



Zakład Hydrobiologii
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa
tel.: 22 55 26 518 fax: 22 55 26 575

Warszawa, 19.11.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Karoliny Pałki pt.
„Effects of the reproductive system on the evolution of fitness-related traits
in *Caenorhabditis elegans* under different environmental conditions”.**

Licząca 123 strony rozprawa doktorska Pani mgr Joanny K. Pałki jest, w swojej zasadniczej części, zbiorem trzech powiązanych tematycznie oryginalnych artykułów naukowych, stanowiących rozdziały Rozprawy, z których dwa - pierwszy i ostatni - zostały już opublikowane w dobrych, indeksowanych czasopismach - *PeerJ* (współczynnik wpływu $IF=3,06$) i *Journal of Nematology* ($IF=1,48$). Zbiór ten został poprzedzony przejrzystym napisanym Abstraktem i jego odpowiednikiem w języku polskim (Streszczenie), zwięźle informującym o zawartości rozprawy i obszernym, 13-stronicowym wstępem. Wszystkie artykuły są wieloautorskie (pierwszy z nich ma 6 autorów, drugi - także 6 i trzeci 4) a Doktorantka jest ich pierwszą autorką. Dołączone do Rozprawy oświadczenia Doktorantki i wszystkich współautorów potwierdzają zdecydowanie dominujący udział Pani mgr Joanny Pałki (wyrażony w %) w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, zbieraniu materiałów, analizie i interpretacji wyników, wreszcie w przygotowywaniu i redagowaniu manuskryptów (46-55%). Należy podkreślić, że charakter i skala eksperymentu przedstawionego w Rozprawie są absolutnie imponujące i badania te mogły być zrealizowane wyłącznie w wieloosobowym zespole.

Wstęp do Rozprawy (*General introduction*) jest interesującym i kompetentnym przeglądem literatury dotyczącej (1) ewolucji strategii rozrodczych i konfliktów między płciami, (2) kosztów i korzyści wynikających z rozrodu dwupłciowego - w szczególności wpływu typu rozrodu - (bezpłciowego lub jednopłciowego vs. dwupłciowego) na tempo powstawania i utrwalania się adaptacji, wreszcie (3, 4, 5) właściwości użytego w badaniach gatunku

nicienia, *C. elegans*, jako unikatowego i wręcz wyjątkowo dogodnego modelu do studiów nad ewolucją cech związanych z interakcjami pomiędzy płciami i wpływu różnych systemów reprodukcyjnych na adaptacje. Ta dyskusja literatury pozwoliła Doktorantce na sformułowanie dwóch podstawowych hipotez przyjętych w rozprawie, które są przedstawione w końcowej części Wstępu i zarysowania przyjętej metodologii badań, opartej na modelu eksperymentalnej ewolucji w populacjach *C. elegans* posługujących się dwoma typami rozrodu - hermafrodytycznym, z samozapłodnieniem, i dwupłciowym, z obligatoryjnym krzyżowaniem się. Jedyne drobne zastrzeżenie, jakie mam do tej części Rozprawy, dotyczy niepotrzebnych powtórzeń w tekście - ostatnie zadania kończące 2 akapit na stronie 10 są literalnie powtórzone na stronie 15.

Pierwszy rozdział Rozprawy (*Palka, J. K., Dyba, A., Brzozowska, J., Antoń, W., Sychta, K., & Prokop, Z. M. 2023. Evolution of fertilization ability in obligatorily outcrossing populations of Caenorhabditis elegans. PeerJ, 11, e15825*) poświęcony jest testowaniu przypuszczenia (hipotezy), że zmiana systemu reprodukcyjnego hermafrodytycznych nicieni z samozapłodnienia na obligatoryjne krzyżowanie się uruchomi selekcję cech zwiększających efektywność tego ostatniego typu rozrodu, zdegenerowanych przez „syndrom samozapłodnienia”. Rzeczywiście, w zastosowanym modelu eksperymentalnej ewolucji należałoby oczekiwać bardzo silnego doboru w kierunku wzrostu wydajności zachowań i mechanizmów fizjologicznych związanych z kopulacją i krzyżowym zapłodnieniem. Jednakże porównanie, po 100 pokoleniach, tempa zapłodnienia samic w populacjach kontrolnych (hermafrodytycznych) i populacjach, w których wykluczono samozapłodnienie, nie wykazało jednoznacznie oczekiwanej ewolucji cech rozrodczych (choć wyższe tempo zapłodnienia prawdopodobnie pojawiło się u niektórych populacji zmuszonych do krzyżowego rozrodu).

