

Poznań dnia 21. 05. 2021 r.

Dr hab. Jakub Z. Kosicki, prof. UAM
Instytut Biologii Środowiska,
Wydziału Biologii,
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6,
61-614 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Mikołaja Kaczmarek zatytułowanej „Zróżnicowanie wskaźnika palcowego (ang. *digit ratio*) u kręgowców i jego możliwości zastosowania w bioindykacji”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójne tematycznie i koncepcyjnie przedsięwzięcie badawcze, w którym poprzez opracowanie standardowej metody morfometrycznej podjęto wielopłaszczyznową analizę wskaźnika palcowego u płazów i gadów. W oparciu o cele Autor zdefiniował trzy hipotezy badawcze, które poddał testowaniu poprzez wnioskowanie statystyczne. Należy podkreślić, że sformułowane na stronie 33 hipotezy oparte są o „wstępne wyniki” przez co z metodologicznego punktu widzenia nabrały one większego znaczenia dla badanego zjawiska.

Pod względem formalnym rozprawa ma bardzo złożoną strukturę. Składa się ona z trzech opublikowanych artykułów w bardzo dobrych czasopismach (*Anatomical Record*: IF = 1,542; *Journal of Anatomy*: IF = 2,720 i *Zoological Letters*: IF = 2,075), które zostały przetłumaczone na język polski/lub szeroko omówione w rozdziałach: wstęp, materiały i metody, wyniki oraz dyskusja. Zasadniczo więc rozprawa składa się z XII rozdziałów, wśród których materiały i metody oraz wyniki zostały podzielone na podrozdziały, odpowiadające publikacjom dołączonym jako rozdział XII. Szkoda, że rozdziały wstęp i dyskusja też nie utrzymał takiej konwencji podziału. Rozprawa składa się z 87 ponumerowanych stron, trzech nienumerowanych kopii artykułów naukowych i ich załączników oraz oświadczeń doktoranta i współautorów o wkładzie w powstanie każdej z publikacji. Zgodnie z nimi udział doktoranta oscylował między 60 a 90 %.

Wstęp stanowi *kompedium*, na temat wskaźnika palcowego i warto dodać, że jest to studium kompletne. Autor omówił tę cechę anatomiczną na wielu poziomach organizacji biologicznej tj. od

procesu kształtowania w okresie zarodkowym na płaszczyźnie hormonalnej, po skutki wskaźnika palcowego w różnych aspektach życia osobnika i funkcjonowania populacji. Wyczerpująco omówiono także relacje między fizycznymi a behawioralnymi cechami organizmów. Należy zaznaczyć, że Autor ciekawie poprowadził narrację tego rozdziału, który jest interesujący nie tylko dla herpetologów, ale także znajdzie szerszy krąg odbiorców, włączając w to także badaczy zajmujących się dość odległym filogenetycznie gatunkiem jakim jest *Homo sapiens*. Jest to skutek omawiania zawiłości procesów fizjologicznych kształtujących wskaźnik palcowy, wsparty badaniami prowadzonymi właśnie na człowieku. Nie zgadzam się jednak z twierdzeniem Autora zawartym na stronie 20, że badania korelacyjne są uzupełnieniem badań eksperymentalnych. Należy raczej przyjąć rozumowanie odwrotne. Związki korelacyjne, które ze swojej natury nie są przyczynowo - skutkowe podlegają testowaniu w zamkniętych układach eksperymentalnych, tak aby jednoznacznie określić m.in. co jest skutkiem, a co przyczyną. Na stronie 20 omawianego rozdziału Autor wysuwa wątpliwość na temat „konserwatywności” wskaźnika palcowego u wszystkich kręgowców. Wspiera się oczywiście odpowiednią literaturą, ale w tym miejscu aż prosi się, aby to heurystyczne przypuszczenie przetestować w oparciu o twardą z metodycznego punktu widzenia metaanalizę odziedziczalności tej cechy. Taka analiza mogłaby opierać się na obliczeniu wskaźnika powtarzalności (ang. *repeatability*) i stopnia jego wariancji w poszczególnych grupach kręgowców. W ten sposób Autor potwierdzi lub sfalsyfikuje swoje przypuszczenie.

