

dr hab. Paweł Brzęk

Białystok, 20.5.2021

Katedra Ekologii Ewolucyjnej i Fizjologicznej

Wydział Biologii

Uniwersytet w Białymstoku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Przybylskiej-Piech pt.

**‘Polimorfizm zimowego fenotypu w populacji heterotermicznego gryzonia, chomicznika
dżungarskiego, *Phodopus sungorus*’**

przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Jefimow, prof. UMK w Katedrze Fizjologii
Zwierząt i Neurobiologii Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu

Tematem rozprawy doktorskiej mgr Anny Przybylskiej-Piech jest polimorfizm zimowego fenotypu u chomicznika dżungarskiego. Chomiczniki, podobnie jak wiele innych zwierząt, mogą zimą wykazywać szereg zmian fenotypowych np. zmniejszając masę ciała, zwiększając prawdopodobieństwo zapadania w torpor czy zmieniając rodzaj futra. Co ciekawe, nie wszystkie osobniki zmieniają fenotyp (a więc oprócz osobników ‘odpowiadających’ na warunki zimowe, mamy też osobniki ‘nieodpowiadające’), w dodatku występują też osobniki częściowo odpowiadające, czyli wykształcające tylko niektóre cechy fenotypu zimowego. Celem badań doktorantki było poznanie czynników związanych z występowaniem fenotypu zimowego u chomiczników. Wszystkie eksperymenty zostały przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych i obejmowały zagadnienia związane z behawiorem zwierząt, tempem metabolizmu, tempem wzrostu czy też cechami historii życia.

Mam jedną uwagę do samego tytułu pracy – słowo ‘populacja’ jednoznacznie sugeruje dla mnie że badania prowadzono na jakiejś populacji chomiczników żyjących w warunkach naturalnych. Tymczasem wszystkie eksperymenty prowadzone były na zwierzętach żyjących od wielu pokoleń w hodowli, w dodatku jak się okaże pod koniec pracy nie wiemy prawie nic o występowaniu i roli polimorfizmu fenotypu zimowego w naturze. Uważam że tytuł lepiej oddawałby zawartość rozprawy gdyby mówił o czynnikach związanych z polimorfizmem zimowym lub wpływających na jego wykształcenie.

Praca rozpoczyna się od krótkiego wstępu, wprowadzającego w badane zagadnienia. Nie mam do niego większych zastrzeżeń, choć użycie słowa ‘cechy historii życiowych’ w liczbie mnogiej przy omawianiu zagadnień badanych w trzecim artykule jest trochę niefortunne. Owszem, autorka badała m.in. wpływ kolejności miotów, co można uznać za cechę historii życia, ale co najmniej tak samo ważnym czynnikiem był tu fotoperiod, a więc raczej czynnik środowiskowy.

Właściwa rozprawa składa się z trzech artykułów, mających tych samych autorów. W każdym z nich doktorantka jest pierwszym autorem (w dwóch także autorem korespondencyjnym), patrząc na oświadczenia współautorów widać też rosnący wkład doktorantki w przygotowanie kolejnych prac. Pozostali autorzy wyrazili zgodę na użycie tych artykułów w rozprawie doktorskiej p. Przybylskiej-Piech, w dalszej części będę używał zamiennie słów ‘doktorantka’ i ‘autorka’.

W pierwszej pracy doktorantka zbadła BMR i cechy behawioralne u osobników reprezentujących różne fenotypy zimowe i aklimowanych do warunków letnich i zimowych. Praca ta jest związana z szeroko dyskutowaną obecnie teorią ‘pace of life’, czyli związkami między tempem metabolizmu, behawiorem i cechami historii życia. Co ciekawe, dla mnie pierwszym narzucającym się przewidywaniem byłoby to że osobniki z wyższym BMR powinny mieć wyższe korzyści z wykształcenia fenotypu zimowego, umożliwiającego oszczędzanie energii, podczas gdy doktorantka przewidywała że osobniki z wyższym BMR powinny być ‘proaktywne’ przez cały rok a więc rzadziej wykształcać fenotyp zimowy. Każde z tych przewidywań można przekonująco uzasadnić, a cała sytuacja świadczy tym że planowane badania wiążą się z fundamentalnym problemem dotyczącym teorii ‘pace of life’: czy ewentualny związek między poziomem metabolizmu a behawiorem jest niezależny od warunków otoczenia, w szczególności czy występuje on nawet w niekorzystnych warunkach środowiska?

