

Recenzja
rozprawy doktorskiej
Pana mgr. Kamila Hupała

„Diversity and origin of freshwater amphipods of Mediterranean islands”

Pomimo znacznego postępu badań nad słodkowodną fauną wysp, stopień poznania genezy obecnego zróżnicowania taksonomicznego wielu grup jest nadal wysoce zróżnicowany regionalnie. Okazuje się, że do takich niedostatecznie poznanych regionów należą również wyspy Morza Śródziemnego, należące do Regionu Śródziemnomorskiego Palearktyki, będącego jednym z tzw. „biodiversity hotspots” w skali globalnej. Wobec szybkich i niekorzystnych zmian w środowisku wód śródlądowych (epi- i hypogeicznych) celowość podejmowania nie tylko przedsięwzięć inwentaryzacyjnych, ale również szeroko rozumianych badań ewolucyjnych wydaje się jak najbardziej zasadna i w ten nurt wpisuje się właśnie praca doktorska Pana mgr. Kamila Hupała, który wybrał do swoich badań skorupiaki pancerzowce Malacostraca ze szczególnym uwzględnieniem obunogów Amphipoda, jednej z najbardziej zróżnicowanych i najszerzej rozprzestrzenionych grup zwierząt w wodach słodkich.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska powstała pod opieką prof. dr. Michała Grabowskiego i dr. Tomasza Mamosa jako promotora pomocniczego w Katedrze Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii Uniwersytetu Łódzkiego. Dysertacja ma formę maszynopisu książki, liczy 163 strony i została napisana po angielsku. Praca składa się z pięciu rozdziałów zasadniczych spójnych tematycznie i odpowiadających tytułowi rozprawy (1. *Introduction*, 2. *Chapter I. Freshwater Malacostraca of the Mediterranean Islands – diversity, origin and conservation perspectives*, 3. *Chapter II. Origins and diversification of freshwater gammarids of the Aegean Archipelago*, 4. *Chapter III. Independent colonisations and high diversification in the insular freshwater gammarids* oraz 5. *General Discussion*), a także czterech części stanowiących dopełnienie rozprawy, tj. umieszczonego na początku streszczenia (*Summary*) oraz zamykających rozprawę wykazu literatury (*References*), załączników (*Supplementary material*) i streszczenia w języku polskim.

W rozdziale *Introduction* Autor nie wdając się w obszerne dywagacje dobrze uzasadnia podjęcie tematu swoich badań, który można określić jako obszerne studium na temat obecnej różnorodności taksonomicznej i pochodzenia Malacostraca zamieszkujących powierzchniowe i podziemne wody słodkie wysp Morza Śródziemnego. Cele pracy można określić jako bardzo ambitne, ponieważ obejmują zarówno a) zestawienie na podstawie literatury wszystkich dotychczasowych danych na temat występowania, różnorodności taksonomicznej i stopnia endemizmu pancerzowców

w wodach wszystkich wysp Morza Śródziemnego i analizę związku tej bioróżnorodności z historią geologiczną poszczególnych wysp (*Chapter I*), jak również b) badania dotyczące zakresu i przyczyn zmienności genetycznej oraz historii ewolucyjnej morfogatunków słodkowodnych obunogów z rodziny Gammaridae występujących na różniących się pod względem historii geologicznej wyspach Morza Egejskiego (*Chapter II*) oraz na Sycylii (*Chapter III*). Doktorant stawia dwie hipotezy, weryfikacja których moim zdaniem była jak najbardziej zasadna: 1) wyspowe gatunki z rodzaju *Gammarus* mają pochodzenie kontynentalne i skolonizowały badane wyspy poprzez połączenia lądowe; 2) wyspowe gatunki z rodzaju *Echinogammarus* mają pochodzenie morskie i skolonizowały wody słodkie badanych wysp w różnym czasie bezpośrednio ze środowiska morskiego.

