



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## ROZPRAWA DOKTORSKA

**ZRÓŻNICOWANIE WSKAŹNIKA PALCOWEGO (ANG. *DIGIT RATIO*) U  
KRĘGOWCÓW I JEGO MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA W BIOINDYKACJI**

mgr inż. Mikołaj Kaczmarek

Dziedzina: nauki ścisłe i przyrodnicze

Dyscyplina: nauki biologiczne

Promotor: Prof. dr hab. Piotr Tryjanowski

UNIwersytet PRZYRODniczy w POZnanIU

WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ I NAUK O ZWIERZĘTACH

KATEDRA ZOOLOGII

Poznań, 2021

## II. STRESZCZENIE

Wskaźnik palcowy (z ang. *digit ratio*) to stosunek długości palca drugiego do czwartego (2D:4D) w kończynach kręgowców, który wyraża różnice międzypłciowe. Cecha ta związana jest z równowagą pomiędzy hormonami płciowymi (testosteronem i estrogenem) a rozwojem zarodka w okresie prenatalnym. Hormony płciowe wpływają na wykształcenie się dymorfizmu płciowego w szerokim ujęciu, od różnic fizycznych po behawioralne. Generalnie u samic wskaźnik palcowy 2D:4D jest większy niż u samców, tzw. wzór *female-biased*. W głównym nurcie badań dotyczących wskaźnika palcowego znajduje się człowiek współczesny *Homo sapiens*, jednak dla lepszego zrozumienia podłoża biologicznego procesu, w ostatnich 15 latach podjęto także badania na innych kręgowcach. Obecnie nadal dominuje przekonanie, że wskaźnik palcowy jest dobrze zachowany u wszystkich zwierząt czworonożnych, jednak w przypadku części badań pojawiają się problemy z interpretacją uzyskanych wyników. Dodatkowo w przypadku takich grup systematycznych jak np. płazy ogoniaste Caudata i bezogonowe Anura, brak jest jakichkolwiek badań nad wskaźnikiem palcowym lub uzyskane wyniki są ze sobą sprzeczne oraz obarczone błędami metodycznymi. Dlatego dla lepszego zrozumienia uzyskanych do tej pory wyników konieczne jest rozstrzygnięcie kwestii podstawowych, takich jak właściwa numeracja palców oraz wypełnienie luk w rozpoznaniu wzorca wskaźnika palcowego u płazów i gadów. Ważnym wydaje się także pytanie czy czynniki środowiskowe wpływają na formowanie wskaźnika palcowego nawet w obrębie różnych populacji lub grup wiekowych tego samego gatunku. Wykrycie związku pomiędzy czynnikami środowiskowymi a wskaźnikiem palcowym pozwoli lepiej zrozumieć procesy kształtujące jego zmienność,

a biorąc pod uwagę związek tej cechy z równowagą hormonalną podczas rozwoju, wskaźnik palcowy ma duży potencjał w badaniach bioindykacyjnych. Dodatkowo konieczne jest również opracowanie powtarzalnej metody mierzenia palców u relatywnie małych kręgowców jakimi jest większość płazów i część gadów.

W pierwszym rozdziale rozprawy doktorskiej opracowaliśmy uniwersalną i powtarzalną metodę służącą do wykonania pomiarów wskaźnika palcowego u niewielkich kręgowców, co stanowiło problem, na który uwagę zwracali wcześniejsi badacze. Dla każdej kończyny danego osobnika sporządzono dokumentację fotograficzną w warunkach, w których odległość fotografowanego obiektu (danej kończyny) względem obiektywu była stała, dzięki czemu możliwe było wykorzystanie oprogramowania do analizy jego wielkości i kształtu. Następnie nanoszono charakterystyczne punkty (z ang. *landmarks*), dwa u nasady oraz jeden na czubku danego palca. Zastosowane podejście pozwoliło na bardzo precyzyjny pomiar długości, pomimo że u badanych gatunków niewidoczna była bruzda/fałda (z ang. *basal crease*) odpowiadająca początkowi danego palca. Ponadto dla losowo wybranych osobników kontrolowaliśmy błąd pomiaru zarówno pomiędzy dwoma badaczami, jak i w obrębie tego samego badacza.

