

Prof. dr hab. Marek Konarzewski  
Instytut Biologii  
Uniwersytet w Białymstoku  
15-950 Białystok  
ul. Świerkowa 20B

#### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Szymona Drobniaaka pt. „Genetic correlations and evolutionary potential of quantitative traits in the blue tit (*Cyanistes caeruleus*)”

#### 1. Ocena naukowego znaczenia tematyka rozprawy

Od czasów pionierskich analiz Ronalda Fishera, poznanie przyczyn utrzymywania się zmienności genetycznej pozostaje jednym z najważniejszych, wciąż nie w pełni rozwiązanych problemów biologii ewolucyjnej. Można zapewne uznać, że brak jednoznacznego rozstrzygnięcia licznych kontrowersji, w które obrośła dyskusja o zmienności genetycznej ujawnia metodologiczną słabość dociekań poświęconych działaniu doboru naturalnego. Z drugiej jednak strony, mające już ponad osiemdziesięcioletnią tradycję teoretyczne i eksperymentalne badania nad genetyką ilościową populacji niewątpliwie przyczyniły się do znaczącego postępu w zrozumieniu procesów kształtujących frekwencje alleli. Od czasów Fishera kolejne pokolenia badaczy próbują wyjaśnić przyczyny, dla których główne przewidywanie modeli teoretycznych, wskazujące na spadek zmienności genetycznej w następstwie działania doboru naturalnego, często nie znajduje potwierdzenia empirycznego. Dziś większość badaczy porzuciła już nadzieję na zidentyfikowanie pojedynczego mechanizmu wyjaśniającego tę rozbieżność, i pogodziła się z koniecznością przyjęcia bardziej pluralistycznego, a przez to trudniejszego podejścia, wymagającego jednoczesnej analizy wielu czynników.

W ten żywy i aktualny kierunek badań wpisuje się z powodzeniem recenzowana rozprawa doktorska pana magistra Szymona Drobniaaka. Już na wstępie mogę stwierdzić, że jej autorowi nie udało się wspomnianej rozbieżności w pełni wyjaśnić. Nie stawiał on sobie z resztą aż tak nadmierne ambicznego celu, wychodząc ze słusznego założenia, że efektywniejszą metodą poznawczą będzie zawężenie tematu rozprawy do jednego z postulowanych mechanizmów utrzymywania zmienności genetycznej. Wybór doktoranta padł na intensywnie ostateńto dyskutowane konsekwencje występowania interakcji między

genotypem a środowiskiem. Jest on w mojej ocenie ze wszech miar uzasadniony: pozwala na zastosowanie nowoczesnych i różnorodnych narzędzi badawczych, a nade wszystko plasuje tematykę rozprawy w ważnym nurcie współczesnych badań genetyki ewolucyjnej.

## 2. Ocena doboru celów pracy i metodyki badawczej

Formułowanie nawet najciekawszych i najbardziej złożonych zadań badawczych nie przynosi rezultatów bez zbudowania precyzyjnych hipotez cząstkowych oraz dobrania efektywnych metod ich testowania. Tu również, zanim rozwinę je szczegółowo, z przyjemnością sformułuję kilka ogólnych uwag na temat warstwy merytorycznej i warsztatowej recenzowanej rozprawy.

Badania nad interakcjami genotyp-środowisko ożywiły się głównie w następstwie intensywnego rozwoju technik genetyki molekularnej, pozwalających na szczegółową analizę zmienności genetycznej w populacjach naturalnych. Istotny postęp dokonał się także w rozwoju technik analizy statystycznej, które umożliwiają obecnie efektywne łączenie danych o zmienności fenotypowej i pokrewieństwie określonym u organizmów wolno żyjących, a zatem w środowisku, w którym realnie działa dobór naturalny. W rezultacie ugruntował się fascynujący obszar biologii, obejmujący swym zakresem genetykę cech ilościowych, genetykę molekularną i populacyjną oraz klasyczną ekologię i fizjologię. Jest to wszakże obszar dociekań dostępny jedynie dla badaczy swobodnie poruszających się zarówno w pracy terenowej jak i laboratoryjnej, mających przy tym uzdolnienia matematyczne i eksperymentatorskie zacięcie. Lektura recenzowanej rozprawy przekonała mnie, że do grona takich badaczy z pewnością można zaliczyć jej autora, który wykazał się biegłością zarówno pod względem zastosowania zaawansowanej teoretycznej analizy omawianych w rozprawie zagadnień, jak i zaplanowania oraz przeprowadzeniu eksperymentów w warunkach naturalnych.

