



Dr hab. Mirosław Ślusarczyk, prof. UW
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

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Raczyńskiego pt. „**Wpływ interakcji antagonistycznych na cechy historii życiowych i fizjologicznych u ważek równoskrzydłych (Odonata, Zygoptera)**”.

Adaptacje strategii życiowych organizmów do warunków środowiskowych znajdują się w głównym nurcie badań autekologicznych. W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej Pan Raczyński analizuje oddziaływanie wybranych czynników abiotycznych (zróżnicowanej temperatury, symulowanej długości sezonu wegetacyjnego) oraz biotycznych (symulowanego drapieżnictwa, konkurencji wewnątrzgatunkowej o zasoby pokarmowe wzmocnionej przez kanibalizm), oraz kombinacji ww. czynników, na wybrane cechy fizjologiczne i osobnicze uznawane za wskaźniki dostosowania organizmów.

Badania zostały przeprowadzone na dwóch gatunkach ważek równoskrzydłych, wybranych do testów ze względu na odmienną specyfikę rozwojową, jako modelowe przykłady owadów dwuśrodowiskowych pochodzących z akwenów, znajdujących się na różnych szerokościach geograficznych, co było jednym z zagadnień analizy porównawczej.

W skład rozprawy wchodzi krótkie streszczenie przedmiotu badań w języku angielskim i polskim, zawierające kluczowe wyniki badań. Dalsze części zostały napisane w języku angielskim: słowniczek wybranych terminów biologicznych; wstęp do badań; główne cele i hipotezy badawcze; prezentacja zwierząt eksperymentalnych; mapa rozmieszczenia siedlisk, skąd pochodziły zwierzęta testowe; główne wnioski płynące z przeprowadzonych badań oraz spis literatury wykorzystywanej we wstępnej części rozprawy. Trzon rozprawy doktorskiej stanowią 4 wieloautorskie artykuły naukowe zrealizowane w kooperacji z wybitnymi odonatologami krajowymi i zagranicznymi, opublikowane w latach 2020-2022 w recenzowanych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie SCIE, zawierające dokładny opis metodyki badawczej, wyniki i ich dyskusję. Praca doktorska zawiera ponadto deklaracje wkładu wszystkich współautorów w powstanie ww. artykułów, z których wynika, że doktorant brał udział w planowaniu, realizacji, analizie i interpretacji wyników eksperymentów, a jego wkład w powstaniu ww. prac wynosił od 30 do 65%.

Art. 187. 1. Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce przewiduje, że “Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej”, ale nie definiuje o jaki stopień samodzielności pracy naukowej chodzi. Przedstawiona do recenzji rozprawa nie jest, jak mniemam, efektem oryginalnego pomysłu badawczego doktoranta (a takie prace cenię najwyżej), a jak to obecnie najczęściej bywa, pomysłodawcą badań prawdopodobnie był promotor, który zwykle zapewnia finansowanie badań. Proszę mnie wyprowadzić z błędu jeśli się mylę. Tematyka recenzowanej pracy doktorskiej wydaje się kontynuacją wcześniejszych badań promotora nad adaptacjami strategii życiowych larw ważek do lokalnych warunków środowiskowych w akwenach położonych na różnych szerokościach geograficznych. Nowym aspektem prac badawczych wchodzących w skład recenzowanej rozprawy (w porównaniu do wcześniejszych prac promotora) jest analiza wpływu antagonistycznych oddziaływań biotycznych, tj. symulowanej presji drapieżniczej ze strony ryb oraz konkurencji wewnątrzgatunkowej, wzmacnianej przez oddziaływania kanibalistyczne, na strategię życiowe badanych zwierząt, w gradiencie warunków środowiskowych, panujących na różnych szerokościach geograficznych.

Format rozprawy doktorskiej Pana Raczyńskiego (zbiór prac opublikowanych w recenzowanych czasopiśmie międzynarodowych) zwalnia mnie z obowiązku poszukiwania drobnych uchybień formalnych, błędów edytorskich i podobnych niedoskonałości, które zostały usunięte w procesie recenzji wydawniczych. Z recenzenckiego obowiązku, starałem się znaleźć ewentualne niedociągnięcia, które wymieniam poniżej, przy omawianiu poszczególnych prac, a które doktorant mógłby skomentować podczas obrony.

