



Warszawa, 19.05.2017 r.

Dr hab. Zbigniew Borowski, prof. IBL
Zakład Ekologii Lasu
Instytut Badawczy Leśnictwa
Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3
05-090 Raszyn

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Marty Heleny Czernik

„Analiza molekularna zimowej diety łośnia, jelenia szlachetnego i sarny europejskiej w Polsce”

Formalne aspekty rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska powstała pod opieką prof. dr hab. Mirosław Ratkiewicza, w Zakładzie Zoologii Molekularnej Uniwersytetu w Białymstoku. Część analiz dotyczących sekwencjonowania wielkoskalowego (ang. next generation sequencing, NGS) prowadzona była we współpracy z Prof. Pierre Taberletem w Laboratoire D'Ecologie Alpine w Grenoble we Francji. Prace zawarte w rozprawie finansowane były z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznanego Profesorowi Mirosławowi Ratkiewiczowi, grantu Uniwersytetu w Białymstoku przyznanego doktorantce oraz z projektu „Stypendia dla doktorów województwa podlaskiego.

Rozprawa napisana jest w języku polskim, ma formę maszynopisu i klasyczny dla rozpraw doktorskich układ: streszczenie napisane w języku polskim i angielskim poprzedza ogólny wstęp wraz z celami badań. Rozdział materiał i metody zawiera charakterystykę badanych gatunków, opis terenu badań, wykonane analizy genetyczne, zastosowaną statystykę, ocenę dostępności bazy żerowej oraz opis metod zastosowanych do oszacowania zimowych preferencji pokarmowych trzech badanych gatunków jeleniowatych. Zawiera też krótką informację odnośnie korelacji liczby tropów trzech badanych gatunków jeleniowatych, które jednak nie były pracą wykonaną przez doktorantkę. Nie posiadają też dokładnego opisu zastosowanych metod na podstawie których można by wnioskować o poprawności (bądź nie) zastosowanej metodyki, a co za tym idzie otrzymanych wyników. Kolejne rozdziały – wyniki - liczą 15 stron, dyskusja - 17 stron, a ostatni rozdział – wnioski opisany jest na 1 stronie. Rozprawa liczy łącznie 127 stron, zawiera 14 tabel i 10 rycin i cytuje 193 pozycje literatury, zarówno polskie jak i zagraniczne.

Ocena naukowego znaczenia rozprawy

Teoria wykorzystania zasobów w różnorodnym zgrupowaniu kopytnych jest dobrze znana i stwierdza, że masa ciała (Gordon i Illius 1996) oraz morfo-fizjologiczne adaptacje (Claus i inni

2008) są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za zmienność w wykorzystaniu zasobów przez różne gatunki. Bardzo wyraźny rozdział zasobów pokarmowych występuje wtedy, gdy pędożercy zjadają roślinność drzewiastą i zioła, a trawożercy trawy. W obrębie każdej z tych gildii masa ciała wskazywana jest jako czynnik modyfikujący wykorzystanie zasobów. Małe gatunki ograniczone są do pobierania porcji pokarmu o wysokiej jakości, podczas gdy duże gatunki mogą przeżyć pobierając większe ilości pokarmu o niskiej jakości. Hipoteza ta jednak wciąż wymaga empirycznej weryfikacji, szczególnie w strefie umiarkowanej, gdzie zgrupowania kopytnych są zdominowane przez pędożerców zasiedlających ekosystemy leśne lub w dużym stopniu zalesione. Poza poznawczym, zagadnienie to ma także praktyczny aspekt, duże kopytne są najczęściej gatunkami łownymi, w dużym stopniu modyfikującymi zarówno ekosystemy leśne, jak również pola uprawne. Dlatego poznanie stopnia wykorzystania zasobów przez trzy rodzime gatunki jeleniowatych: jelenia, sarnę i łosia pozwoli nie tylko na poznanie konkurencji międzygatunkowej, lecz także wskaże, które zasoby w jakim stopniu wykorzystywane są przez poszczególne gatunki i jaką rolę odgrywają w gospodarce leśnej. Pomimo, iż w literaturze istnieje wiele prac analizujących pokarm zjadany przez jeleniowate, to jednak niewiele z nich porównuje dietę kilku gatunków na tym samym terenie. Ponadto, w prowadzonych dotąd badaniach nad dietą kopytnych stosowano bardzo żmudne i mało dokładne metody, jak choćby obserwacje bezpośrednie, tropienia na śniegu i obserwacje zgryzanych drzew, testy wyboru prowadzone w zagrodach lub najczęściej stosowaną analizę treści żwaczy. W Polsce, badania nad pobieraniem pokarmu przez jeleniowate nie są zagadnieniem nowym, gdyż prowadzone były dość intensywnie w latach 60-tych, 70-tych i 80-tych ubiegłego wieku. Można by się zapytać zatem, w jakim celu po raz kolejny po 70 latach prowadzi się kolejne badania nad dietą kopytnych, przecież od dawna wszystko już wiadomo? Otóż nic bardziej mylnego, przede wszystkim w/w metody są dość nieprecyzyjne, badania nad każdym z gatunków prowadzono w odrębnych, różnych środowiskach przy znacznie niższych zagęszczeniach jeleniowatych (często 10 krotnie), niższej żyzności siedlisk i niższej dostępnej bazie pokarmowej. Ale największym walorem tej pracy jest zastosowanie nowoczesnej i bezinwazyjnej metody wykorzystania DNA zawartego w kale do oszacowania diety trzech w/w gatunków jeleniowatych. Dlatego przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest pod tym względem unikatowa.