Drugi rozdział (*Palka, J. K., Kosztyła, P., J., Antoń, W., Labocha, M., Sychta, K., & Prokop, Z. M. Genetic background modulates the effects of reproductive system and temperature on experimentally evolving Caenorhabditis elegans populations*) - jak dotąd nieopublikowany - prezentuje test drugiej z centralnych hipotez Doktorantki, przewidującej relatywnie większe dostosowanie w populacjach o krzyżowym rozrodzie ewoluujących przez 100 pokoleń w suboptymalnych warunkach (temperatura hodowli podwyższona do 24°C), od dostosowania ewoluujących w tych samych warunkach populacji hermafrodytycznych (z samozapłodnieniem jako dominującym typem rozrodu), wskutek spodziewanego szybszego

tempa rozprzestrzeniania się adaptacji w populacjach obligatoryjnie krzyżujących się. Wyniki tego eksperymentu nie wspierają jednak przyjętej hipotezy.

Wreszcie trzeci rozdział Rozprawy (*Palka, J. K., Fiok, K., Antoń, W., & Prokop, Z. M. 2020. Competitive fitness analysis using convolutional neural network. Journal of Nematology, 52(1), 1-15*) jest czysto metodyczny i zawiera opis oryginalnej wysoko przepustowej metody szacowania liczebności i klasyfikowania nicieni (tj. odróżniania osobników wyznakowanych białkiem fluorescencyjnym GFP od niewyznakowanych), wykorzystującej model uczący się za pomocą sieci neuronowych. Metoda ta okazała się bardzo dobra, 20-krotnie zwiększyła wydajność analizy zdjęć w porównaniu do „manualnego” (czy raczej naocznego?) liczenia i w gruncie rzeczy umożliwiła wykonanie badań opisanych w 2 rozdziale Rozprawy w rozsądnym czasie.

Rozprawa doktorska Pani Joanny K. Palki wydaje mi się dziełem godnym uznania i nadzwyczaj ambitnym, z co najmniej trzech powodów. Po pierwsze, dotyczy ewolucji eksperymentalnej, ta zaś zajmuje szczególne miejsce wśród dziedzin biologii ewolucyjnej, a może biologii w ogóle (*Nothing in biology makes sense, except in the light of evolution*, by zacytować klasyka), bowiem zajmuje się wprost testowaniem działania doboru naturalnego. Trudno o bardziej fundamentalne eksperymenty w biologii. Po drugie, rozprawa odnosi się do ewolucyjnych konsekwencji rozrodu płciowego, najpowszechniejszego sposobu rozmnażania się w świecie zwierząt, o trudnych do przecenienia konsekwencjach dla różnorodności życia na Ziemi. Ta powszechność jest zadziwiająca (i nie do końca wyjaśniona) wobec znacznych kosztów rozrodu płciowego, związanych m. in. z dwukrotną redukcją (w stosunku rozrodu aseksualnego lub jednopłciowego) dostosowania mierzonego w kategoriach wydajności powielania wołanych genów rodzica, czy tempa wzrostu populacji. Po trzecie wreszcie, przedstawione w rozprawie badania wykorzystują gatunek modelowy - nicienie *Caenorhabditis elegans* - wprost idealnie nadający się do testowania sformułowanych przez Autorkę hipotez. Wynika to przede wszystkim z możliwości manipulowania systemem rozrodczym tego zasadniczo hermafrodytycznego nicienia, poprzez introgresję genu blokującego spermatogenezę, co czyni zmutowane osobniki funkcjonalnymi samicami i wyklucza dominujące w "dzikich" populacjach samozapłodnienie. To właśnie było podstawowym chwytem metodycznym w badaniach będących przedmiotem Rozprawy.

O ile jestem w stanie to ocenić (nie mam własnych doświadczeń z *C. elegans*, ani z eksperymentalną ewolucją!) metodyka badań, podobnie jak wyrafinowana analiza

uzyskanych wyników, są zdecydowanie mocną stroną Rozprawy. Elementy tej metodyki stanowiły zresztą wartość samą w sobie - i zostały opublikowane jako odrębna praca (rozdział 3 Rozprawy), bardzo przydatna dla badaczy pracujących z laboratoryjnymi populacjami nicieni. Daleko posunięte optymalizowanie metod było zresztą warunkiem *sine qua non* realizacji ujętych w rozprawie badań, których zakres (i obfitość materiału) stawiał Doktorantkę wobec nieuniknionej konieczności znalezienia kompromisu (*trade-off*) między pracochłonnością (czy wręcz wykonalnością) doświadczeń a wiarygodnością uzyskanych rezultatów.

