



Prof. dr hab. Krzysztof Szpila  
Katedra Ekologii i Biogeografii  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

## Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Marcina Rasia p.t. „Układ trachealny w rozwoju postembrionalnym u owadów holometabolicznych na przykładzie chrząszcza *Tenebrio molitor* L.”

Układ tchawkowy owadów jest jednym z elementów, które umożliwiły owadom kolonizację środowisk lądowych i osiągnięcie spektakularnego sukcesu ewolucyjnego. Układ ten obejmuje sieć przewodów wyściełanych kutykulą i wypełnionych powietrzem, zapewnia efektywną wymianę gazową bez udziału układu hemolimfatycznego. Fiziologia wymiany gazowej u owadów jest częstym tematem badań, jednak topologia samego układu tchawkowego jest nadal słabo poznana nawet u gatunków uznawanych za modelowe. Należący do rzędu chrząszczy mącznik młynarek *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae), jest jednym z takich organizmów modelowych, o dużym znaczeniu w badaniach z różnych dziedzin biologii. Układ tchawkowy tego owada był już obiektem badań zarówno dawnych, jak i obecnie aktywnych naukowców. Obserwowany w ostatnich latach rozwój nowoczesnych technik obrazowania (takich jak mikrotomografia komputerowa) znacząco wpłynął na rozwój badań z zakresu morfologii i anatomii zwierząt. Możliwe do wykonania stało się nie tylko dokładne obrazowanie niezwykle skomplikowanych struktur (takich jak układ tchawkowy) ale także oparcie badań porównawczych tych struktur na pozyskiwanych automatycznie obszernych zbiorach danych pomiarowych. Przedstawiona praca doktorska mgr Marcina Rasia wpisuje się w ten nurt badań i jest cennym wkładem w poznanie dynamiki zmian układu tchawkowego owadów w czasie metamorfozy.

Recenzowana rozprawa liczy 89 stron: tekst pracy zawiera 55 stron, na pozostałych znajduje się 46 rycin i zajmujący trzy strony ich spis. Ryciny to schematy (5), cyfrowe obrazy analizowanych struktur układu tchawkowego (31) i wykresy ilustrujące wyniki analiz statystycznych (11). Praca odwołuje się do 122 publikacji. Układ pracy, struktura podziału

treści i kolejność rozdziałów nie budzą zastrzeżeń. Rozprawa jest zredagowana bardzo starannie, niemal bez błędów edytorskich.

Prace rozpoczyna streszczenie, które klarownie i precyzyjnie opisuje treść rozprawy.

Następnie w stosunkowo krótkim, liczącym pięć stron wstępie, autor charakteryzuje układ tchawkowy u owadów, przedstawia zwięźle stosowane metody jego analizy i uzasadnia podjęcie tematyki badawczej. Precyzuje także pięć celów pracy, prawidłowo i przejrzysto sformułowanych.

Następny, rozdział (5 stron) przedstawia zastosowane w pracy materiały i metody. Rozdział ten został podzielony na 4 podrozdziały omawiające kolejno materiał badawczy (owady i metody ich preparowania), mikrotomograf i proces skanowania, techniki wizualizacji, pomiarów i metody obliczeń statystycznych oraz nazewnictwo. Do badań wykorzystano osobniki *T. molitor* (10 osobników dla każdego badanego stadium rozwojowego) pochodzące z hodowli prowadzonej z zachowaniem odpowiednich warunków w Muzeum i Instytucie Zoologii PAN. Ostatecznie uzyskano trzydzieści modeli cyfrowych układu trachealnego. Co ważne dla późniejszej interpretacji wyników, wykonano skany dwóch osobników w celu zobrazowania narządów wewnętrznych. Szczegółowa procedura przygotowania materiałów oraz skanowania  $\mu$ CT nie została przedstawiona – Doktorant podał jedynie odwołanie do publikacji, gdzie te procedury opisano. W mojej opinii nie jest to właściwe podejście w przypadku tradycyjnej rozprawy doktorskiej. Sam proces skanowania został przeprowadzony w oparciu o sprzęt (SkyScan 1172) dostępny w MiIZ PAN. Rekonstrukcję skanów i ich dalsze przetwarzanie wykonano przy zastosowaniu odpowiedniego oprogramowania (NReacon, CTAn, CtVox). W celu uniknięcia generacji artefaktów Doktorant różnicował ostateczną rozdzielczość uzyskanych modeli układu tchawkowego. Dla uzyskania wiarygodnych wyników analiz kluczowe było zastosowanie odpowiednich narzędzi do wizualizacji, pomiarów i obliczeń statystycznych. Analizowano takie parametry jak rzeczywistą odległość pomiędzy przetchlinkami (oprogramowanie DataViewer), długość tchawek wisceralnych oraz objętość przedsionka tchawkowego (Blender z rozszerzeniem NeuroMorph, CTAn) czy dystrybucję średnicy tchawek (CTAn). Obszerny zbiór danych pomiarowych musiał zostać poddany odpowiedniej analizie statystycznej. Doktorant posłużył się wieloma narzędziami statystycznymi (wchodzącymi głównie w skład pakietu R) korespondującymi z sformułowanymi celami pracy. Do określenia istotności statystycznej różnic pomiędzy pomiarami metrycznymi poszczególnych elementów układu trachealnego wykorzystano testy ANOVA i Tukeya (HSD). Analiza regresji objętość poszczególnych modułów układu trachealnego a objętość całego układu trachealnego oraz objętość poszczególnych modułów układu trachealnego a objętość całego ciała, została przeprowadzona z wykorzystaniem metody *Standardized Major Axis* (SMA). Do testowania