Nie ukrywam że poczułem się trochę rozczarowany kiedy okazało się że zwierzęta które wykształciły w zimie różne fenotypy, nie różniły się w lecie ani poziomem BMR, ani swoim behawiorem. W warunkach zimowych nastąpił wzrost poziomu BMR oraz zachowań ‘proaktywnych’, ale był on najmniejszy (czasem nieistotny) u osobników odpowiadających. Wynik ten sugeruje że osobniki odpowiadające mają najniższe koszty utrzymania w zimie, czyli fenotyp ten rzeczywiście może przynosić oszczędności energetyczne w tym okresie. Ogólnie, wyniki te nie potwierdzają teorii ‘pace of life’. Mam tutaj pewien – prawie filozoficzny – problem z interpretacją wyników tego eksperymentu. Osobniki odpowiadające wykazują rzeczywiście najmniejsze zmiany w swym behawiorze i fizjologii, ale czy oznacza to że są one najmniej plastyczne? Wykształcenie fenotypu zimowego oznacza tak naprawdę pojawienie się szeregu zmian (np. torpor czy zmiana futra) które powodują że wręcz nie mamy powodu oczekiwać większych zmian zachowań proaktywnych w tym czasie. To kwestia tego co rozumiemy przez plastyczność – można powiedzieć że zwierzę wykształcające fenotyp zimowy zmienia się bardziej niż inne, ale dzięki temu może wykazać mniejsze zmiany niektórych cech jak behawior czy BMR. Nie jest to zarzut pod adresem doktorantki, a raczej przykład jak różnie można interpretować ten sam wynik.

Moją uwagę zwróciła figura 1 pokazująca BMR w lecie i w zimie u osobników wykazujących różne fenotypy zimowe. Wyniki testów pokazały że BMR zwiększył się w zimie u osobników częściowo odpowiadających (Fig 1c) ale nie zmienił się u osobników odpowiadających (Fig. 1a). Niestety, na obu figurach zakresy zmienności masy ciała (czyli kowariaty) w obu sezonach są dość różne. Nie jest to oczywiście wina autorki (masa u osobników odpowiadających z definicji

wykazuje zmiany sezonowe), ale taka sytuacja może potencjalnie wpływać na wyniki analizy kowariancji. Na szczęście masa ciała w lecie była taka sama dla wszystkich fenotypów, a brak różnicy między fenotypami w BMR w lecie jest według mnie ważniejszym wynikiem niż różne zmiany BMR u różnych fenotypów w zimie.

W drugim artykule autorka zbadała związek polimorfizmu fenotypu zimowego z cechami historii życia. Najważniejszym wynikiem jest to że pary złożone z osobników odpowiadających później przystępowały do rozrodu, a także wydawały lżejsze potomstwo, choć sama wielkość miotu i tempo wzrostu młodych nie różniły się między fenotypami. Jest to bardzo ważny wynik, gdyż jeśli w populacji ma utrzymywać się polimorfizm fenotypów zimowych, to każdy z nich powinien wykazywać różne zalety i wady w innych warunkach. Fenotyp zimowy może ułatwić przeżycie zimy, ale kosztem może być np. niższy sukces reprodukcyjny. Autorka wykazała że tak jest rzeczywiście. Trochę nieoczekiwanym wynikiem jest to że efekt wykształcania fenotypu zimowego był większy u samców – tylko u nich pojawił się wpływ masy ciała na czas przystąpienia do rozrodu, czy wzrost poziomu stresu oksydacyjnego. Można by się spodziewać raczej silniejszego wpływu na samice (co zaznaczyła sama autorka). Niestety, autorka nie pisze wyraźnie że znalazła istotną interakcję fenotypu z płcią dla stresu oksydacyjnego, choć wydaje się że interakcję tę pokazuje jeden wynik na stronie 4 w prawej kolumnie (tam gdzie $F=6,24$; powinno to być jednak napisane jednoznacznie). Muszę tu wspomnieć że wyniki testów w tabelach są czasem pokazywane w sposób który utrudnia szybkie zrozumienie jakie konkretne grupy porównywane są w danych teście (np. w Tabeli 3).

Niestety, mam do tego artykułu kilka uwag. Autorka utworzyła 11 par gdzie rodzice wykazywali fenotyp odpowiadający i 29 par z fenotypem nieodpowiadającym. Sukcesem zakończył się rozród wszystkich par w pierwszej grupie i tylko 12 (a więc mniej niż połowa) w drugiej grupie. Autorka uznała pomiary 17 nieudanych par jako grupę '*non-breeding*', czyli de facto grupę kontrolną. Jest to dla mnie niedopuszczalne – nie wiemy dlaczego te zwierzęta nie przystąpiły do rozrodu, z dużym prawdopodobieństwem różniły się czymś od osobników które do rozrodu przystąpiły (nawet jeśli nie wiemy czym). Na wyniki eksperymentów badających koszt rozrodu może wpływać fakt że zwierzęta w gorszej kondycji nie przystępują do rozrodu i są dlatego wykluczane z grupy eksperymentalnej (Alonso-Alvarez i in. 2017, *BioScience* 67: 258-270). Tutaj autorka poszła jeszcze dalej i utworzyła z tych zwierząt osobną grupę eksperymentalną. Na szczęście nie jest to kwestia kluczowa dla głównych wniosków artykułu.