Trzy spośród czterech rozdziałów rozprawy przedstawiają analizę danych zebranych w następstwie prostego, klasycznego zabiegu polegającego na przekładaniu piskląt między obserwowanymi legami. Tego typu manipulacja pozwala na skuteczne oddzielenie efektów genetycznych od efektów środowiskowych, wszakże pod warunkiem zastosowania złożonych pod względem koncepcyjnym, statystycznych mieszanych modeli liniowych. Za obiekt swoich doświadczeń doktorant obrał sikorę modrą (modraszkę), zaś za miejsce badań- poligon doświadczalny jakim stały się lasy porastające Góllandię, gdzie od już od ponad 20 lat prowadzone są zakrojone na szeroką skalę unikalne eksperymenty ewolucyjno-ekologiczne. Połączenie dobrych pomysłów z umiejętnością ich realizacji pozwoliły

doktorantowi na zebranie bardzo ciekawych wyników, stanowiących *gras* materiału ocenianej rozprawy. Czwarty z jej rozdziałów przedstawia wartościową analizę danych literaturowych, stanowiącą podstawę do testowania istotnej hipotezy o braku związku między siłą korelacji genetycznych i wielkością wariacji genetycznej cech, między którymi taka korelacja zachodzi. Reasumując, wysoko oceniam wartość merytoryczną zasadniczych celów rozprawy oraz opanowanie warsztatu naukowego, bez którego ich realizacja nie byłaby możliwa.

### 3. Szczegółowa analiza osiągniętych rezultatów i poprawności wnioskowania

Pierwszy rozdział rozprawy przynosi analizę wpływu warunków środowiskowych na odziedziczalność komórkowej odpowiedzi immunologicznej u piskląt modraszki. Autor wykazał w nim istnienie istotnego statystycznie komponentu genetycznego związanego z odpowiedzią immunologiczną oraz interakcji zachodzących między tym komponentem, a warunkami środowiskowymi, manipulowanymi poprzez zmianę wielkości legu. Ponadto efekty te były różne u różnych płci.

Uzyskane wyniki należy uznać za ważne z co najmniej dwóch powodów. Po pierwsze, z pewnymi zastrzeżeniami, o których poniżej, są one argumentem wskazującym na istnienie wariacji genetycznej związanej z komórkową odpowiedzią immunologiczną, co skazuje, iż może ona podlegać doborowi naturalnemu. Po drugie, uzyskane wyniki ilustrują zróżnicowanie wariacji genetycznej związane z płcią. Ich doniosłość została już doceniona przez innych recenzentów, co pozwoliło doktorantowi na ogłoszenie ich w 2010 r. w *Journal of Evolutionary Biology*. Jednakże w tym miejscu, bynajmniej nie kierując się zazdrością, chciałbym zwrócić uwagę na dwa aspekty omawianej części rozprawy, które budzą mój niedosyt.

Przeprowadzone badania oparte zostały na szeregu założeń, w tym tych, dotyczących pełnej znajomości pokrewieństwa analizowanych osobników. Doktorant przyjął w nich, że pisklęta pochodzące z tego samego gniazda są pełnym rodzeństwem, co, ze względu na dosyć częste występowanie u modraszek kojarzeń pozapartnerskich nie jest do końca spełnione. Zgadnam się, że w kontekście przeprowadzonej analizy nie jest to znaczące uchybienie, o czym wspomina tekst na stronie 23 rozprawy. Rzeczywiście, brak pełnej znajomości relacji krewniaczych nie miał zapewne wpływu na ocenę interakcji genetycznych, będących zasadniczym obiektem analizy. Warto jednak zauważyć, że niepełna znajomość stopnia pokrewieństwa badanych piskląt oraz zbyt mała liczebność próby uniemożliwiła doktorantowi przeprowadzenie bardziej szczegółowej analizy wariacji genetycznej, pozwalającej nie tylko

na ocenę odziedziczalności w szerokim sensie, ale również składających się na nią komponentów, w tym addytywnego komponentu wariacji, efektu dominacji i efektu matczynego. Jest to o tyle istotne, że parametrem informującym o potencjalnym wpływie selekcji na badaną cechę jest nie tyle odziedziczalność w szerokim sensie, co odziedziczalność w wąskim sensie, która odnosi się do addytywnej składowej wariacji genetycznej. Zatem zawarte w rozprawie konkluzje odnoszące się do ewolucyjnego potencjału analizowanych cech nie są w pełni uprawnione, gdyż nie wyróżniają części wariacji mogącej mieć wpływ na wnioskowanie. Trudno mi się w tej mierze zgodzić z doktorantem, który na stronie 31 rozprawy przywołuje dwie publikacje wskazujące na nieistotność efektu matczynego. Istnieje przecież bogata literatura dokumentująca jego potencjalne znaczenie i powinna ona, moim zdaniem, zostać w rozprawie rzetelnie przedyskutowana. Za dobry punkt wyjścia do takiej dyskusji może posłużyć najświeższa praca opublikowana *Oecologii* przez członków grupy badawczej promotora recenzowanej rozprawy doktorskiej, prof. Mariusza Cichonia (Rutkowska et al. *Oecologia* (2012) 168:355–359).