Cele badań postawione przez doktorantkę były następujące:

- 1) Charakterystyka zimowej diety łosia, sarny i jelenia bytujących w dolnym basenie doliny Biebrzy.
- 2) Porównanie zimowej diety łosi bytujących w trzech różnych ostojach tego gatunku w Polsce: w Biebrzańskim Parku Narodowym, Kampinoskim Parku Narodowym i Poleskim Parku Narodowym.
- 3) Porównanie zmienności zimowej diety łosi nad Biebrzą pomiędzy trzema analizowanymi zimami w latach 2011 – 2014.

Do najważniejszych zalet zastosowanego w rozprawie podejścia badawczego należą:

- 1) Wykorzystanie najnowszej metody metabarcodingu DNA do analizy diety trzech sympatrycznych gatunków jeleniowatych: jelenia, sarny i łosia, dzięki czemu udało się zebrać unikalne informacje odnośnie preferencji pokarmowych w/w gatunków.
- 2) Oszacowanie dostępnej bazy żerowej, dzięki czemu możliwe było wykazanie preferencji pokarmowych i interakcji międzygatunkowych.
- 3) Porównanie metody jakościowej, która opierała się na reakcji PCR z dwoma uniwersalnymi starterami g i h z metodą DNA metabarcodingu, co wykazało istotną korelację tych dwóch metod wskazującą na ich wiarygodność i wzajemne uzupełnianie się.
- 4) Analiza preferencji pokarmowych łosi w okresie zimowym w trzech głównych ostojach tego gatunku w Polsce, w Biebrzańskim Parku Narodowym, Kampinoskim Parku Narodowym i Poleskim Parku Narodowym. Badania te pozwoliły na przetestowanie hipotezy odnośnie plastyczności pokarmowej tego gatunku.

Autorka wykazała, że badane jeleniowate odżywiały się tymi samymi gatunkami roślin i miały przynajmniej 9 wspólnych ważnych zasobów, a sosna zwyczajna była podstawowym źródłem pożywienia tych zwierząt.

Reasumując, rozprawa Pani Marty Czernik za pomocą ciekawie zaplanowanych badań, zastosowania nowoczesnych technik molekularnych, szerokiego zakresu prac oraz zebrania olbrzymiego empirycznego materiału, w unikatowy sposób analizuje zależności troficzne występujące pomiędzy trzema rodzimymi gatunkami jeleniowatych: jeleniem, sarną i łosiem.

Uwagi krytyczne pytania i wątpliwości

Moim zdaniem w streszczeniu znalazły się niepotrzebnie informacje z metodyki badań oraz charakterystyki gatunków. W związku z czym nie czyta się go łatwo tzn. jednym tchem. Ponadto autorka zawarła stwierdzenia nie wynikające z jej badań (mam wrażenie, że nie wynikające z żadnych badań) odnośnie zimowych trzebieży w drzewostanach.

Po przeczytaniu wstępu odniosłem wrażenie, że jest on napisany nieco chaotycznie, być może ze względu na zawarcie w nim informacji o badanych gatunkach, które powinny znaleźć się w metodyce, w opisie obiektów badań. Brakuje w nim także krótkiego podsumowania jak zastosowana do analizy diety jeleniowatych metoda może wpłynąć na otrzymane wyniki.

Zebrany materiał do badań jest stosunkowo niewielki, stanowi bowiem łącznie 193 próby zebrane od wszystkich trzech gatunków w latach 2011-2014. Co daje po kilka (min. 7) lub kilkanaście (max. 23) prób na gatunek na konkretny okres zimowy.