Drugi problem to wątpliwości dotyczące wieku zwierząt. Na początek opisu metod czytamy że zwierzęta po urodzeniu spędziły 4 miesiące w 18 °C, następnie przez 3 miesiące były aklimowane do warunków zimowych, a po kolejnych 2 tygodniach połączono je w pary. Daje to wiek około 7,5 miesiąca. Tymczasem autorka stwierdza kilkakrotnie że zwierzęta zostały połączone w pary w wieku 1 roku. Być może w opisie metod zostało coś przeoczone? Jest to o tyle poważny problem, że właśnie wiek zwierząt został użyty do wytłumaczenia wspomnianych problemów z rozrodem, a autorka podkreśla że efekty starzenia mogą pojawiać się już u osobników mających kilka miesięcy.

Mam też pytanie dlaczego pomiary OS we krwi prowadzono 2-6 tygodni po usamodzielnieniu się miotu. Przecież to tylko pobranie krwi; znacznie bardziej wymagający logistycznie pomiar BMR został wykonany w krótszym okresie czasu. Czy zastosowane metody uniemożliwiały zamrożenie próbek osocza krwi? Autorka wyraźnie przeciwstawia sobie (strona 8, lewa kolumna) wyniki badań nad myszami laboratoryjnymi selekcjonowanymi na wysoki i niski poziom BMR oraz własne wyniki. Podczas gdy cytowana praca wykazała że myszy z wyższym BMR wykazywały lepszą opiekę rodzicielską, doktorantka wykazała tylko że rozród nie wpłynął na BMR chomiczaków – zakładając że powód dla którego ponad połowa zwierząt nie przystąpiła w ogóle do reprodukcji nie wiąże się z BMR. W dyskusji jest też pewna sprzeczność – jej podsumowanie rozpoczyna się od stwierdzenia że jest to pierwsza praca porównująca rozród osobników reprezentujących różne fenotypy zimowe, ale na początku dyskusji cytowanych jest kilka artykułów które miały wykazać m.in. wyższy sukces reprodukcyjny osobników odpowiadających niż nieodpowiadających (nie wspominając już że jest to raczej odwrotny wynik niż to co wykazała doktorantka).

W ostatnim artykule doktorantka zbadła jaki jest wpływ kolejności miotu w jakim wyrósł dany osobnik oraz długości ekspozycji na letni fotoperiod na wykształcenie się fenotypu zimowego. Poprzez manipulowanie długością okresu ekspozycji na letni fotoperiod autorka mogła oddzielić od siebie efekt tej ekspozycji od efektu kolejności miotu (co prawda efektem ubocznym są 4 miesiące różnicy wieku między grupami III i IV w momencie początku ekspozycji na fotoperiod zimowy - nie jest to nigdzie dyskutowane ale w poprzednim artykule autorka wspomina o tym że już kilkumiesięczne osobniki gatunków z rodzaju *Phodopus* mogą wykazywać efekt starzenia się). Ogólnie, zimowe futro pojawiło się rzadziej u osobników które były dłużej ekspozycjonowane na letni fotoperiod, ale nie było efektu kolejności miotu. Żaden z badanych czynników nie wpływał na prawdopodobieństwo pojawienia się torporu. Młode osobniki pochodzące z trzeciego miotu rosły szybciej ale u osobników dojrzałych różnice w masie ciała zniknęły. Zasadniczym pytaniem jest tutaj kwestia na czym polega efekt kolejności miotu w laboratorium i jak dobrze oddaje on efekt kolejności miotu w naturze. W warunkach laboratoryjnych efekt kolejności miotu może wynikać tylko ze zmian zachodzących w rodzicach, w warunkach terenowych bardzo prawdopodobne są np. zmiany w ilości czy jakości pokarmu w ciągu sezonu. O ile dobrze zrozumiałem ostatnie zdanie podsumowania, autorka stwierdza że co prawda nie wykazała wpływu kolejności miotu na użycie torporu, to jednak taki wpływ może się pojawić w naturze w sytuacji np. ograniczenia dostępności pokarmu. Zgadzam się z tym, tylko takie sformułowanie trochę poddaje w wątpliwość znaczenie uzyskanych wyników. Autorka podkreśla też - jako szczególnie ważny wynik – to że po raz pierwszy wykazała istnienie zmienności fenotypów zimowych w obrębie potomstwa pochodzącego od jednej pary, nawet w obrębie tego samego miotu. Jest tu jednak jedna kwestia której nie rozumiem – dlaczego w tym eksperymencie ‘warunki zimowe’ oznaczają tylko zmianę fotoperiodu, bez zmian temperatury otoczenia? W dwóch poprzednich eksperymentach temperatura była niższa zimą, a w dyskusji w trzecim