W nienumerowanym podrozdziale wstępu: „wskaźnik palcowy u płazów” na stronie 25 Autor napisał że: „współczynnik palcowy (...) w dużym stopniu może zależeć od ewolucyjnej historii gatunku i ulega modyfikacjom w wyniku: 1) zaburzeń środowiska; 2) doboru naturalnego lub 3) dostosowania danego gatunku do trybu życia i panujących warunków środowiskowych (...)”. Przytoczony fragment jest dość nieszczęśliwie zredagowany, ponieważ sugeruje jakby dobór i zaburzenia środowiska były niezależnymi od siebie predyktorami stanu cechy w populacji, a ewolucyjne historie gatunku były kształtowane pod niezależnym wpływem doboru naturalnego i warunków środowiska. W ekologii ewolucyjnej przytoczone przez mgr. Mikołaja Kaczmarek terminy są twardo zdefiniowane zarówno na poziomie opisowym jak i funkcjonalnym. W przypadku cechy „wskaźnik palcowy” która jest najprawdopodobniej poligenowa należy przyjąć, że istnieje jej abstrakcyjna wartość stała –

określana mianem „jakość cechy”. Taka cecha podlega chwilowym zaburzeniom z uwagi na warunki środowiskowe i efekt tego zaburzenia generuje wariacje tej cechy w populacji, która definiowana jest jako „kondycja”. Dopiero ta relacja (jakość vs. kondycja) może być wyjaśniona przez plastyczność fenotypową (np. na skutek działania czynników środowiska o których napisał Autor), lub na skutek doboru naturalnego będzie dochodzić do selekcji genotypów i tym samym zmian ewolucyjnych co znajduje odzwierciedlenie w cechach historii życia. Prosiłbym doktoranta o ustosunkowanie się do tego schematu argumentacji.

W tej części pracy (strona 27) na szczególną uwagę zasługuje akapit dotyczący błędnej numeracji palców u płazów bezogonowych. Problem, który jest powszechnie znany od wielu lat ale nie doczekał się konstruktywnego rozwiązania. Dlatego podjęcie przez Doktoranta tego tematu, stanowi osobliwą wartość dodaną niniejszej rozprawy. Jest to bowiem działanie w obszarze metodyki, a to oznacza, że publikacja ma realne szanse być szeroko cytowana przez wiele lat. Już sam Autor dostrzega pośrednio potencjał tej analizy, ponieważ w dyskusji wskazał, że opracowana przez niego metoda została przetestowana/zastosowana na salamandrach płamistych przez inny zespół badaczy.

Rozdział materiały i metody nie budzi większych zastrzeżeń. Autor jasno wskazał skąd pochodzi i jak gromadzony był materiał badawczy do poszczególnych publikacji. Opracowana metoda wykonywania zdjęć w oparciu o które przeprowadzono analizy statystyczne na potrzeby pierwszej publikacji, wystandaryzowała warunki świetlne i pomiarowe. Z uwagi na to, że materiał pochodził z muzeum i konserwowany był w alkoholu, nasuwa mi się pytanie jak to utrwalanie zniekształciło/zaburzyło długości ciała osobników.

Autor zastosował wysoce konserwatywne podejście do metod statystycznych, co jest godne pochwały. Gdy w wyniku transformacji zmiennej nie uzyskano rozkładu normalnego testowanie hipotezy odbywało się z zastosowaniem metod nieparametrycznych. Podobnie postępowano w przypadku braku homogeniczności wariacji między grupami. Również w takich przypadkach zastosowano podejście nieparametryczne; choć do tego wniosku doszedłem pośrednio, ponieważ m.in. na stronie 37 Autor nie wskazał między jakimi grupami badał jednorodność wariacji testem Levene'a. Tutaj wypada mi wskazać, że Autor w przypadku braku jednorodności wariacji miał możliwość zastosowania podejścia parametrycznego (czyli parametrycznej alternatyw dla testu U Mann'a-

Whitneya). Testy z grupy t-Studenta dopuszczają ich stosowanie w przypadku niejednorodności wariancji poprzez użycie procedury (testu) *Cochrana-Coxa* która pozwala wykonać test w oparciu o aproksymację *Welcha*.