Wydaje się nielogiczny brak analiz DNA przyporządkowujących pobrane próby do konkretnych osobników. Jest to o tyle ważne, że nie mamy pewności, czy zebrane próby nie

pochodziły od tych samych osobników co mogłoby mieć istotny wpływ na otrzymane wyniki (pseudoreplikacja).

W metodach badań brakuje dokładnego opisu zbioru prób, jest to jedna z ważniejszych informacji, gdyż zastosowana metodyka zbioru prób pływa na uzyskane wyniki i wyciągnięte na ich podstawie wnioski. Nie wiemy więc, czy zbiór pelletów odbywał się w punktach losowych, w siatce kwadratów, na transekcie, czy też był arbitralnie wybrany przez doktorantkę. Brak jest informacji na jakim terenie/powierzchni zbierane były pellety, jakie to było środowisko (środowiska) i czy znajdowały się tam pellety trzech analizowanych gatunków. Warto by było także oszacować liczbę pelletów sarn, jeleni i łosi na powierzchnię i opisać strukturę środowiska, co z kolei pomogłoby w interpretacji interakcji międzygatunkowych i zachodzenia na siebie nisz środowiskowych badanych zwierząt.

Opis roślinności zdrewniałej wykonany był latem 2014 (niestety nie wiadomo w jakim miesiącu), podczas gdy analizowane próby pelletów pochodziły z zim 2011/2012, 2012/2013 i 2013/2014, a trzeba pamiętać, że niektóre gatunki drzew, jak np. brzoza, topola lub wierzba mogą w trakcie jednego sezonu wegetacyjnego przyrosnąć ponad 1m, co wpłynąć może na szacowaną dostępność zasobów pokarmowych. Wydaje się, iż na podstawie procentu pokrycia terenu roślinnością w okresie letnim nie można precyzyjnie oszacować dostępności bazy żerowej w okresie zimowym. Przede wszystkim niezbędne są takie pomiary drzew jak: wysokość i pierśnica przeprowadzone na pewnej powierzchni. Da to możliwość przeliczenia liczby drzew i ich pierśnicy na powierzchnię. Chciałbym także zauważyć, iż jelenie, sarny i łosie żerują na drzewkach od 20 cm wysokości (Nichols i inni 2014), a doktorantka uwzględniła w analizach roślinność drzewiastą od 50 cm wzwyż. Ponadto autorka nie ujęła bardzo ważnego zasobu jakim jest kora drzew zjadana chętnie przez jelenie i łosie.

Nie wiem niestety, dlaczego przy metodzie DNA metabarkodingu doktorantka pisze, że jest to metoda ilościowa. Na jej podstawie nie jesteśmy w stanie stwierdzić jaką ilość biomasy konkretnego gatunku (lub gatunków) drzewa została zjedzona przez dany gatunek zwierzyny. Tym bardziej, że różne gatunki mają zupełnie inną strawność. Na przykład niską strawnością charakteryzuje się jałowiec, sosna, świerk, w przeciwieństwie do gatunków liściastych.

W analizach statystycznych nie zostało wyjaśnione, czy uzyskane dane miały rozkłady pozwalające na zastosowanie metod parametrycznych. A jeżeli nie, to czy została wykonana transformata?

Nie rozumiem przedstawionej na str. 46 wyników interakcji pomiędzy liczbą tropów trzech badanych gatunków jeleniowatych. Co one mają pokazać?

Str. 47

Jeżeli brak jest istotności nie można napisać, że coś miało wyższą bądź niższą szerokość niszy.

Dyskusja

Nie ma niestety w literaturze jak dotąd żadnych danych potwierdzających, że metoda metabarkodingu DNA odzwierciedla rzeczywistą proporcję pobieranego pokarmu w diecie poszczególnych gatunków. Wskazują one jedynie, że istnieje taka możliwość o nieznanym błędzie, ale konieczne jest skalibrowanie tej metody na próbie kontrolnej (Thomas i inni).

2016). Cytowana przez doktorantkę praca norweskich badaczy analizujących diety dwóch gatunków gryzoni analizowaną metodą DNA barcodingu i analizy mikrohistologicznej wskazuje, że wszelkie jakościowe porównania pomiędzy tymi metodami powinny cechować się dużą ostrożnością. Jakościowa interpretacja wyników uzyskanych metodą DNA barcoding nie jest niestety prosta, między innymi ze względu na fakt, iż bazuje na chloroplastowym DNA. W związku z tym, gatunki, których tkanki bogate w chloroplast są częściej zjadane będą nadinterpretowane. Inna praca (Nichols i inni 2014) porównująca wyniki analizy diety sarn i danieli przeprowadzonej metodą DNA barcodingu i analizy żwaczy wskazuje, że mimo iż metoda DNA charakteryzuje się wyższą detekcją, pomijane są w niej niektóre grupy organizmów nie posiadających chloroplastowego DNA – jak grzyby oraz posiadające jak porosty i mszaki.