Powyższa uwaga skłania mnie również do sformułowania kolejnej: wielka szkoda, że przy zbieraniu materiału w terenie nie zgenotypowano wszystkich objętych badaniami osobników. Pozwoliłoby to na odtworzenie relacji krewniaczych i znacznie precyzyjniejszą analizę wariacji genetycznej, w tym wyodrębnienie efektów dominacji i efektu matczynego. Nawet przy stosunkowo niewielkiej liczności osobników stałoby się to zapewne możliwe, przy wykorzystaniu najnowszych algorytmów dostępnych w programach Cervus i ASReml. Mam nadzieję, że przeprowadzenie takich analiz jest wciąż możliwe i stanie się tematem kolejnych publikacji doktoranta.

W rozprawie zabrakło mi także nieco krytyczniejszego podejścia do zastosowania reakcji na podanie fitohemoaglutyniny (PHA) jako indeksu odpowiedzi komórkowej. W istocie odpowiedź immunologiczna na PHA i jej interpretacja jest znacznie bardziej złożona, niż przedstawia to doktorant. Składają się na nią zarówno mechanizmy odpowiedzi swoistej, jak i nieswoistej (Kennedy and Nager, 2006 *Trends Ecol. Evol.* 21, 653–655. ; Martin et al., 2006 *Funct. Ecol.* 20, 290–299.). Ze względu na zasadniczą odmienną oba rodzajów reakcji immunologicznej można się spodziewać, że ich proporcjonalny udział w kształtowaniu odpowiedzi na miogen typu PHA będzie się zmieniał w zależności od warunków środowiskowych, co w trudnym do określenia stopniu może wpływać na interpretację uzyskanych wyników.

Powyżej sformułowane uwagi odnoszą się zarówno do rozdziału pierwszego, jak i pokrewnego mu pod względem zaplanowania eksperymentu, rozdziału trzeciego, któremu warto również poświęcić kilka zdań omówienia. Przedstawia on bardzo ciekawe wyniki wskazujące na spadek wariacji genetycznej związanej z odpowiadzią immunologiczną u potomstwa starszych wiekiem sikor modrych. Doktorant wyjaśnia tę obserwację odwołując się do działania selekcji naturalnej, która najprawdopodobniej powoduje obniżenie wariacji genetycznej w kolejnych klasach wiekowych ptaków dorosłych. Wniosek ten wydaje mi się uzasadniony, aczkolwiek sformułowany jedynie na podstawie pośrednich przesłanek. Autor nie badał różnicowania genetycznego rodziców, a jedynie ich potomstwa. Ponadto wnioskowanie oparto na zgrubnym oszacowaniu wieku ptaków dorosłych, które zaszeregowano do dwóch kategorii wiekowych (samice roczne i starsze). Nie został więc uwzględniony potencjalny wpływ struktury wiekowej populacji dorosłych. Ów wpływ mógł być jednak do pewnego stopnia złagodzony poprzez oryginalne zaplanowanie eksperymentu, który składał się z bloków stworzonych z lęgów samic młodych i starych.

Na tle pozostałych części rozprawy, rozdział II wydaje mi się prezentować najmniej przekonujące wyniki. Zostały w nim przedstawiona analiza odziedziczalności kolorowych ornamentów upierzenia piskląt oraz siły korelacji genetycznej zachodzącej między wybarwieniem samic i samców. Uzyskane rezultaty wskazują na istnienie jedynie słabego związku między ubarwieniem obu płci. Budowanie wnioskowania na takim 'negatywnym' wyniku jest moim zdaniem o tyle ryzykowne, że ze względu na metodologicznych nie da się wykluczyć szeregu przyczyn metodologicznych (np., zbyt małej wielkości próby itp.), które w innych okolicznościach dałyby wartości istotne statystycznie. Co prawda, doktorant podpięra swój wywód wykazaniem istotnej korelacji genetycznej między długością skoku samców i samic w tej samej próbie ptaków. Jednakże ze względu na zasadniczą odmienną funkcjonalną koloru upierzenia i cech anatomicznych ich bezpośrednio zestawianie wydaje mi się przysłowiowym porównywaniem 'jabłek i pomarańczy'. Równie dyskusyjne jest założenie o istnieniu korelacji między ubarwieniem juvenilnym i ubarwieniem osiąganym po przystąpieniu do rozrodu. Dlatego też, doceniając przedstawioną w rozprawie, inteligentnie napisaną dyskusję powyższego zagadnienia, muszę przyznać, że nie zostałem nią w pełni przekonany.