Wszystkie cztery artykuły opisują badania opierające się na podobnym schemacie metodycznym, wykorzystywanym wcześniej wielokrotnie przez promotora. Wszystkie mają charakter wielodniowych eksperymentów laboratoryjnych, których wstępną fazą było pozyskanie zwierząt na wczesnym etapie rozwoju ontogenetycznego (zapłodnionych jaj ważek) z kilku siedlisk położonych na podobnych lub różnych szerokościach geograficznych (w zależności od postawionych pytań badawczych). Zwierzęta testowe poddawano okresowemu oddziaływaniu różnych czynników sygnałnych (takich jak foto lub termoperiod, chemiczne ślady obecności ryb) lub eksponowano na oddziaływanie zróżnicowanych warunków środowiskowych (termicznych) symulujących przebieg procesów fenologicznych, zachodzących w ich natalnych lub porównywanych siedliskach. W trakcie eksperymentu

mierzono wybrane cechy osobnicze (tempo rozwoju lub przyrostu masa ciała, długość życia) i fizjologiczne (stężenie białek, tłuszczów, aktywność wybranych enzymów) eksperymentalnych zwierząt, by następnie przeprowadzić krzyżową analizę porównawczą wpływu kontrolowanych czynników na wartość mierzonych parametrów.

Skomplikowane układy eksperymentalne oraz mnogość mierzonych parametrów czynią analizę wyników badań wymagającą i czasem trudną w interpretacji. Istotnym zmianom jednych parametrów, nie zawsze towarzyszyły oczekiwane zmiany innych. Im więcej parametrów poddaje się analizie, tym łatwiej o przypadkowe relacje pomiędzy mierzonymi parametrami. Na szczęście zrozumienie układu eksperymentalnego ułatwiają znakomite i estetyczne schematy procedur badawczych w pierwszych trzech publikacjach. Niestety, czwartej publikacji nie towarzyszył analogiczny schemat metodyczny.

W pierwszym, wchodzącym w skład rozprawy artykule, badacze testowali u ważek *Ischnura elegans* wielkość i trwałość oczekiwanych efektów okresowego kontaktu z chemicznymi śladami obecności drapieżników (ryb) w środowisku. Zwierzęta eksperymentalne pochodziły z pojedynczego zbiornika wodnego, mieszczącego się w okolicach Krakowa.

Ekspozycja na chemiczne ślady drapieżnictwa ryb spowolniła tempo wzrostu ciała i rozwoju osobniczego oraz zwiększyła śmiertelność eksperymentalnych zwierząt.

Prosiłbym o uściślenie, bo nie znalazłem tej informacji w pracy, jak długo trwał pierwszy i drugi etap ekspozycji zwierząt na kairomony, w świetle obserwacji wskazującej na słabszy efekt wczesnego kontaktu z kairomonem, w porównaniu z kontaktem późniejszym.

Po przeczytaniu streszczenia wyników tego eksperymentu umieszczonego we wstępnej części rozprawy, czytelnik może mieć kłopot w zrozumieniu powodów obserwowanych reakcji zwierząt eksperymentalnych na kairomony; dlaczego sygnały oddrapieżnicze wykorzystywane przez ofiary zwiększają ich śmiertelność i opóźniają tempo dojrzewania, zamiast im pomagać i zwiększać ich dostosowanie. W streszczeniu zabrakło określenia obserwowanych efektów mianem “kosztów reakcji obronnych”, które czynią interpretację wyników doświadczenia zrozumiałą, jako rezultat przedsięwziętych mechanizmów obronnych przez zwierzęta eksperymentalne, a które choć kosztowne, “mają na celu” ograniczenie terminalnych skutków oddziaływania drapieżnika w środowisku. O ile w streszczeniu zabrakło wyjaśnienia tego zjawiska, w samym artykule przyczyny ww. reakcji są poprawnie zinterpretowane. Prosiłbym o zwrócenie na to uwagi podczas obrony.