artykule autorka wprost przyznaje że wyższa temperatura otoczenia mogła mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Rozprawa kończy się podsumowaniem. Zaraz na początku znajduje się niespodziewana i zaskakująca informacja że nie ma praktycznie żadnych danych na temat polimorfizmu fenotypu zimowego u chomicznika w warunkach naturalnych. Nie jestem przeciwnikiem badań laboratoryjnych i sam musiałem nieraz uzasadniać że mogą one dostarczyć informacji o przebiegu ewolucji w warunkach naturalnych, ale w tym przypadku muszę jednak zadać kilka pytań. Może z powodu braku danych o chomicznikach skupić się bardziej w podsumowaniu na innych gatunkach z polimorfizmem fenotypów o których mamy może więcej danych terenowych? Czy prace o numerach 28-32 cytowane w artykule 2 i mówiące o dużej zmienności między 'populacjami' chomicznika w wykształcaniu fenotypu zimowego dotyczą badań terenowych czy są to raczej różnice między hodowlami laboratoryjnymi? Doktorantka wspomina także o autorach którzy uważają że fenotyp nieodpowiadający może być potencjalnym artefaktem wynikającym z warunków laboratoryjnych. Muszę przyznać że jest to co najmniej niepokojące w połączeniu z sytuacją opisaną w artykule 2, gdzie udany rozród zaobserwowano u wszystkich zwierząt odpowiadających i u mniej niż połowy zwierząt nieodpowiadających. Czy jest to dowód na szybsze starzenie się tego fenotypu czy raczej na to że prezentujące go osobniki są w jakiś sposób 'gorsze'? Czy są jakieś informacje od ilu pokoleń hodowano w niewoli zwierzęta które były obiektem eksperymentów opisanych w rozprawie?

Główną myślą przewodnią całej rozprawy (podkreśloną także w podsumowaniu) jest to że utrzymywanie się różnych fenotypów w warunkach naturalnych wynika z tego że każdy z nich może być bardziej opłacalny w innych warunkach środowiskowa (np. surowe i łagodne zimy). Z powodu braku danych terenowych należy jednak raczej uznać że uzyskane wyniki są wskazówkami co należy badać w warunkach terenowych. Ogólnie, mamy tutaj nie tyle próbę wytłumaczenia w warunkach laboratoryjnych zjawisk obserwowanych w naturze ile raczej możliwość sprawdzenia czy zjawiska obserwowane w laboratorium występują także w naturze (aż się prosi o grant na wyjazd do Rosji czy Kazachstanu!). Jest to o tyle ważne, że - jak zauważyła doktorantka - badany problem może mieć kapitalne znaczenie w związku z globalnym ociepleniem i zmianami klimatycznymi.

Nie jestem jednak przekonany wytłumaczeniem znaczenia istnienia zjawiska 'późnej odpowiedzi' czyli wykształcania fenotypu zimowego dopiero po kilkunastu tygodniach przebywania w warunkach zimowych (strony 51-52). Doktorantka wyjaśnia że w nieprzewidywalnych warunkach środowiska czynnikiem wyzwalającym powstanie późnej odpowiedzi może być nie fotoperiod a np. *'inny czynnik zewnętrzny, np. opady śniegu, niska temperatura otoczenia, czy dostępność pożywienia'*. Brzmi to rozsądnie ale w badaniach doktorantki wszystkie zwierzęta miały te same warunki, jedynym czynnikiem mogącym spowodować powstanie fenotypu zimowego była zmiana fotoperiodu, ale niektóre zwierzęta wykształciły fenotyp zimowy szybko, a inne dopiero po kilku miesiącach.

Pomimo szeregu uwag jakie zamieściłem w swojej recenzji, nie mam jednak wątpliwości że oceniana rozprawa przedstawia kilka dobrze zaplanowanych, przeprowadzonych i zinterpretowanych eksperymentów w dość metodologicznie niełatwej i niewdzięcznej dziedzinie jaką jest ekologia fizjologiczna. Wątpliwości tych nie mieli także recenzenci prac jakie wchodzi w skład rozprawy. Na szczególną uwagę zasługuje wręcz wyrafinowana analiza statystyczna (zwłaszcza w pierwszym artykule).

Podsumowując, uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Anny Przybylskiej-Piech do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. Paweł Brzęk