Z drobniejszych wartych wytknięcia uchybień warto odnotować brak pełnej informacji o konstrukcji eksperymentu, który posłużył do zebrania danych przedstawionych w rozdziale II. Z jego opisu wywnioskowałem, że był to w istocie ten sam eksperyment, który został przedstawiony w rozdziale I, opierający się na manipulacji wielkością lęgu.

Manipulacja ta nie została wykorzystana w analizach prezentowanych w omawianym rozdziale, choć, jak rozumiem, jej efekt uwzględniono w modelach statystycznych.

O ile z ostrożnością traktuję omówiony wyżej brak korelacji między ubarwieniem juvenilnych samców i samicy sikory modrej, to nie mam podobnych wątpliwości w odniesieniu do zaprezentowanego, w zamykającym rozprawę rozdziale IV wniosku o nikłym związku odziedziczalności cech ilościowych i zachodzących między tymi cechami korelacji genetycznych. Wniosek ten jest nie intuicyjny, a przy tym trudny do pogodzenia z teoretycznymi przewidywaniami teorii genetyki ilościowej. Przyznając, że choć nie mam wątpliwości co do solidności i poprawności przedstawionej w rozdziale IV meta-analizy, to nie jestem w stanie do końca zinterpretować jej wyniku. Również lektura dyskusji rozdziału nie ułatwiła mi tego zadania. W rezultacie przychylny, dla których związek między korelacjami genetycznymi i odziedziczalnością jest luźniejszy niż można by oczekiwać pozostają nadal niejasne.

#### Forma prezentacji rozprawy

Pod względem redakcyjnym i estetycznym rozprawa przygotowana jest niemal wzorowo. Godne zauważenia jest znakomite opracowanie graficzne tabel i wykresów oraz miłe dla oka grafiki przedstawiające obiekty badań - modraszki. Rozdziały składające się na rozprawę są w istocie maszynopisami anglojęzycznych artykułów naukowych, z których pierwszy został już opublikowany. Dysertację zamyka krótka, ogólna dyskusja- najdłuższy fragment tekstu pisany w pierwszej osobie liczby pojedynczej. Wcześniejsze rozdziały pisane są w pierwszej osobie liczby mnogiej, co odzwierciedla ich wileoautorstwo. Każdy z nich opatrzony jest notką objaśniającą wkład merytoryczny doktoranta, w każdym z nich figuruje on również jako pierwszy autor. Z przyjemnością zatem stwierdzam, że mamy do czynienia z rzeczywistym odzwierciedleniem relacji autorskich, wciąż jakże często maskowanych w rozprawach doktorskich powstających na rodzimych uczelniach. Pod tym względem, ale również pod względem formy dysertacja nie różni się od tekstów prac doktorskich przygotowywanych w renomowanych zachodnich instytucjach badawczych. Mogę mieć tylko nadzieję, że taka forma prezentacji wyników rozprawy doktorskiej wreszcie się w Polsce upowszechni, ułatwiając zadanie recenzentom i oszczędzając doktorantom niepotrzebnej pracy.

#### Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską mgr Szymona Drobnika oceniam bardzo wysoko. Na tle często mało ambitnych i ubogich warsztatowo rodzinnych badań z zakresu ekologii wybitnie wyróżnia się ona wartością naukową podjętej tematyki, znakomicie zaprojektowanym i konsekwentnie wcielonym w życie schematem badań i wreszcie nadzwyczaj ciekawymi, choć nie zawsze łatwymi do zinterpretowania wynikami. Jest to oryginalne dzieło w zupełności spełniające warunki wymagane do uzyskania stopnia doktora. Mam nadzieję, że moje uwagi krytyczne staną się przyczynkiem do polemiki naukowej z Autorem, pojawiającej się tam, gdzie mamy do czynienia z badaniami w istotny sposób zwiększającymi stan wiedzy i zmuszającymi do myślenia. Z całym przekonaniem wnoszę o dopuszczenie mgr Szymona Drobnika do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką wartość naukową znaczących elementów rozprawy wnoszę o wyróżnienie jej autora stosowną nagrodą.



Waszyngton, 22.06.2012

Prof. dr hab. Marek Komarowski