Mam także pytanie, które postawiła sobie w maszynopisie sama doktorantka: Dlaczego analizę ilościową przeprowadzono dysponując niską liczbą odczytów (od kilkudziesięciu do kilkuset), podczas gdy standardem jest liczba odczytów równa lub większa niż 1000?

Wyższy udział gatunków iglastych w składzie pokarmu saren w porównaniu do jeleni może wynikać także z faktu odmiennej strawialności tego pokarmu przez dwa w/w gatunki oraz poprzez zjedanie przez sarny innych, bogatych w chloroplastowe DNA tkanek tych samych roślin – np. jelenie zjadały korę, a sarny pędy i igły.

Na stronie 58 – autorka pisze:” Przy małej dostępności sosny (poniżej 3,8 %) preferencja łosi i saren względem sosny musi być bardzo duża skoro stanowiła ona średnio aż 40% ich żołądków” – jest to chyba przejęzyczenie, przecież autorka nie badała żwaczy tylko odchody .

Nie wiem niestety na jakiej podstawie doktorantka zakłada, że w Dolinie Biebrzy prowadzona jest w dużej skali gospodarka leśna polegająca na wykładaniu drzew wyciętych w trakcie zabiegów pielęgnacyjnych zwanych trzebieżami. O ile mi wiadomo, nic takiego w Nadleśnictwach Rajgród ani też Knyszyn nie ma miejsca, nie widziałem także tego typu działań na terenie BPN. Może warto się raczej zastanowić nad innym wytłumaczeniem otrzymanych wyników, niedoskonałość zastosowanej metody, błąd szacowania dostępności pokarmu etc.

Str. 59 – Naturalnie odnowienie sosny (nie odtworzenie) jest w dolinie Biebrzy możliwe i występuje, natomiast w związku z faktem, iż sosna jest gatunkiem światłożądnym nalot sosnowy obumiera w związku z brakiem światła i konkurencji innych gatunków drzew i krzewów.

Autorka pisze w dyskusji, że młodniki i uprawy sosnowe w dolinie Biebrzy są grodzone. Do roku 2017 zdecydowana większość upraw i młodników w Nadleśnictwie Rajgród była niegrodzona. Dopiero w tym roku to się zmieniło i rzeczywiście większość upraw została ogrodzona siatką.

W dyskusji napisane jest, że jałowiec i świerk mogą być pokarmem alternatywnym dla sosny, chociaż nie jest wykluczone, iż wysoki udział tych dwóch gatunków w odczytach wynikać może z ich niskiej strawialności lub pobieraniu przez jeleniowate tkanek bogatych w chloroplasty (co wydaje się oczywiste w przypadku jałowca).

Wniosek końcowy

Chciałbym podkreślić, iż wyżej wymienione niedociągnięcia i wątpliwości nie umniejszają wartości naukowej rozprawy i są w dużej części dyskusją otrzymanych wyników.

Podsumowując stwierdzam, iż przedłożona przez mgr Martę Helenę Czernik rozprawa doktorska zatytułowana „Analiza molekularna zimowej diety łośia, jelenia szlachetnego i sarny europejskiej w Polsce” jest oryginalnym i wnikliwym studium analizującym najnowszą zaawansowaną metodą zależności troficzne zachodzące pomiędzy trzema rodzimymi gatunkami jeleniowatych: jeleniem, sarną i łośiem. Dodatkowo autorka przeanalizowała także preferencje pokarmowe łośi w trzech głównych ostojach w Polsce. Być może z tekstu rozprawy nie wynika to wprost, ale doktoranta włożyła ogrom pracy w zebranie i przeanalizowanie danych. Oczywiście była to w części praca zbiorowa, ale trudno sobie wyobrazić samodzielną pracę o tak szerokim zakresie. Poza tym współpraca ta była dodatkową dobrą szkołą pracy zespołowej.

Rozprawa w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim przez obowiązujące w Polsce prawo dotyczące stopni (Ustawa z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Ustawa z dn. 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki). Wniosuję do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Marty Heleny Czernik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Ekologii Lasu

dr hab. Zbigniew Borowski

WPLYNĘŁO DO DZIEKANATU
Białystok, dnia 2.06.2017r.