Chapter I to obszerne (50 stron uzupełnionych sześciostronicową Tabelą S1 w *Supplementary material*), szczegółowe i dobrze napisane zestawienie aktualnego stanu wiedzy na temat zróżnicowania taksonomicznego, bogactwa gatunkowego, powiązań biogeograficznych oraz stopnia endemizmu Malacostraca wód śródlądowych poszczególnych wysp i archipelagów Morza Śródziemnego. Autor zaczyna od krótkiej charakterystyki ogólnego zróżnicowania Malacostraca i opisu biologicznej różnorodności Basenu Morza Śródziemnego, po czym opisuje krótko geologiczną historię poszczególnych (grup) wysp. Następnie przedstawia szczegółowo w ośmiu podrozdziałach dane na temat Malacostraca: 1) Balearów, 2) Korsyki i Sardynii, 3) Archipelagu Wysp Toskańskich, 4) Sycylii, Wysp Maltańskich i Pelagijskich, 5) Wysp Morza Adriatyckiego, 6) Krety oraz wysp Morza Egejskiego i Jońskiego, 7) Wysp Morza Marmara i 8) Cypru. Każdy podrozdział zawiera a) podstawowe informacje geograficzne, b) dane na temat fauny Malacostraca oraz c) opis historii geologicznej regionu i biogeografii pancerzowców. Rozdział ten kończy dyskusja na temat ogólnej bioróżnorodności i endemizmu Malacostraca wysp M. Śródziemnego, pochodzenia tych skorupiaków w tym regionie, ich zagrożenia i problemów ochrony. Autor wykazuje łącznie 181 gatunków pancerzowców, z których ponad połowa (58%) należy do Amphipoda. Warto dodać, że nieco ponad połowa (51%) wszystkich wykazanych gatunków to endemity, a 61% stanowią stygobionty. Największą liczbę gatunków wykazano w wodach śródlądowych Sardynii (35, co stanowi 19% wszystkich 181) i Balearów (32 gatunki, 18% ogółu), natomiast najmniej na Wyspach Pelagijskich i wyspach Morza Marmara (w obu przypadkach jedynie dwa gatunki obunogów). Zaskakującym wynikiem jest niskie bogactwo gatunkowe pancerzowców w wodach słodkich Cypru (jedynie 9 gatunków), czego Autor nie tłumaczy niewielką liczbą badań na tej wyspie. Rozdział ten niewątpliwie należy ocenić bardzo pozytywnie. Z pewnością zgromadzenie i „przetrawienie” przez biologa bogatej literatury na temat niezmiernie skomplikowanej historii geologicznej regionu to niemal syzyfowa praca. Bardzo doceniam ten wysiłek Doktoranta, co ostatecznie umożliwiło mu poważne rozważania na temat związku bioróżnorodności pancerzowców z geologią poszczególnych wysp. Autor nie uniknął jednak paru pomyłek. Równonoga *Microcharon marinus*, który należy do rodziny Lepidocharontidae (Table S1) określił błędnie na str. 28 jako przedstawiciela rodziny Microcerberidae. Wymienione w tekście niektóre ogólne liczby taksonów oraz liczby taksonów stwierdzonych na niektórych wyspach nie pokrywają się z liczbami zamieszczonymi w tabelach 1.1 i S1. Łączne liczby rodzajów i rodzin podane na przykład na str. 54 wynoszą odpowiednio 50 i 26, natomiast w Table 1.1 widnieją liczby 51 i 27. Na stronie 28 podano trzy gatunki równonogów z Wysp Toskańskich, natomiast w Table S1 wymieniono cztery, a poza tym brak w Table S1 wymienionego na str. 28 gatunku *Tethysbaena argentari*. Podobna nieścisłość dotyczy ogólnej liczby pancerzowców z Wysp Maltańskich, 11 na stronie 32 versus 12 w Table S1. Poza tym, jeśli Table S1 to integralna część tego rozdziału, to ułatwiłbym czytelnikowi śledzenie wywodu Autora i odwołałbym się do niej w tekście gdzieś na początku, a nie dopiero na str. 35 przy

omawianiu pancierzowców Malty. Ciekaw jestem także, czy wszystkie zdjęcia zamieszczone na Fig.1.1 są autorstwa Doktoranta (nb. „wells” w podpisie do tej ryciny to nie „habitat”, powinno być raczej phreatic waters accessed through wells).