hipotez na temat hierarchicznej struktury układu trachealnego opartej na modułach i zespołach modularnych wykorzystano hierarchiczną analizę skupień (*hierarchical agglomerative clustering*). Analiza rozmieszczenia gęstości układu trachealnego w przestrzeni została wykonana z zastosowaniem gaussowskiego modelu mieszanego (GMM, *Gaussian Mixture Model*). Złożoność przestrzenną tego układu analizowano w oparciu o wartość indeksu wymiaru fraktalnego (*fractal dimension*). Podsumowując, Doktorant zastosował adekwatną i nowoczesną metodykę badań, umożliwiającą osiągnięcie zaplanowanych celów badawczych.

Rozdział „wyniki” stanowi najbardziej spektakularną część rozprawy. Składa się z sześciu podrozdziałów. Badania rozbudowanych układów morfologiczno-anatomicznych potrzebują odpowiedniej terminologii. Niestety często nomenklatura naukowa jest niespójna, stosowane są alternatywne systemy nazewnictwa. Podobną sytuację mgr Raś zastał w opisach systemu trachealnego owadów. Dlatego zaproponował uzupełnienie i ujednolicenie nazewnictwa w oparciu o kryterium położenia względem części ciała owada, osi ciała, przydatków oraz narządów wewnętrznych. Podsumowaniem jest tabela 2 zawierająca listę 87 terminów. Osobie nie związanej bezpośrednio z tematyką badawczą trudno tu ocenić wkład pracy autora. Przydatna byłaby informacja, które z wymienionych terminów zostały przez Doktoranta zaadoptowane bez zmian, które są propozycją zmiany a które z nazw zostały wprowadzone dla struktur opisywanych po raz pierwszy. Znajdujący się w dalszej kolejności opis stałych elementów głównej struktury budowy układu trachealnego jest wsparty całą serią doskonałych ilustracji: schematów oraz wizualizacji  $\mu$ CT w formie dwuwymiarowej i trójwymiarowej (animacje 3D z załączników). Dokumentacja ta nie ustępuje jakością najlepszym opracowaniom w badaniach morfologii i anatomii owadów. Poza standardowymi opisami niezwykle złożonych układów tchawkowych Doktorant wyznaczył także tzw. podstawowy moduł oddechowy u badanego gatunku, będący modelem wyjściowym dla opisu dowolnej przetchlinki związanej strukturalnie z jednym segmentem ciała. Zdefiniowanie tej struktury miało podstawowe znaczenie dla dalszych dociekań na temat dynamiki zmian badanego układu w trakcie metamorfozy. Nieco zastanawiająca jest kwestia interpretacji teratologii. Przy bardzo dużej komplikacji budowy układu autor rozprawy powinien doprecyzować na podstawie jakich dokładnie kryteriów (dysponując jedynie wizualizacjami  $\mu$ CT) można odróżnić teratologie od zmienności osobniczej. W dalszej części rozdziału autor opisuje strukturę układu trachealnego wybranych narządów wewnętrznych postaci dorosłej. Następnie układ tchawkowy przedstawiony jest w ujęciu tagm oddechowych o hierarchicznej strukturze organizacji. Ta dokumentacja także stanowi niezbędną podstawę do analiz dotyczących dynamiki zmian układu trachealnego przedstawionych w następnym podrozdziale. Przy pomocy wymienionych powyżej narzędzi statystycznych Doktorant