W ramach przeprowadzonych badań u trzech z czterech gatunków krajowych traszek (dawny rodzaj *Triturus*), wykazaliśmy występowanie wzoru wskaźnika palcowego charakterystycznego dla ssaków, tj. wzór *female-biased*, czyli samice mają większy wskaźnik 2D:4D niż samce, co jest zaskakującym wynikiem. Nasze badania jako pierwsze testowały wskaźnik palcowy u płazów ogoniastych, a uzyskane wyniki rzuciły zupełnie nowe światło na wskaźnik palcowy w tej gromadzie, jak i w obrębie zwierząt czworonożnych.

W drugim rozdziale rozprawy doktorskiej na podstawie aktualnego stanu wiedzy o wskaźniku palcowym u płazów bezogonowych Anura, zdecydowaliśmy się na krytyczne omówienie przyjętych we wcześniejszych pracach schematów numeracji palców kończyn przednich oraz zaproponowaliśmy poprawny schemat oparty na obecnym stanie wiedzy o biologii rozwoju kończyn. W tej grupie płazów w kończynach przednich występują jedynie 4 palce. Wcześniejsi autorzy przyjęli, że są to palce od I do IV, ale w naszej pracy przedstawiamy dowody na to, że w toku ewolucji to palec I został zredukowany przez co w kończynach przednich znajdują się palce od II do V. Jednak homologia palców u poszczególnych grup zwierząt czworonożnych nie jest do końca jasna, jednocześnie jednak stanowi kluczowe zagadnienie, szczególnie gdy interpretujemy uzyskane wzorce wskaźnika palcowego w kontekście zarówno ewolucyjnym, jak i rozwojowym.

Do sprawdzenia wzoru wskaźnika palcowego u przedstawiciela tego rzędu płazów wybraliśmy ropuchę szarą *Bufo bufo*, używając metodyki opisanej w pierwszym rozdziale rozprawy doktorskiej. W użytych analizach wykorzystaliśmy oba schematy numeracji palców, w celu porównania wyników z tymi uzyskanym dla płazów bezogonowych, jak i z pozostałymi kręgowcami. Poza wskaźnikiem 2D:4D, użyliśmy także innych wskaźników pojawiających się w literaturze, tj. 2D:3D i 3D:4D (odpowiednio palec drugi do trzeciego i palec trzeci do czwartego). Stwierdziliśmy, że wskaźnik palcowy w kończynach tylnych różni się istotnie między płciami tylko w przypadku 2D:3D dla lewej strony ciała (niższa wartość u samic, wzór *male-biased*) i 3D:4D (także dla lewej strony ciała, jednak niższa wartość wskaźnika u samców, wzór *female-biased*). Wykryliśmy, że w przypadku kończyn przednich jedynie wartość wskaźnika: 2D:3D dla lewej strony ciała była niższa u samic (wzór *male-*

*biased*), natomiast 2D:4D dla prawej strony była niższa u samców, oraz 3D:4D dla obu kończyn była niższa u samców (wzór *female-biased*). Uzyskane w tej części badań wyniki zostały szeroko omówione w dyskusji.

Dodatkowo celem prowadzonych badań było sprawdzenie występowania potencjalnej zależności pomiędzy wiekiem badanych osobników a obserwowaną zmiennością we wskaźniku palcowym. W podzbiorze danych, w których znany był wiek każdego osobnika, oznaczony metodą skeletochronologiczną, modele wskazywały, że czynnik ten w sposób istotny był związany ze współczynnikiem 2D:4D i 3D:4D w lewych kończynach tylnych, podczas gdy zarówno wiek, wielkość ciała i płeć wpływały na wskaźnik 2D:4D w prawej kończynie przedniej.