Zdziwił mnie nieco sposób karmienia ryb w pierwszym i trzecim eksperymencie. Osobiście karmiłbym je, przynajmniej częściowo ważkami, żeby zwiększyć prawdopodobieństwo wystąpienia spodziewanych efektów u eksperymentalnych zwierząt. **Proszę o wyjaśnienie czy substancje alarmowe pochodzące z ciał zranionych ofiar tego samego lub pokrewnego gatunku pełnią jakąś rolę w rozpoznaniu skali zagrożenia ze strony drapieżników u badanych ważek.**

W drugim eksperymencie porównywano efekty zróżnicowanego czasu zakończenia spoczynku na parametry świadczące o dostosowaniu osobników innego gatunku ważek równoskrzydłych (*Lestes sponsa*), o jednorocznym cyklu życiowym, pochodzących z kilku zbiorników wodnych, położonych na dwóch różnych szerokościach geograficznych (środkowo i północnoeuropejskich, dla uproszczenia nazwanych przeze mnie południowymi i północnymi). W eksperymencie laboratoryjnym symulowano rodzime lub obce dla zwierząt testowych warunki klimatyczne, cechujące się odmienną długością sezonu wegetacyjnego. Wcześniejszy, kontrolowany przez badaczy, rozwój pierwszej kohorty ważek, zapewnił im silną przewagę konkurencyjną w konfrontacji z osobnikami drugiej kohorty, opóźnionej w rozwoju o 2 tygodnie, które były kanibalizowane przez starsze, więc większe osobniki. Silny efekt pierwszeństwa ujawnił się w każdej testowanej populacji, niezależnie od miejsca ich pochodzenia, trochę wbrew oczekiwaniom eksperymentatorów, spodziewających się silniejszego efektu pierwszeństwa wśród ważek testowanych w warunkach symulujących północną ich lokalizację (limitowanych czasem w warunkach naturalnych w silniejszy sposób niż w lokalizacjach południowych).

Podczas lektury pracy zdziwił mnie sposób karmienia zwierząt eksperymentalnych, przy użyciu obcych dla eksperymentalnych ważek, słonowodnych skorupiaków z rodzaju *Artemia*. Rozumiem, że pokarm ten jest wygodny w użyciu, ale ma sporo wad. Po pierwsze jak wspomniałem, ważki nie spotykają tego gatunku w swoim środowisku. Po drugie, o ile mi wiadomo, słonowodna *Artemia* nie jest w stanie przeżyć w wodzie o niskim zasoleniu dłużej niż kilkanascie godzin, co przy jednodniowej częstotliwości karmienia mogło powodować niedożywienie zwierząt eksperymentalnych (o czym mogą świadczyć wyniki badań) i w efekcie potęgować zachowania kanibalistyczne, silniejsze być może niż w naturalnym środowisku. Po trzecie, eksperymentatorzy powinni unikać niepotrzebnego cierpienia nie tylko zwierząt eksperymentalnych, ale też zwierząt używanych jako pokarm. **Być może, gdyby zwiększono częstotliwość karmienia przy użyciu *Artemia* lub lepiej, gdyby użyto naturalnego pokarmu tych zwierząt (np. skorupiaków słodkowodnych lub larw**

ochotkowatych), obserwowane efekty pierwszeństwa okazałyby się słabsze i mogłyby ujawnić się poszukiwane różnice pomiędzy testowanymi populacjami z południa i północy. Proszę o komentarz do tej sugestii podczas obrony i informację dotyczącą względnych preferencji pokarmowych ważek w stosunku do osobników własnego i innych gatunków.

Dostrzegam pewien błąd metodyczny w realizacji drugiego eksperymentu, który moim zdaniem utrudnia (czy wręcz uniemożliwia poprawną) analizę wpływu różnic klimatycznych, wynikających z miejsca pochodzenia populacji zwierząt testowych. Poprawna analiza tego zagadnienia wymagałaby co najmniej trzech zbiorników pochodzenia eksperymentalnych zwierząt na każdej porównywanej szerokości geograficznych. Warunek ten nie został spełniony, a więc analiza wpływu szerokości geograficznej na mierzone parametry była moim zdaniem nieuprawniona, a model statystyczny prawdopodobnie nieprawidłowo zdefiniowany.

