badaniach nad zależnością rozmiarów ciała od temperatury. Nasz wynik może więc być wytłumaczony w ten sposób, że większe rozmiary ciała w cieplejszych stawach są związane bardziej z lepszą bazą pokarmową dla wrotków, niż z mniejszą zawartością tlenu. Wyniki te zostały zaprezentowane na konferencji PEC w 2018 r. [15] i są przygotowywane do publikacji.
4. **Ponowna analiza istniejących baz danych pod kątem znaczenia tlenu w występowaniu zależności między temperaturą a rozmiarami ciała w badaniach terenowych.** W publikacji (9) zaprezentowałam wyniki re-analzy wykonanej na danych z publikacji, której autorzy stwierdzili brak odpowiedzi rozmiarów ciała na temperaturę u okrzemek zasiedlających system źródeł termalnych w Islandii. Analiza we współpracy z dr. Łukaszem Sobczykiem wykazała, że źródła wchodzące w skład tego systemu można podzielić na trzy grupy, zaś rozmiary ciała maleją zgodnie z przewidywaniami jedynie w grupie źródeł najcieplejszych, a jednocześnie najuboższych w tlen. Ten wynik pozwolił nam na konkluzję, że w przypadku badań terenowych należy brać pod uwagę nie tylko temperaturę, ale również zawartość

tlenu. W innym przypadku, we współpracy z dr Agnieszką Gudowską przeanalizowałyśmy, z uwzględnieniem filogenezy, preferencje termalne i tlenowe u 188 gatunków wrotków, korzystając z bazy danych opublikowanej trzydzieści lat wcześniej. Poddając analizie zależność rozmiarów ciała od parametrów (minimum, maksimum, optimum i zakres) opisujących warunki termiczne oraz tlenowe, wykazałyśmy, że na poziomie międzygatunkowym rozmiary ciała wrotków wyewoluowały w odpowiedzi zarówno na temperaturę, jak i na tlen, jednak w stosunku do różnych bodźców - wrotki są tym mniejsze im wyższe specyficzne dla gatunku optimum temperatury, oraz im węższy zakres tolerancji na zawartość tlenu. Ponadto, na podstawie analizy wariancji każdego z parametrów stwierdziłyśmy, że najmniejsza zmienność charakteryzuje optymalne warunki tlenowe, co może oznaczać, że ten parametr jest najbardziej konserwatywny i podlega najmniejszym zmianom w badanej grupie gatunków. Taki wynik oznaczałby, że to związane z ociepleniem zmniejszenie zawartości tlenu, a nie sam wzrost temperatury, może mieć potencjalnie największy negatywny wpływ na żywe organizmy. Wyniki te zostały przedstawione na konferencji APS w Nowym Orleanie (USA) [17] i są przygotowywane do publikacji.

POZOSTAŁE ZAGADNIENIA BADAWCZE PRZEDSTAWIONE W PUBLIKACJACH

W początkowym okresie studiów magisterskich zaangażowałam się jako wolontariuszka w projekt reintrodukcji motyla niepylaka apollo (*Parnassius apollo*) w Pieninach. Przy tej okazji zgłębiłam dokumentację dotyczącą historii występowania tego gatunku w Polsce. Na tej podstawie powstała publikacja przeglądowa w czasopiśmie *Chrońmy przyrodę ojczystą* (Mucha, 1999), wydana pod moim panieńskim nazwiskiem.

Pewnym uzupełnieniem do badań nad strategią chrząszcza-drewnojada było zbadanie, w jakim stopniu wewnątrz pnia rozkładającego się drzewa buforuje oddziaływanie niskich temperatur w czasie zimy. Bardzo ważnym nowym elementem pracy (7) przygotowanej we współpracy z dr. hab. Pawłem Kapustą (PAN, Kraków) był fakt, że badania były prowadzone w mikroskali, ponieważ jeden z czujników temperatury był zawsze umieszczony wewnątrz pniaka, a drugi na zewnątrz tuż obok, lekko przykryty ściółką. Pozwoliło to na zrewidowanie wcześniejszych rezultatów, najczęściej opierających się na temperaturze zewnętrznej mierzonej w najbliższej stacji meteorologicznej. Dodatkowo, oprócz temperatur minimalnych i maksymalnych wzięliśmy pod uwagę również dzienną zmienność temperatury. Wreszcie, badany okres czasu podzieliliśmy na epizody z obecnością śniegu, z obecnością mrozu bez śniegu, oraz bez mrozu i śniegu. Pozwoliło nam to wykazać, że dynamika temperatur w mikroskali bardzo się różni między tymi epizodami, co niewątpliwie ma ogromne znaczenie dla organizmów przezimowujących we wnętrzu pniaka. Ponadto wykazaliśmy, że a. drzewo stanowi bufor w stosunku do temperatury minimalnej, b. jest tendencja do większej zmienności temperatur na zewnątrz pniaka, w stosunku do wnętrza, c. na podstawie dwóch horyzontalnych

głębokości stwierdziliśmy, że im głębiej w pniaku, tym wyższa temperatura minimalna oraz tym mniejsza dzienna zmienność temperatury. Podsumowując, na podstawie wyników naszej pracy rozkładające się pniaki mogą być traktowane jako zimowe refugia dla wszelkich bezkręgowców, nie tylko tych obligatoryjnie związanych z wnętrzem pnia. Taki wniosek stanowi argument za pozostawianiem martwego drewna, również w lasach o znaczeniu gospodarczym.