Wykryte zależności między wskaźnikiem palcowym a wiekiem u płazów poszerzają naszą wiedzę, wskazując, że wiek osobników powinien być kontrolowany w kolejnych badaniach nad tym zagadnieniem. Naszym zdaniem wykryta zależność ma związek ze zmieniającym się między sezonami poziomem stresu środowiskowego i dużą wrażliwością rozwijających się w wodzie kijanek, co ostatecznie wpływa na fenotyp osobników po metamorfozie (w tym wskaźnik palcowy) w danej grupie wiekowej. Co więcej, uzyskany wynik może okazać się kluczowy w kontekście postulowanych przez różnych autorów dalszych kierunków rozwoju badań wykorzystujących wskaźnik palcowy jako nieinwazyjny indikator zaburzeń endokrynologicznych u płazów, zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w warunkach naturalnych.

W trzecim rozdziale postanowiliśmy określić związek współczynnika palcowego u wybranego przedstawiciela gadów, tj. jaszczurki zwinki *Lacerta agilis* z wybraną cechą behawioralną, w tym przypadku skłonnością do autotomii (odrzućenia ogona jako reakcja obronna przeciw drapieżnikom). Podjęte zagadnienie jest ważne i naszym

zdaniem może posłużyć do wyjaśnienia dużej różnorodności uzyskanych do tej pory wyników badań opisujących współczynnik palcowy u jaszczurek. W naszych badaniach wykazaliśmy, że występują istotne statystycznie różnice pomiędzy płciami w przypadku wszystkich analizowanych wskaźników palcowych (2D:4D, 2D:3D, 3D:4D) zarówno w kończynach przednich, jak i tylnych, z wyjątkiem wskaźnika 3D:4D dla prawej tylnej kończyny. Tym samym zgodnie z założeniami wykazaliśmy, że u jaszczurki zwinki samce charakteryzują się większą wartością wskaźników palcowych niż samice, (wzór *male-biased*) co jest zgodne z opisanym w literaturze wzorem wskaźnika palcowego charakterystycznym dla większości jaszczurek. Nowatorskim elementem naszego badania jest wykrycie związku między autotomią ogonową a wskaźnikiem palcowym. Osobniki po autotomii charakteryzują się wyższą wartością wskaźnika 2D:4D w prawej przedniej kończynie i niższą wartością wskaźnika 2D:3D w prawej kończynie tylnej niż osobniki, które nigdy nie utraciły ogona.

Jakkolwiek trudno w sposób jasny wyjaśnić wykryte różnice w poszczególnych wskaźnikach palcowych pomiędzy osobnikami po przebytej autotomii i tymi, które zachowały ogon w stanie pierwotnym, to naszym zdaniem uzyskany wynik może mieć związek z osobowością poszczególnych osobników, co związane jest z działaniem testosteronu. Wiele badań wskazuje, że cechy behawioralne mogą wpływać na ekspozycję danego osobnika na ataki drapieżnika, a co za tym idzie, konieczność stosowania adekwatnych strategii obronnych przeciw drapieżnikom. Co więcej, liczne badania korelacyjne na różnych gatunkach kręgowców opisały związek pomiędzy wskaźnikiem palcowym a cechami takimi jak: skłonność do podejmowania ryzykownych zachowań, czas reakcji na wykryte zagrożenie, maksymalna prędkość podczas ucieczki, czy agresja w obrębie różnych odmian barwnych związana z poziomem

testosteronu we krwi. Optymalizacja zachowań obronnych pozwala osiągnąć większy sukces rozrodczy, a cecha ta – będąc powiązaną ze wskaźnikiem palcowym – ma szansę utrwalić się w populacji. Nasze wyniki są prawdopodobnie pierwszą udaną próbą powiązania współczynnika palcowego z podatnością jaszczurek na autotomię ogona. Co więcej, proponujemy wykorzystanie informacji o przebytej autotomii jako czynnika wyjaśniającego obserwowane wzorce wskaźnika palcowego u poszczególnych gatunków jaszczurek, u których ta cecha występuje.

