

Ocena pracy doktorskiej p. mgra Adama Hermaniuka
pt. The impact of cell size on metabolic rate, growth rate and development in amphibians:
A case study on the diploid and triploid edible frogs
(Pelophylax esculentus)

Wielkość komórek a tempo metabolizmu i rozwoju diploidalnych i triploidalnych
żab wodnych (*Pelophylax esculentus*)

Na ogromne zróżnicowanie wielkości czerwonych krwinek kręgowców zwrócił uwagę w 1875 roku G. Gulliver przedstawiając krwinki olbrzymy i krwinki karzełki w pracy "*On the size and shape of red corpuscles of the blood of vertebrates.*"...*Proceedings of the Zoological Society of London. 1875: 474–495.* Z czasem rozmiary erytrocytów, i innych komórek, powiązano z wielkością genomów i tempem metabolizmu. Z powodów strukturalnych i biochemicznych komórki mniejsze cechuje większy metabolizm niż komórki większe. Przyjmuje się, że pochodną tej zależności jest nie tylko metabolizm całkowity, ale także tempo replikacji DNA, podziałów komórek, wzrostu i rozwoju. Zależności te nie są jednak uniwersalne ani proste. Interesujące są zwierzęta ektotermiczne. Głównymi czynnikami kształtującymi wielkość ich komórek są temperatura i rozmiary genomu. Jeśli niska temperatura zwiększa komórki spowalniając tempo metabolizmu i wzrostu, organizmy środowisk chłodnych rosną wprawdzie wolniej, ale osiągają większe rozmiary ciała, co może dawać wymierne korzyści adaptacyjne, np. zwiększając płodność czy zdolność konkurencji o zasoby. Przykłady są nieliczne, a stosunkowo częste wśród ektotermicznych ryb i czworonogów formy poliploidalne niedostatecznie zbadane.

Celem badań doktoranta była analiza zależności między rozmiarami komórek, wielkością ciała, tempem wzrostu oraz tempem metabolizmu płazów. Badania porównawcze właściwości czy cech organizmów wymagają jednak szczególnej ostrożności. Rozwikłanie ilościowego udziału czynników różnicujących wartości pomiarów cech w porównaniach międzygatunkowych, a taka jest większość badań, jest utrudnione wskutek odrębnej historii ewolucyjnej gatunków (innej ewolucji wzdłuż gałęzi poszczególnych gatunków). By trudności uniknąć, doktorant wybrał pospolitą żabę wodną *Pelophylax esculentus*, hybrydogenetyczny takson/gatunek pochodzenia mieszańcowego, tworzący na Pomorzu szczególne populacje tzw. systemu E-E złożone wyłącznie z osobników *P. esculentus*, które są albo diploidalne (genotyp RL) albo triploidalne (LLR lub LRR). (Nie występuje w nich żaden z gatunków rodzicielskich, *P. lessonae* LL ani *P. ridibundus* RR). Diploidalne i triploidalne żaby systemu E-E różniąc się nie tylko wielkością genomu ale i rozmiarami erytrocytów, są dogodnym obiektem zaplanowanych analiz. Jak wskazują wyniki badań, był to wybór bardzo trafny.

Podstawowym zadaniem, podkreślnie nietrywialnym, było uzyskanie dostatecznej liczby diploidalnych i triploidalnych zygot. Otrzymano je dokonując w laboratorium sztucznego zapłodnienia u 19 par złożonych z samców *P. lessonae* LL z okolic Poznania i samic *P. esculentus* (LR lub LRR) z Pomorza. Wykorzystano tu wiedzę o tym, że diploidalne samice LR składają jaja/gamety różnej wielkości związanej z odmienną ploidalnością: duże LR, średnie R, małe R. Triploidalne samice LRR składają jaja haploidalne, R. Zapładniając jaja triploidalnych samic LRR spermą *P. lessonae* L – uzyskiwano diploidalne *P. esculentus* (RL), a jaja diploidalnych samic LR (R lub LR) spermą *P. lessonae* L – diploidalne i triploidalne *P. esculentus*, (odpowiednio RL i LLR). Triploidalne zygoty pochodzą z jaj dużych, jaja duże

wybijano więc do dalszej hodowli. Złożony schemat krzyżówek umożliwił m.in. uzyskanie diploidalnych i triploidalnych zygot, a w dalszej kolejności zarodków, kijanek oraz przeobrażonych żabek o względnie wyrównanym tle genetycznym. Krzyżówki wykonano w dwu kolejnych sezonach.