Przy całym moim podziwieniu dla ambicji Doktorantki, rozmachu jej zamierzeń i wagi tresowanych hipotez nie sposób jednak nie zauważyć, że w pewnym sensie mamy tu przypadek pięknej porażki. Rozważne hipotezy nie uzyskały w jednoznaczny sposób eksperymentalnego wsparcia; nie zostały też jednoznacznie odrzucone, to bowiem, *toutes proportions gardées*, oznaczałoby podważenie darwinowskiego paradygmatu. Autorka Rozprawy sugeruje powody "słabości" uzyskanych rezultatów: przede wszystkim mogła ona wynikać z bardzo małej początkowej różnorodności genetycznej wykorzystanych populacji (która z innych względów była konieczna) i/lub z względnie krótkiego czasu ewolucji (~100 pokoleń). Zastanawiam się (i ciekaw byłbym opinii Doktorantki w tej kwestii) czy nie dałoby się dokonać jakiejś choćby przybliżonej, apriorycznej oceny czasu trwania tego rodzaju eksperymentów (wyrażonego liczbą generacji), który pozwoliłby na wykrycie spodziewanych adaptacji? Oczywiście potrzebne do tego byłoby poczynienie wielu założeń, np. co do tempa mutacji, frakcji mutacji potencjalnie zwiększających dostosowanie, liczby alleli determinujących interesujące nas cechy itd., ale może jakieś rozsądne oszacowanie byłoby możliwe, zwłaszcza w odniesieniu do tak dobrze poznanego gatunku, jakim jest *C. elegans*?

W drugim rozdziale Rozprawy Autorka wykorzystuje "dostosowanie konkurencyjne" (*competitive fitness*), mierzone we wspólnych hodowlach, w których populacje ancestralne konfrontowane były populacjami ewoluującymi przez około 100 pokoleń. To zapewne właściwe podejście (podkreślam, że nie jestem ekspertem), solidnie zakotwiczone w literaturze (np. Crombie et al. 2018), ale zastanawiam się, dlaczego Doktorantka nie próbowała wykorzystać także powszechnie stosowanej w ekologii bezwzględnej miary dostosowania, czyli wewnętrznego tempa wzrostu populacji - "*r*". Miała przecież w ręku potrzebne dane, tj. szacowane przy każdym transferze liczebności wszystkich populacji i wobec tego policzenie *r* powinno być trywialne. Użycie tej miary prawdopodobnie dostarczyłoby dodatkowego

materiału do wnioskowana, a może nawet pozwoliłoby na uniknięcie czaso- i pracochłonnych eksperymentów konkurencyjnych.

Moja ogólna ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanna Karoliny Palki jest zdecydowanie pozytywna. Bardzo ambitne zamierzenie, którego podjęła się Pani mgr Palka zostało zrealizowane w sposób dowodzący jej znakomitych i rozległych kompetencji naukowych, od hodowli szczepów *C. elegans* począwszy a na tworzeniu narzędzi do wyrafinowanej analizy danych eksperymentalnych, opartej o uczenie maszynowe, skończywszy. Jakkolwiek Doktorantce nie udało się wykryć bezpośrednio przewidywanych efektów (oczekiwanej ewolucji cech wpływających na dostosowanie), to jednak Jej eksperymenty są prawidłowo zaprojektowane doskonale przeprowadzone i mam nadzieję, że są, i będą, kontynuowane (jednym z postulowanych przez Doktorantkę przyczyn niejednoznacznych wyników eksperymentów jest właśnie zbyt krótki czas ich trwania; ale studia doktoranckie mają swoje limity...). Gotowość Pani Joanny Palki do podjęcia naukowego ryzyka, którą musiała wykazać gdy rozpoczynała swoje badania doktorskie, jest godna najwyższego szacunku. Bez tego rodzaju cech charakteru badaczy trudno byłoby o jakikolwiek postęp w nauce. Wieloautorski charakter przedstawionych w Rozprawie publikacji, nie do uniknięcia w badaniach na taką skalę, dowodzi pewnych szczególnych, ale ważnych w nauce "miękkich" kompetencji Doktorantki - umiejętności pracy zespołowej i niekiedy (jak dowodzi pierwsza pozycja p. Palki na liście autorów tych prac) pełnienia funkcji lidera grupy badawczej, a także - zdolności do nawiązywania kontaktów i przyciągania kompetentnych współpracowników. Wreszcie, prócz prac zawartych w Rozprawie, Pani mgr J.K. Palka jest współautorką łącznie 4 dalszych "indeksowanych" publikacji dotyczących podobnej tematyki co jest dla naukowca na tym etapie kariery jest to wręcz znakomitym dorobkiem.

Wobec powyższego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja Pani mgr Joanna Karoliny Palki spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2028 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 poz. 1668 późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Piotr Dawidowicz