Otrzymane wyniki dostarczają nowych danych na temat wybranych współczynników palcowych u czterech gatunków traszek (2D:4D), ropuchy szarej (2D:3D, 2D:4D, 3D:4D) i jaszczurki zwinki (2D:3D, 2D:4D, 3D:4D) oraz przybliżają nas do lepszego zrozumienia obserwowanej zmienności tej cechy, uznawanej za biomarker, w szerszym kontekście, tj. wśród zwierząt czworonożnych. Tym samym postawione cele zostały w pełni zrealizowane. W poszukiwaniu ewolucyjnego wytłumaczenia kształtowania się wskaźnika palcowego zasadnym wydaje się podjęcie dalszych badań na współczesnych płazach należących zarówno do rzędów płazów bezogonowych Anura, jak i ogoniastych Caudata.



### III. SUMMARY

The digit ratio is defined as the proportion of the length of the second digit to fourth digit (2D:4D) in the limbs of vertebrates which expresses sex differences. This trait is related to the balance between sex hormones (testosterone and estrogen) and the development of the embryo during the prenatal period. Sex hormones modulate the development of sexual dimorphism in a broad sense, from physical to behavioral differences. Generally, females have a larger 2D:4D index than males, i.e. the female-biased pattern. Modern human, *Homo sapiens*, still is in the mainstream of research on the digit ratio. However, in the last 15 years, other vertebrates have also been studied to achieve a better understanding of the biological basis of the process. Currently, the dominant assumption is that the digit ratio is highly conserved in all tetrapods. However, in some studies, there are problems with the interpretation of the obtained results. Additionally, there are no studies on the digit ratio in Caudata or Anura or the obtained results are contradictory and, burdened with methodological errors. Therefore, for a better understanding of the results obtained so far, it is necessary to resolve basic issues such as correct digit numbering, as well as to fill the gaps in the identification of the digit ratio patterns in amphibians and reptiles. An important question also seems to be whether environmental factors influence the development of the digit ratio even within different populations or age groups of the same species. Detecting the relationship between environmental factors and the digit ratio will allow us to better understand the processes shaping its variability. The relationship of the digit ratio and the hormonal balance during development has a great potential for implementation in bioindication research. In addition, it is necessary to develop a repeatable method of measuring digits in relatively small vertebrates, such as most amphibians and some reptiles.



In the first chapter of the doctoral dissertation, we developed a universal and reproducible method for measuring the length of the digits in small vertebrates, which was a problem highlighted by previous researchers. For each limb of a given individual, photographic documentation was made with the constant distance between the photographed object (a given limb) and the lens. This enabled to use the software for analyzing the size and shape of the digits. Then, the landmarks were applied, two at the base and one at the tip of the digits. The applied approach allowed a very precise measurement of the length, despite the fact that in the studied species, the basal crease corresponding to the beginning of a given finger was invisible. Moreover, for randomly selected individuals, we controlled the measurement error both between two investigators and within the same investigator.

As a part of the research carried out, in three out of four species of newts (former genus *Triturus*) we have demonstrated the presence of a digit ratio pattern characteristic for mammals (i.e. the female-biased pattern, in which females have a higher 2D:4D index than males), which is a surprising result. Our study was the first to test the digit ratio in tailed amphibians, and the obtained results shed completely new light on the digit ratio in this class, as well as in tetrapods in general.

In the second chapter of the doctoral dissertation, based on the current state of knowledge about the digit ratio in Anura, we decided to critically discuss the digit numbering schemes of the forelimbs adopted in previous articles and proposed a correct scheme based on the current state of knowledge about the developmental biology of the limb. In this group of amphibians, there are only four fingers in each of the forelimbs. Previous authors assumed that these are digits from I to IV; in our article, we present evidence that in the course of evolution it is the digit I that has been

reduced, which means that digits from II to V are present in the forelimbs. However, the homology of the digits in certain groups of tetrapods is still not clear. At the same time, it is a crucial issue, especially when we interpret the obtained patterns of the digit ratio in both evolutionary and developmental contexts.