Zarodki i wylęte kijanki z każdej krzyżówki hodowano oddzielnie do stadium 25 Gosnera (samodzielne odżywianie się), po czym losowo przydzielano po 70 do dwu akwariów; jedno o temp. wody 19°C, drugie o temp. 24°C. Przyrost masy ciała kijanek śledzono ważąc 10 losowo złowionych kijanek w trzech stadiach rozwoju, a dla określenia tempa rozwoju czas od początku eksperymentu stadium 25 do początku metamorfozy, stadium 42. Wtedy też zważono wszystkie 373 kijanki z 8 krzyżówek zważono. Przeobrażające się kijanki przenoszono do terrariów umieszczonych w klimatyzowanych komorach o temp. powietrza 19 lub 24°C. Po zakończeniu metamorfozy żabki hodowano dalej w terrariach w komorach o tej samej temp. powietrza 23°C przez ok. 3 miesiące, po czym zmierzono ich metabolizm, a następnie uśmiercono celem wykonania preparatów histologicznych dla pomiaru rozmiarów ich hepatocytów i erytrocytów. Rozmiary komórek epidermalnych u kijanek dwu ploidalności mierzono na przekrojach poprzecznych końca ogona kijanek (70 kijanek z 9 krzyżówek). Skład genomowy oraz ploidalność kijanek i żabek określono wykonując preparaty chromosomowe barwione metodą AMP/DAPI pozwalającą odróżnić chromosomy *P. ridibundus* od *P. lessonae* na podstawie fluorescencji pericentromerowej heterochromatyny bogatej w pary zasad A-T charakterystycznej dla *P. ridibundus*.

Przytoczony tu opis jest pobieżny, szczegóły metodyczne, inne pomiary czy analizy statystyczne są drobiazgowo opisane w poszczególnych pracach.

Doktorant wykazał, m.in. że ploidalność i temperatura mają istotny wpływ na rozmiary erytrocytów i komórek naskórki kijanek. W temp. 19°C komórki te były większe zarówno u diploidów jak i triploidów, a u triploidów komórki były także większe w obu temperaturach. Temperatura rozwoju kijanek nie wpływała na rozmiary komórek żabek, jednak triploidy cechowały większe erytrocyty i hepatocyty. Triploidalne kijanki rosły szybciej i miały większą masę niż kijanki diploidalne w temp. 19°C, w temp. 24°C różnice tempa wzrostu zniknęły. Wynik ten wskazuje na lepszą adaptację do środowisk chłodnych. Zwiększona masa u kręgowca poliploidalnego indukowana niską temperaturą jest pierwszym takim doniesieniem. Dokumentuje ono także wykrytą zależność pomiędzy zwiększeniem komórek i zwiększeniem masy ciała. Prawdopodobnie większa masa ciała triploidów w chłodnych siedliskach przynosi korzyści selekcyjne, co tłumaczyć może występowanie większej frekwencji triploidalnych *P. esculentus* w północnej części zasięgu tego taksonu.

Metabolizm (SMR) diploidalnych kijanek o mniejszych komórkach był wyższy niż u kijanek triploidalnych. Zaskakujące, różnice te u żabek zniknęły. Doktorant tłumaczy to większym wpływem wielkości komórek na SMR w wodzie niż na lądzie, poprzez mniejszą dostępność tlenu w wodzie. Metabolizm triploidów może być limitowany małą powierzchnią komórek w stosunku do objętości. Zapotrzebowanie na tlen wzrasta z temperaturą, jego dostępność w wodzie jednak równocześnie spada.

W niskie temperaturze, kijanki diploidalne i triploidalne rozwijały się dłużej i były większe, zapewne dzięki większym komórkom. Zależności tej, mogącej wyjaśniać związek rozmiarów ciała z temperaturą (TSR) nie obserwowano dotąd u płazów.

Ciekawostką jest pojawienie się pentaploidalnego osobnika wśród potomstwa krzyżówki diploidalnej samicy *P. esculentus* (LR) z diploidalnym samcem *P. lessonae* (LL). Jest to pierwszy opisany przypadek. Jego dokładnej charakterystyki genetycznej i cytologicznej - z zastosowaniem m.in. pomiarów wielkości erytrocytów, zawartości DNA w jądrach, preparaty chromosomowe z barwieniem metodą AMP/DAPI czy mikrosatelitów - poświęcona jest praca

stanowiąca rozdz. II. Pentaploid ten, o genomie LLLRR, na co wskazują diagnostyczne chromosomy i mikrosatelity powstał z tetraploidalnego jaja LLRR i haploidalnego plemnika L. Jego erytrocyty miały zróżnicowaną wielkość i kształt. Niewiele było elipsoidalnych, te rozmiarami nieznacznie przewyższały rozmiary erytrocytów triploidalnych. Wiele było łzokształtnych, a część nie miała jąder komórkowych. Zapewne spowodowane było to utratą części cytoplazmy wskutek niedopasowania rozmiarów erytrocytów do światła drobnych naczyń krwionośnych.

Powstanie tetraploidalnej komórki jajowej u diploidalnej samicy, jest przykładem zaburzenia procesu gametogenezy obserwowanego często u mieszańców wywołanego niezgodnością genomów. Uważano dotąd, że diploidane samice RR systemu E-E, wytwarzają głównie jaja typu R lub LR. Jaka jest żywotność pentaploidalnych osobników i czy występują one w naturze nie wiadomo. Z ilustracji zamieszczonej na str. 28 możnaby wnioskować, że zaburzenia oogenezy mają genezę w użytkach. Zaburzenia gametogenezy mogą stanowić bogate źródło zmienności i nowości ewolucyjnych.