Chapter II przedstawia wyniki badań występowania i ewolucyjnej historii obunogów z rodzaju *Gammarus* w wodach słodkich sześciu Wysp Morza Egejskiego. Materiał stanowił 50 osobników zebranych z 13 stanowisk, włączając miejsca z kontynentalnej części Grecji. W analizach wykorzystano sekwencje dwóch markerów mitochondrialnego (COI i 16S rRNA) oraz dwóch jądrowego DNA (28S rRNA i EF-1-alpha). W datowanej rekonstrukcji filogenezy wykorzystano również prawie 60 sekwencji zdeponowanych w GenBanku i należących do różnych gatunków *Gammarus* z kontynentalnej Europy i z Kreta. Poza stwierdzeniem po raz pierwszy występowania i wykazaniem polifiletyzmu kielży *Gammarus* ex gr. *pulex* w wodach słodkich Wysp Morza Egejskiego oraz wydzieleniem na podstawie molekularnych metod delimitacji co najmniej trzech gatunków najprawdopodobniej nowych dla nauki, do pozostałych najważniejszych wyników przedstawionych w tej części rozprawy zaliczyć bez wątpienia należy powiązanie dywergencji obunogów oraz stopnia ich lokalnego endemizmu z historią geologiczną badanego regionu i wykazanie, że badane gatunki są pochodzenia kontynentalnego, co potwierdzałoby pierwszą z hipotez postawionych w celach rozprawy. Przekonuje mnie scenariusz, według którego przodkowie badanych gatunków zasiedlali wody śródlądowe płyty egejskiej, kiedy stanowiła ona część kontynentu (połączona z Bałkanami i Azją Mniejszą), a główna dywersyfikacja nastąpiła w środkowym miocenie ok. 12 mln lat temu w pierwszej fazie fragmentacji tej płyty, a następnie w pliocenie i plejstocenie dochodziło do ograniczonej dyspersji poprzez okresowo tworzące się połączenia lądowe między tworzącymi się wyspami i kontynentem. Niewyjaśnione pozostaje, w jaki sposób *Gammarus plaitisi*, do tej pory znany tylko z Kreta, a odkryty również na dwóch innych wyspach regionu, dostał się z tych wysp na Kretę, skoro nie udowodniono jak dotychczas występowania żadnych lądowych połączeń między tymi wyspami. Autor w tym przypadku stawia hipotezę o biernej dyspersji tego gatunku między omawianymi wyspami przy pomocy migrujących ptaków. Warto podkreślić fakt, że Autor widzi ograniczenia związane z przeprowadzonymi przez siebie badaniami (np. związane z wielkością materiału) i krytycznie odnosi się do interpretacji uzyskanych wyników. Takie podejście Doktoranta świadczyć może o jego dojrzałości jako badacza.

Chapter III przedstawia z kolei wyniki badań dotyczących zmienności genetycznej oraz historii ewolucyjnej trzech morfogatunków obunogów z rodzaju *Echinogammarus* występujących na Sycylii. Do badań Autor wykorzystał 174 osobniki zebrane z 44 stanowisk reprezentujących różne środowiska wód śródlądowych Sycylii oraz do porównania także osobniki innych gatunków pochodzące z Półwyspu Apenińskiego, Sardynii i Tunezji. Analizy zostały oparte o sekwencje trzech markerów, dwóch mitochondrialnych COI i 16S rRNA oraz jądrowego 28S rRNA. Do molekularnej delimitacji gatunków i wyróżnienia molekularnych operacyjnych jednostek taksonomicznych (MOTU) zastosowano szereg metod: Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), Barcode Index numer (BIN), model GMYC, mPTP oraz Patristic Distances. Relacje filogenetyczne między MOTU zobrazowano przy pomocy analizy sieciowej z algorytmem neighbour-net. W celu określenia geograficznych wzorców zróżnicowania molekularnego wykorzystano modele drzew generowane na podstawie sekwencji COI przy pomocy programu GenGIS. Do kalibracji datowanej rekonstrukcji filogenezy metodą wnioskowania bayesowskiego wykorzystano sześć dobrze zdefiniowanych w czasie sekwencji referencyjnych na podstawie danych literaturowych. Prawdopodobną geograficzną lokalizację przodków badanych gatunków ustalano przy pomocy Statistical Dispersal-Vicariance Analysis. Nie