scharakteryzował zachodzące w trakcie metamorfozy następujące zmiany: odległości pomiędzy przetchlinkami, względnej wielkości przedsionków tchawkowych, objętości układu trachealnego, średnicy tchawek i długości tchawek wisceralnych. Opierając się na odpowiednich testach statystycznie, wykazał że: (1) odległości pomiędzy przetchlinkami ulegają statystycznie istotnym zmianom podczas metamorfozy zarówno w osi sagitalnej, jak transwersalnej; (2) istnieją istotne różnice objętości przedsionków tchawkowych pomiędzy stadiami rozwojowymi; (3) w odróżnieniu od całkowitej objętości ciała, średnia wartość całkowitej objętości układu tchawkowego rośnie w czasie metamorfozy; (4) istnieją istotne różnice średnich wartości maksymalnego przekroju tchawek pomiędzy badanymi stadiami rozwojowymi; oraz (5) istnieją znaczące różnice w długości tchawek wisceralnych pomiędzy poszczególnymi stadiami rozwojowymi. Początek ostatniego podrozdziału, dotyczącego przestrzennego rozkładu układu trachealnego, jest nieco niejasny. W jaki sposób „nie uwzględnienie danych związanych z funkcjonowaniem części oraz całości układu trachealnego, ani z budową anatomiczną i morfologiczną badanych obiektów” miało posłużyć do zobiektywizowania danych? Myślę, że to nieco enigmatyczne stwierdzenie powinno być szerzej rozwinięte. Rozkład przestrzenny badanego układu zarówno u larwy jak i postaci dorosłej okazał się być niezgodny z podziałem ciała na tagmy morfologiczne. Zamiast tego hierarchiczna analiza skupień wykazała istnienie (1) zespołu głowowo-tułowiowego i dwóch odwłokowych u larwy; oraz (2) zespołu głowowo-przedtułowiowego, tułowiowego (z dwoma segmentami odwłoka) i zespół odwłokowego u postaci dorosłej. Ponadto zagęszczenie układu tchawkowego okazało się zróżnicowane u różnych stadiów rozwojowych. U larwy tchawki tworzą największe zagęszczenie po bokach ciała wzdłuż podłużnych pni tchawkowych, z poprzecznym zagęszczeniem w okolicach głowy. Natomiast u poczwarki i postaci dorosłej istnieją wyraźne wydzielone centra gęstości odpowiadające wcześniej wyodrębnionym zespołom. Doktorant zaobserwował także, że stopień złożoności struktury układu trachealnego wykazuje tendencje wzrostowe dla kolejnych stadiów rozwojowych. Podsumowując – forma prezentacji wyników jest przejrzysta z odpowiednim wyeksponowaniem najważniejszych rezultatów. Śmiało można stwierdzić, że ta część pracy jest wykonana na najwyższym światowym poziomie.

W kolejnym rozdziale Doktorant podsumował uzyskane wyniki i następnie skonfrontował je z istniejącymi teoriami dotyczącymi metamorfozy owadów. Opisany przez niego wzrost układu trachealnego mierzony stosunkiem objętości ciała do objętości całego układu trachealnego (izometria dla przeobrażenia larwa/poczwarka, allometria dodatnia dla przeobrażenia poczwarka/imago) potwierdza ogólne teorie na temat rozdzielenia stadium larwalnego od dorosłego. Badania przeprowadzone przez mgr Rasia pozwoliły na krytyczną weryfikację przytaczanego często poglądu o prostocie budowy układu trachealnego u larw.

Wyniki te nie dają wprawdzie podstaw do wyodrębnienia tagm, jednak wskazują wyraźnie na istnienie widocznych w stadium larwalnym modułów głowy i tułowia. Doktorant wykazał także zgodność swoich obserwacji dotyczących rozwoju homologicznych tchawek tułowia, zatułowia i odwłoka (prowadzącego do powstania systemu trachealnego pokryw, skrzydeł oraz struktur odwłoka) z teorią homologów serialnych. Wyniki pracy wyraźnie wskazują na odmienny podział układu tchawkowego od podziału ciała na tagmy morfologiczne typowego dla owadów (głowa, tułów, odwłok). Mgr Raś wskazuje, że zaproponowana przez niego hipoteza o tagmach oddechowych może być testowana dla pozostałych grup uskrzydłonych owadów, u których rozmieszczenie przetchlinek zgodne jest z typem holopneustycznym. Z pewnością wkrótce poznamy wyniki takich badań.

Końcowe wnioski korespondują z celami pracy. Tekst tego rozdziału jest wypunktowany, odpowiada konkretnym pięciu celom pracy wymienionym we wstępie i jest napisany poprawnym i syntetycznym językiem. Doktorant wyczerpująco zrealizował pięć założonych celów pracy.

Ostatni rozdział pracy stanowi wykaz piśmiennictwa. Liczna literatura jest starannie dobrana i bezpośrednio dotyczy zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej.

Podsumowując, chciałbym podkreślić duży wkład Doktoranta w poszerzenie wiedzy dotyczącej morfologii i anatomii układu trachealnego owadów. Praca ma charakter pionierski ponieważ wykorzystując możliwości związane z zastosowaniem nowoczesnych technik wizualizacji, Doktorant po raz pierwszy zastosował analizy ilościowe w opisie dynamiki zmian badanego układu. Uważam, że mgr Marcin Raś wykazał się zdolnością do skutecznego prowadzenia badań naukowych oraz dobrą umiejętnością opracowania wyników i przedstawienia ich w formie rozprawy naukowej. Na tej podstawie stwierdzam, że praca „Układ trachealny w rozwoju postembrionalnym u owadów holometabolicznych na przykładzie chrząszcza *Tenebrio molitor* L.” spełnia kryteria rozprawy doktorskiej wynikającej z ustawy o stopniach i tytule naukowym i zwracam się do Rady Naukowej Muzeum i Instytutu Zoologii PAN o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką jakość przedstawionej dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie (zgodne z regulaminem Jednostki).

Prof. dr hab. Krzysztof Szpila