Praca doktorska mgra Hermaniuka liczy 60 numerowanych stron, plus oświadczenia pięciorga współautorów o ich udziale w trzech opublikowanych pracach, które składają się na rozprawę.

Angielskojęzyczna dysertacja poprzedzona jest polskim i angielskim streszczeniem całej zawartości. Trzon pracy to opublikowane ostatnio prace, stanowiące kolejne rozdziały. I tak:

Rozdz. I. Low temperature and polyploidy result in larger cell and body size in an ectothermic vertebrate,

Rozdz. II. Genetic and cytogenetic characteristics of pentaploidy in water frogs,

Rozdz. III. Metabolic rate of diploid and triploid edible frog, *Pelophylax esculentus*, correlates inversely with cell size in tadpoles but not in frogs.

Rozdziały te poprzedza Wstęp przedstawiający problematykę, zamysł pracy i testowane hipotezy, natomiast Dyskusja ogólna, umieszczona po nich, łączy wyniki cząstkowe w jedną całość.

Taka forma pracy doktorskiej ma bardzo dobre strony: dla doktoranta, promotora jak i recenzenta. Doktoranta uczy nie tylko jak przygotowywać prace do druku, ale także jak prowadzić korespondencję z redakcją, odpowiadać na krytykę recenzentów, przygotowywać rewizje etc. Ukazanie się pracy w wersji on-line, jest rzeczywistym zakończeniem etapu badań, tak dla doktoranta, jak i promotora. Recenzent z kolei ma ułatwione zadanie, gdyż publikacje zostały gruntownie sprawdzone przez kompetentnych specjalistów, co w pracach o szerokiej tematyce, stosujących rozmaite metodologie, techniki i metody analityczne jest dla jednej osoby trudne do ogarnięcia. Zaopatrzenie dysertacji we Wstęp i Ogólną Dyskusję skłania doktoranta do refleksji nad całością, zarówno osiągnięciami, niezrealizowanymi zamierzeniami jak i implikacjami nowych odkryć czy potwierdzonych prawidłowości. Z tych zadań mgr A. Hermaniuk wywiązał się znakomicie.

Praca napisana jest przejrzysto, bardzo dobrą angielszczyzną, dzięki czemu łatwo się ją czyta. Każda z prac cząstkowych zawiera szeroką bibliografię najnowszych prac i może służyć jako wprowadzenie w tematykę dla początkujących badaczy.

Doktorant, p. Adam Hermaniuk, wykazał się szeregiem umiejętności koniecznych do efektywnej pracy najpierw w terenie, potem w laboratorium, hodowli kijanek, przeprowadzając rozmaite pomiary, czy opanowania nowych sposobów analizy i opracowania danych testujących alternatywne modele powstawania zróżnicowania na różnych poziomach organizacji biologicznej, czy wreszcie napisania trzech związanych angielskojęzycznych prac, rozpatrujących badane zagadnienia i nowe obserwacje w szerokim kontekście czynników

bliższych i dalszych. Nie jest to możliwe bez rozległej wiedzy i znajomości najnowszej literatury z kilku dziedzin biologii.

Podkreślić trzeba, że udział licznych współpracowników z innych uczelni był nie tylko niezbędny do wykonania badań, ale był dodatkową szkołą pracy zespołowej, bez której trudno sobie wyobrazić współczesną naukę wysokiego lotu. Oświadczenia współautorów nie budzą wątpliwości o dominującym udziale doktoranta w badaniach, jak i na wszystkich etapach powstawania trzech opublikowanych prac.

Wstępy i dyskusje, w rozprawie i trzech pracach cząstkowych, pokazują opanowanie przez doktoranta podstaw teoretycznych i swobodę poruszania się w różnych dziedzinach biologii, a także znajomość współczesnego stanu wiedzy i kierunków badawczych. Jest młodym, dojrzałym badaczem, który przeszedł wszystkie etapy procesu naukowego: od planowania badań, zbierania wyników i ich opracowywania, rozważania na tle dostępnej literatury, po publikację wyników swoich badań w czasopismach o światowym zasięgu.

Rozprawę czytałem z ogromnym zainteresowaniem i podziwem dla uzyskanych wyników i ich wszechstronnego wyjaśniania. Dodam, że jako doktorant, uczestniczyłem w odkrywaniu genetycznej tożsamości *Rana esculenta* (dziś *Pelophylax esculentus*) w pracowni Leszka Bergera. Jak większość płazów, żaby te trudno hodować, kijanki są delikatne, łatwo je uszkodzić. Doceniam wysiłek mgra Hermaniuka włożony w badania organizmów kryjących w sobie, jak pokazał, wiele zagadek.

Wniosek końcowy: praca p. mgr. Adama Hermaniuka spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o jej przyjęcie i dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu.

Biorąc pod uwagę jej nowatorstwo i wyjątkowe walory wnoszę o jej wyróżnienie.

Jacek M. Szymura

prof. dr hab. Jacek M. Szymura
członek PAU
Zakład Anatomii Porównawczej UJ

Kraków, 14 marca 2017 r.