W 2015 roku odbyłam miesięczny staż w ramach projektu *Ecology*, realizowanego w Instytucie Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego. Staż odbywał się w Instytucie Cavanilles (Uniwersytet w Walencji) w grupie badawczej prof. Manuela Serra. Przeprowadziłam wówczas badania z wykorzystaniem ewolucji eksperymentalnej, mające na celu przetestowanie czy wrotki z gatunku *Brachionus plicatilis sensu stricto* ewoluują w niskiej/wysokiej temperaturze wykazując zmianę rozmiaru ciała zgodną z przewidywaniami „jeśli jest cieplej, rośnij mniejszy”. Mieszanek czterestu klonów założonych w tamtejszym laboratorium przez dr. Lluisa Franch-Grasa umieściłam w dwóch zabiegach temperaturowych, zakładając po trzy linie eksperymentalne na zabieg. W ciągu miesiąca trwania eksperymentu trzykrotnie pobierałam próbki do pomiaru rozmiarów ciała samic w pokoleniu F3. Wyniki wskazują na to, że w tak krótkim okresie czasu nastąpiła ewolucja rozmiarów ciała, w kierunku zgodnym z oczekiwaniami. Wyniki pracy zostały opublikowane (**8**), zaś dodatkową wartością było dla mnie poznanie ewolucji eksperymentalnej jako techniki, co skutecznie wykorzystałam przygotowując następnie swój projekt OPUS.

W ramach projektu POMOST została opublikowana jeszcze jedna praca (**11**), jednak nie została ona włączona do osiągnięcia habilitacyjnego. Wynika to z faktu, że pierwotne założenia eksperymentu nie mogły zostać spełnione w związku z problemami z wrażliwością organizmu badawczego na warunki eksperymentalne, jednak przeanalizowane dane okazały się być na tyle ciekawe, że zostały zinterpretowane w innym kontekście i opublikowane. Eksperyment miał być powtórzeniem układu wykorzystanego dla wrotka *L. inermis*, tzn. dwuetapowego testu wpływu wielkości ciała na rozrodczość w kombinacji niska/wysoka temperatura i niska/ wysoka zawartość tlenu, z tym, że organizmem badanym była pierścienica *Aeolosoma hemprichi*. Przeprowadzenie takiego samego eksperymentu na tym gatunku miało na celu sprawdzenie, czy u tego nieeutelicznego gatunku reakcje na warunki badawcze będą się różniły od reakcji eutelicznego wrotka. Jednak *A. hemprichi* okazała się na tyle wrażliwa na warunki w drugim etapie eksperymentu, że nie udało się osiągnąć pozytywnego tempa wzrostu populacji w żadnym zabiegu. Zwierzęta zostały policzone, zaś rozmiar ciała i wielkość komórek tłuszczowych zmierzyłam na podstawie materiału przygotowanego według procedury opracowanej przez dr Annę Marię Łabęcką. Dokonaliśmy bardzo intrygujących odkryć dotyczących wpływu warunków stresowych na zależność między rozmiarami ciała a rozmiarami komórek. Po pierwsze, relacja ta okazała się być zależna od warunków, silniejsza w warunkach stresowych niż optymalnych

(porównanie wyników otrzymanych dla wrotka potwierdziło naszą tezę). Po drugie, zależność ta jest inna w sytuacji, kiedy bodźcem jest wzrost temperatury, a inna kiedy następuje jej spadek. Na podstawie naszych danych spekulujemy, że może to być wynikiem innej wrodzonej reakcji na wzrost lub spadek temperatury, albo może być skutkiem procesu polegającego na utrzymywaniu konkretnego, rozwojowo ustalonego stosunku wielkości komórek do wielkości ciała. Powyższe wyniki są ciekawym przyczynkiem do dyskusji na temat ewentualnego adaptacyjnego charakteru zjawiska zależnych od temperatury rozmiarów ciała i rozmiarów komórek, a także w dyskusji na temat konieczności rozróżnienia między szumem rozwojowym (ang. *developmental noise*) a plastycznością fenotypową.

ZREALIZOWANE ZAGADNIENIA BADAWCZE KTÓRE NIE ZOSTAŁY OPUBLIKOWANE

W 2000 roku uczestniczyłam w miesięcznym kursie ekologii tropikalnej w Kenii, organizowanym przez Tropical Biology Association (Cambridge, UK). W ramach dwutygodniowych projektów będących częścią kursu badałam niektóre aspekty skomplikowanego układu symbiotycznego między akacją a dwoma gatunkami mrówek, występujących na akacji w różnych okresach jej rozwoju, tworząc swoistą sukcesję symbiotyczną.

Na przełomie 2000 i 2001 roku odbyłam półroczny staż magisterski w Uniwersytecie w Wageningen (Holandia), pod opieką naukową dr. Jana Kammengi. W ramach stażu brałam udział w realizacji projektu *Phenotypic plasticity of C. elegans*. Moje zadanie polegało na wyselekcjonowaniu homozygotycznych linii *Caenorhabditis elegans*, a następnie określeniu tempa wzrostu dla każdej linii w dwóch temperaturach. Pozwoliło to wyznaczyć te linie, które w dalszych etapach projektu były obiecujące w kontekście detekcji konkretnych genów odpowiedzialnych za plastyczność fenotypową związaną z tempem wzrostu.



Aleksandra Walczyńska

Kraków, dn. 14 marca 2019 r.