W trzecim eksperymencie analizowano efekty oddziaływania kombinacji czynników testowych wykorzystanych w pierwszym i drugim eksperymencie z wykorzystaniem ważek *Ischnura elegans*, pochodzących z pojedynczego stawu zlokalizowanego w okolicach Krakowa. Zróżnicowane wiekowo dwie kohorty ważek tego samego gatunku przetrzymywano osobno lub razem w temperaturze 22 lub 26°C, w poszukiwaniu wpływu prognozowanego ocieplenia (modnego obecnie zagadnienia) i efektów interakcji międzygatunkowych (symulowanego drapieżnictwa ryb) i wewnątrzgatunkowych (konkurencji i kanibalizmu) na parametry osobnicze i fizjologiczne zwierząt testowych. Tym razem ważki karmione były dwa razy dziennie, znów przy użyciu słonowodnych *Artemia salina*. Podobnie jak w pierwszym eksperymencie zaobserwowano zwiększoną śmiertelność zwierząt w wariantach z kairomonami ryb, choć efekt ten był słabszy niż w pierwszym eksperymencie. Podobnie jak w poprzednim eksperymencie wymuszone różnice wieku testowanych osobników spowodowały efekty kanibalistyczne. O ile wyższa temperatura zwiększyła tempo rozwoju i wzrostu masy ciała i zmniejszyła wielkość dojrzałych osobników, nie nasiliła, wbrew oczekiwaniom, efektów oddziaływań biotycznych. **W obu wariantach termicznych zastosowano taką samą ilość pokarmu, choć zapotrzebowanie energetyczne zwierząt w wyższej temperaturze było zapewne wyższe. W naturze wzrost temperatury powoduje zazwyczaj wzrost produktywności środowisk, a więc większą podaż dostępnego pokarmu. Czy osobniki w wariacie z wyższą temperaturą nie**

powinny być więc karmione intensywniej niż w niższej temperaturze? Jaki mogłoby to przynieść efekt?

W czwartym, najdłuższym eksperymencie, testowano wpływ terminu rozpoczęcia aktywności życiowej w sezonie (wczesny vs. późny) przez eksperymentalne zwierzęta oraz zróżnicowanej temperatury (średnia vs. wysoka), na tempo rozwoju zwierząt i inne cechy osobnicze i fizjologiczne ważek *Ischnura elegans* o dwu lub trzyletnim cyklu życiowym, w symulowanym, w warunkach laboratoryjnych, okresie 3 sezonów wegetacyjnych. Zwierzęta eksperymentalne pochodziły z dwóch zbiorników wodnych z okolic Upsali w Szwecji. Podobny, tym razem, wiek zwierząt w obrębie kohort eksperymentalnych, nie spowodował efektów kanibalistycznych. Wyższa temperatura, tak jak w poprzednich eksperymentach, przyspieszyła tempo rozwoju i co charakterystyczne, skróciła cykl rozwojowy części eksperymentalnych zwierząt z 3 do 2 sezonów oraz, co dziwniejsze, ujawniła różnice w mierzonych parametrach fizjologicznych, których nie obserwowano we wcześniejszych eksperymentach.

Podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach zastosowano stałą podaż pokarmu niezależnie od zastosowanej temperatury i liczby eksperymentalnych zwierząt (co moim zdaniem było nieco niefortunnym zabiegiem, który mógł wpłynąć na wyniki eksperymentu i jego interpretację). Niezrozumiałym efektem w tym eksperymencie wydaje się brak wpływu temperatury na tempo przyrostu masy zwierząt eksperymentalnych, który obserwowano w poprzednich eksperymentach.

Nie jest dla mnie jasne czy zimą w “okresie spoczynku” ważki wykazują aktywność pokarmową i czy mogą wówczas zwiększać swoją masę. Jeśli tak, to zastosowany zabieg skrócenia okresu drugiej symulowanej zimy z kilku tygodni do kilku dni, mógł wpłynąć na obliczenia tempa wzrostu masy ciała zwierząt w różnych temperaturach.

Jestem ponadto ciekawy zdania doktoranta czy różnice parametrów fizjologicznych (np. koncentracji tłuszczów, białek, czy aktywności enzymatycznej), które ujawniają się w jednym, ale nie ujawniają się w innych eksperymentach, mogą być wiarygodnym wskaźnikiem dostosowania zwierząt eksperymentalnych i czy warto je śledzić?

Pomimo wymienionych mankamentów, których trudno się ustrzec w badaniach eksperymentalnych (bo któż nie popełnia błędów), wysoko oceniam warsztat metodyczny przeprowadzonych badań, wagę pytań badawczych i uzyskanych wyników.

W konkluzji stwierdzam z całym przekonaniem, że dysertacja Pana mgr Raczyńskiego spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 9 maja 2023 r.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Słomka', is written over a faint, circular official stamp.