mam żadnych zastrzeżeń do zastosowanej metodologii. Doktorant uzyskał niezmiernie ciekawe wyniki, z których na wyraźne podkreślenie zasługują następujące. Po pierwsze, Autor jako pierwszy stwierdził bardzo wysoką zmienność kryptyczną w obrębie każdego z trzech sycylijskich morfogatunków *Echinogammarus*. Biorąc pod uwagę najbardziej konserwatywną metodę delimitacji (ABGD), wykazano obecność dwóch MOTU u *E. tibaldii*, sześć MOTU u *E. adipatus* i zaskakująco aż 15 u *E. sicilianus*. Po drugie, odnotowano wyraźną korelację między przestrzennym występowaniem wyróżnionych MOTU i ich zróżnicowaniem genetycznym oraz historią geologiczną wyspy. Po trzecie, Doktorant udowodnił biogeograficzną heterogenność sycylijskich obunogów, wskazującą na odrębne w czasie epizody kolonizacji Sycylii przez każdy z gatunków. Najprawdopodobniej wspólny przodek wszystkich dzisiejszych gatunków różnicował się już w eocenie/wczesnym oligocenie, dużo wcześniej zanim doszło do kryzysu messyńskiego pod koniec miocenu, jednak dwa z badanych morfogatunków mają prawdopodobnie kontynentalne pochodzenie, natomiast trzeci, *E. sicilianus*, pochodzi od przodków zasiedlających wody morskie. Przyjęcie takiego scenariusza, czyli zróżnicowanych dróg kolonizacji Sycylii przez gatunki *Echinogammarus*, falsyfikowałoby drugą hipotezę postawioną w celach rozprawy. Moim zdaniem uzyskane wyniki zasługują na jak najwyższe uznanie.