W części drugiej rozdziału materiały i metody Autor przedstawiając metodykę prac terenowych, nie wskazał jak dokonano odłowu ropuch szarych i czy były one indywidualnie znakowane, tak aby uniknąć pseudorelikacji. W dalszej części można wprawdzie przeczytać, że ropuchom odcinano palec (standardowa metoda) – ale stanowi to tylko domysł, że jest to metoda indywidualnego znakowania w celu uniknięcia wspomnianego wyżej artefaktu.

W części trzeciej tego rozdziału (metodyka użyta w trzeciej publikacji) opisano także w sposób zadowalający metody badań terenowych i analizy danych. Tutaj, co istotne należy podkreślić wysoką wprawę Doktoranta w pracach terenowych w trakcie, których stosując metodę „na upatrzonego” u żadnej z jaszczurek nie doprowadził do autotomii. W części analitycznej tego rozdziału zastanawia mnie konstrukcja modelu mieszanego (GLMM) w aspekcie usuwanie nieistotnych czynników. Tutaj kieruję do doktoranta pytanie jak to zostało wykonane? Czy stosowano postępującą czy wsteczną eliminację nieistotnych czynników lub czy zbudowano wszystkie możliwe warianty modeli i zastosowano kryterium informacyjne do uzyskania najlepiej dopasowanego modelu? Ponadto czy opisany test *t* na stronie 45 dotyczy testu czynnika w modelu czy jest to inna niezależna analiza.

Rozdział wyniki jest napisany na bardzo dobrym poziomie szczegółowości. Moje obawy podobnie jak w rozdziale materiały i metody dotyczą aspektów tylko edytorskich i technicznych. W tekście prezentując wyniki (np. testu współczynnika korelacji, testu *u* i *t*) pominięto wielkość próby (*n*). Ponadto między stronami 42 a 50 zauważyłem pewną niespójność (GLMM vs. GLMs) czy Autor ma tutaj na myśli tą samą analizę, czy są to dwa oddzielne podejścia? Ponadto do pełnej oceny jakości modeli bez względu na jej typ, warto zawsze wskazać procent wyjaśnionej przez model wariancji (tzw. R^2), co konsekwentnie przez Autora zostało pominięte w każdym przypadku. Na stronie 56 i 59 pojawia się stwierdzenie: Wszystkie uzyskane wartości ICC były... [str. 49] akceptowalne (...) [strona 56] istotne i akceptowalne (...). Dlaczego tylko w jednym przypadku wykonano test statystyczny? W tabeli nr 1 brakuje wartości statystyki testowej. Na stronie 48 oznaczenie dla współczynnika korelacji

powinno być 'r_s' (zgodnie z opisaną metodyką – korelacja rang Spearmana) zamiast 'r' (nie stosowana korelacja Pearsona). Na stronie 50 Autor napisał, że siła efektu była niewielka, tak zapewne jest, ale w odniesieniu do Tabeli która ten wniosek ma potwierdzać nie zawarto miary błędu oszacowania statystyki g, co utrudnia jednoznaczną interpretację siły efektu. Ponadto dość arbitralnie Autor podszedł do opisu analizy regresji przedstawionej na rysunku 5 tj. relacji między wiekiem a wielkością ciała. Zmienna wiek, jak wywnioskowałem jest w tym przypadku wartością skalarną o charakterze skokowym (nie ciągłym) stąd też warto w takim przypadku zaznaczyć, że ta zmienna nie jest zmienną klasyfikacyjną/grupującą, którą teoretycznie mogłaby być, a to z kolei poddawałoby w wątpliwość zasadność zastosowanej analizy.

Rozdział dyskusja, podobnie jak wstęp jest wielowątkowy i wielopłaszczyznowy, co należy docenić. Wyniki omawiane są w kontekście innych badań, prowadzonych na kręgowcach. Należy docenić ogromną wiedzę Doktoranta o analizowanych zależnościach zarówno na poziomie fizjologicznym, osobniczym i populacyjnym. Rozdział rozpoczyna się bardzo ostrożnym stwierdzeniem, że wyniki dostarczają danych (...). W mojej opinii Autor podszedł zbyt skromnie do oceny wartości naukowej swoich wyników. Należy tutaj jasno wskazać, że Autor nie dostarczył danych tylko jednoznaczne dowody na analizowane zjawisko.