To investigate the pattern of the digit ratio in a representative of this order of amphibians, we chose the common toad *Bufo bufo* as a study organism. We used the methodology described in the first chapter. In the models, we used both digit numbering schemes to compare the results with those obtained from other species of frogs and other vertebrates. Besides the 2D:4D index, we used other indices that appear in the literature, i.e. 2D:3D and 3D:4D (second to third digits and third to fourth digits, respectively). We found that the digit ratio in the hindlimbs differed significantly between the sexes only in the case of 2D:3D for the left side of the body (lower value in females, i.e. male-biased pattern) and 3D:4D (also for the left side of the body, but lower index value in males, i.e. female-biased pattern). We found that in the case of the forelimbs, only the 2D:3D for the left side of the body was lower in females (male-biased pattern), while 2D:4D for the right side was lower in males, and 3D:4D for both limbs was lower in males (female-biased pattern). The results obtained in this part of the research have been widely discussed.

An additional aim of the conducted research was to test whether there is a relationship between the age of the studied individuals and the observed variability in the digit ratio. In a subset of data in which the age of each individual was previously determined by skeletochronology, the models showed that this factor was significantly related to the 2D:4D and 3D:4D in the left hindlimbs, while age, body size and sex all affected the 2D:4D in the right forelimb. The detected relationships between the digit

ratio and the age of amphibians increase our knowledge and indicate that the age of individuals should be controlled for in subsequent studies on this topic. In our opinion, the detected relationship is related to the level of environmental stress which fluctuates between seasons, as well as to the high sensitivity of tadpoles during their development in water, which ultimately affects the phenotype of individuals after metamorphosis (including the digit ratio) in a given age group. Moreover, the obtained result may turn out to be crucial in the context of further directions of research development postulated by various authors using the digit ratio as a non-invasive indicator of endocrine disorders in amphibians, both in the laboratory and in natural conditions.

In the third chapter, we decided to determine the relationship between the digit ratio and a selected behavioral trait, in this case, a tendency to autotomy (shedding the tail as a behavior against predators), in a selected reptile species, the sand lizard *Lacerta agilis*. The issue raised is important and, in our opinion, can be used to explain the large diversity of research results obtained so far, describing the digit ratio in lizards. In our study, we have shown that there are statistically significant differences between the sexes for all of the digit ratios analyzed (2D:4D, 2D:3D, 3D:4D) in both the fore- and hindlimbs, except for the 3D:4D for the right hindlimb. Thus, in accordance with the assumptions, we have shown that in the sand lizard, males are characterized by a higher value of digit ratio than females (i.e. male-biased pattern) which is consistent with the digit ratio pattern characteristic for most lizards described in the literature. The novel element in our study is the detection of the relationship between a caudal autotomy and digit ratio. Individuals after autotomy have a higher 2D:4D ratio in the right forelimbs and a lower 2D:3D ratio in the right hindlimbs.

It is difficult to clearly explain the detected differences in digit ratio between individuals after autotomy and those who retained the intact tail. However, in our opinion, the obtained result may be related to the personality of individuals, which is modulated by the testosterone level. Many studies have shown that behavioral traits may affect the exposure of an individual to predator attacks, and thus the need to use adequate strategies against predators. Moreover, numerous correlation studies on various species of vertebrates have described the relationship between the digit ratio and traits such as a tendency to engage in risky behavior, reaction time to a detected threat, maximum escape speed, or aggression within various color morphs related to the level of testosterone in the blood. Optimizing defensive behaviors allows for greater reproductive success, and this feature, being associated with the digit ratio, has a chance to become preserved in the population. Our results are perhaps the first successful attempt to link the digit ratio to the susceptibility of lizards to tail autotomy. Moreover, we propose the use of information on past autotomy as a factor explaining the observed patterns of the digit ratio in certain species of lizards.

The obtained results provide new data on selected digit ratios in four species of newts (2D:4D), the common toad (2D:3D, 2D:4D, 3D:4D) and the sand lizard (2D:3D, 2D:4D, 3D:4D). They give us a better understanding of the observed variability of this feature (which is considered a biomarker) in a broader context, i.e. within tetrapods. Thus, the set goals were fully achieved. In the search for an evolutionary explanation of the developmental patterns of the digit ratios, it seems reasonable to undertake further research on modern representatives of both the Anura and the Caudata.