Pracę zamyka niezmiernie bogaty spis zacytowanych publikacji, liczący kilkaset (!) pozycji oraz *Supplementary material* (sześć rycin i dwie tabele) i streszczenie w języku polskim. W tak obszernych zestawieniach wykorzystanych źródeł trudno zwykle ustrzec się przed popełnieniem błędów zapisu i recenzowana rozprawa pod tym względem niestety też nie jawi się jako chlubny wyjątek. Brak tu konsekwencji w zapisie nazwisk autorów publikacji: a) raz wymieniane są nazwiska wszystkich autorów, nawet jeśli jest ich np. 10 (np. Hsü et al. 1977), innym razem po trzech nazwiskach widnieje skrót „et al.” (np. Advokaat et al. 2014), a jeszcze w innym przypadku przed ostatnim nazwiskiem pojawia się wielokropek (np. Hupało et al. 2019), b) w niektórych przypadkach inicjały imion autorów zakończone są kropką i oddzielone od nazwisk przecinkiem, a nazwisko ostatniego autora poprzedzone jest znakiem „&”, w innych – nie (porównaj choćby wspomniane już prace Hsü et al. 1977 i Hupało et al. 2019). Brak konsekwencji użycia dywizu i myślnika (np. długość kreski rozdzielającej zakres stron publikacji) czy też stosowania znaków interpunkcyjnych oddzielających nazwę czasopisma od numeru tomu i zakresu stron (porównaj np. Advokaat et al. 2014 z Akyol et al. 2009). Dla niektórych pozycji podawany jest numer „doi” (np. Hsü et al. 1977), ale dla większości takiej informacji brak, czasem pojawia się numer zeszytu oprócz numeru tomu (np. Hupało et al. 2017), a czasem – nie (np. Hupało et al. 2019). Jeśli dodać wyjątkowe miejsca, gdzie nie zachowany jest porządek alfabetyczny (po pracy Argano & Pesce 1980 wymieniona jest praca Argano & Campanaro 2004), nazwy gatunków/rodzajów nie są wyróżnione pismem pochyłym (*Proasellus* w tytule pracy Arcangeli 1942) czy pojawiają się błędy w zapisie nazwisk („Gherardi” w pracy Hentonnen & Huner 1999 *versus* „Gheradi” w pracy Holdich et al. 1999), ta część pracy nie sprawia dobrego wrażenia po lekturze zasadniczych części pracy, które pozostawiają raczej dobre wrażenie na czytelniku. Całość bowiem napisana jest pod względem edycyjnym w miarę poprawnie (nie oceniam poprawności języka angielskiego) i tylko w niewielu miejscach wymaga korekty. Wymieniam tu dla przykładu niektóre niedociągnięcia: a) brak konsekwencji zapisu kilku publikacji cytowanych razem w tekście (gdzieniegdzie wymieniane prace są oddzielone średnikiem z przecinkiem między nazwiskiem i datą publikacji, natomiast w większości prace są oddzielone przecinkiem bez przecinka rozdzielającego nazwisko i datę, np. zapisy na str. 20) lub kolejność alfabetyczna zamiast chronologicznej (koniec pierwszego akapitu na str. 50), b) nieprawidłowe użycie kropki/przecinka w zapisach liczb (np. „10.000 species” zamiast

10,000 lub po prostu 10 000 species na str. 6), albo w końcu c) błędy literowe (z takimi chochlikami drukarskimi jak np. „baśni” zamiast „basins” na str. 9), użycia kroju czcionki (brak wytłuszczenia nazwy podrozdziału na str. 51, pismo pochyłe zamiast prostego – „Botosaneanu,” na str. 46 lub odwrotnie – „Sarthrogammarus” na str. 95) czy też powtórzenia („ca. ca.” str. 42 lub cały akapit – str. 72 i 74-75).

Jeśli chodzi o „Supplementary material”, mam uwagę dotyczącą zbyt dużego zmniejszenia niektórych rycin (Fig.S2, Fig.S5), przez co niektóre fragmenty nie są dostatecznie czytelne. Z kolei opis tabel powinien znajdować się powyżej, a nie pod nimi. Ma to szczególnie znaczenie w przypadku Table S1, która „ciągnie się” przez sześć stron i dopiero, jak zajrzemy na koniec, to dowiemy się, co prezentuje. Chciałbym jednak podkreślić, że są to uwagi krytyczne dotyczące jedynie formy, a nie treści, które łatwo poprawić lub wyeliminować, i które nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej pracy.

Konkludując, rozprawa doktorska Pana mgr. Kamila Hupała stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz dowodzi, że kandydat ma zarówno umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, jak i posiada szeroką wiedzę teoretyczną z zakresu taksonomii integratywnej oraz filogeografii i filogenetyki. Każdy z trzech zasadniczych rozdziałów (*Chapters I-III*) to w zasadzie trzy manuskrypty mające duże szanse na opublikowanie w renomowanych czasopismach. Wnoszę zatem do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Pana mgr. Kamila Hupała do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową otrzymanych wyników oraz ich duże znaczenie poznawcze dla zrozumienia genezy obecnego zróżnicowania przestrzennego i oceny ogólnej różnorodności świata zwierzęcego wód śródlądowych wysp Morza Śródziemnego, uważam, że oceniana praca doktorska zasługuje na wyróżnienie.



prof. dr hab. Tadeusz Namiotko

Gdańsk, dn. 12 września 2019 r.