Na stronie 64 Autor napisał, że niewielkie zmiany w środowisku są prawdopodobnie przyczyną jednoczesnego występowania w populacji *female-male-based* wskaźników palcowych. W tym miejscu kolejne pytania do doktoranta: Jaki mechanizm biologiczny miałby za to odpowiadać? Interpretując literalnie wynik tej analizy należy stwierdzić, że cecha ta w populacji jest ograniczona tylko i wyłącznie możliwościami fizjologicznymi organizmu. Jest to wynik bardzo intrygujący, ponieważ pośrednio wskazuje, że ta cecha podlega bliżej nieokreślonemu wariantowi doboru stabilizującego. Jak Autor wielokrotnie podkreśla wskaźnik palcowych jest determinowany genetycznie a regulatorem jego ekspresji jest układ hormonalny. Jeśli faktycznie cecha ta jest tak plastyczna jak wskazuje ten wynik to jakie jest znaczenie adaptacyjne tej cechy?

Z edytorskiego punktu widzenia rozprawa przygotowana jest przejrzysto i bardzo starannie. Nie znalazłem rażących błędów stylistycznych, interpunkcyjnych i literowych. Zdążają się drobne błędy

edytorskie, które są w zasadzie charakterystyczne dla opracowań tego typu i nie wpływają na wioską wartość merytoryczną ocenianej rozprawy. Na przykład:

Strona 24: jest '2017 roku' – powinno być 'roku 2017' lub '2017 r.'

Strona 49: jest 'dodatkowo wieki ropuch' – powinno być 'dodatkowo wiek ropuch'

Strona 58: jest 'natomiast model matematyczne' – powinno być 'natomiast modele matematyczne'

Strona 61 '(...) wcześniej badacze'. Brak odniesienia do tych wcześniejszych badań

Strona 63 jest 'naszych nasze badaniach' – powinno być 'naszych badaniach'

Strona 65 jest (...) 'rozwijających się wodzie kijanek' – powinno być 'rozwijających się w wodzie kijanek'

Podsumowanie i uzasadnienie wniosku o wyróżnienie:

Rozprawa jest niewątpliwie wyróżniającą się. Przygotowane przez Doktoranta, pod wprawnym okiem Promotora, opracowanie przeniosło „wskaźnik palcowy” z poziomu opisowego na wyższy poziom naukowy tj. przyczynowo - skutkowy, co umożliwia stawianie pytań (i formułowanie odpowiedzi) o kształtowanie się cechy w procesie doboru naturalnego i tym samym jej konsekwencje dla populacji. Doktorant wykazał się nietuzinkową wiedzą, umiejętnością łączenia faktów, analizy danych i ich szerokiej interpretacji i to te aspekty należy tutaj zdecydowanie podkreślić. W mojej opinii rozprawa doktorska stanowi wzorcowy przykład badań realizowanych w ramach 'projektów doktorskich'. Na podstawie występnych badań tj. pewnych przesłanek, zaprojektowano układ badawczy testujący klarownie zdefiniowane hipotezy. Konsekwencją przejrzystości tego schematu było opublikowanie wyników badań w bardzo dobrych periodykach naukowych.

Moja wysoka ocena opiera się więc na szeregu argumentów zarówno merytorycznych i organizacyjnych, którymi wykazał się Doktorant, a do najważniejszy należą:

1. Badając cztery gatunki traszek Autor wykazał, że charakterystyczny dla ssaków wskaźnik palcowy jest także charakterystyczny dla płazów. Przeprowadzenie badań na kilku gatunkach rozszerza interpretację uzyskanego wyniku i nie stanowi tylko studium przypadku.

2. Koncepcyjne opracowanie i przetestowanie założeń prawidłowej numeracji palców u płazów bezogonowych Anura.
3. Zaprojektowanie standardowej metody pomiarów palców u płazów.
4. Wykazanie kosztów autotomii odzwierciedlonej w różnie ukształtowanych wskaźnikach palcowych.
5. Opublikowanie wyników w wiodących periodykach naukowych.
6. Zdobywanie pozauczelnianych środków na badanie.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że dysertacja p. mgr inż. Mikołaja Kaczmarzkiego spełnia warunki stawiane przed rozprawami doktorskimi i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie p. mgr inż. Mikołaja Kaczmarzkiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie w oparciu o przedstawione wyżej argumenty wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Prof. UAM dr hab. Jakub Z. Kosicki



Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu