



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Piotra Gadawskiego pt.: „Species diversity and origin of non-biting midges (Chironomidae) from a geologically young lake and its old spring system”, wykonanej w Katedrze Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. Michała Grabowskiego oraz dr. Matteo Montagny

Wstęp

Rodzina ochotkowate Chironomidae to bogaty w gatunki i szeroko rozprzestrzeniony takson muchówek. Grupa ze względu na swoją biomasę i różnorodność stanowi niezwykle ważny element słodkowodnych ekosystemów. W związku z tym jest obiektem licznych badań o różnorodnym profilu. Od lat utrudnieniem w tych badaniach są problemy taksonomiczne, co skutkowało m.in. równoległym funkcjonowaniem niezależnych systemów taksonomicznych dla postaci dorosłych i stadiów preimaginalnych (!). Sytuacja ulega stopniowej poprawie od momentu szerokiego wprowadzenia metod molekularnych. W ten nurt badawczy wpisuje się przedstawiona dysertacja, wzbogacona dodatkowo o zagadnienia z zakresu ekologii i biogeografii. Ze względu na różnorodność grupy, słabe zbadanie jej taksonomii, nikłe wcześniejsze rozpoznanie fauny w miejscu badań oraz konieczność integracji tradycyjnych i nowoczesnych metod badań przyjęty temat można uznać za ambitny.

Omówienie pracy

Rozprawa przygotowana w języku angielskim liczy 103 strony i jest uzupełniona przez suplementy obejmujące kolejnych 49 stron. Układ dysertacji odbiega od typowego i obejmuje ogólny wstęp podzielony na cztery podrozdziały, po którym znajdują się dwa oddzielne rozdziały mające wewnętrzną formę typowych prac eksperymentalnych z podziałem na wstęp, materiał i metody, wyniki i dyskusję. Następnie Doktorant przedstawia ogólną dyskusję i wnioski. Rozprawę zamyka spis publikacji. Dysertacja jest także zaopatrzona w streszczenia w języku polskim i angielskim. Układ pracy jest nieco zaskakujący, prawdopodobnie wynika z oczekiwanego opublikowania rozdziałów I i II („Chapter I i II”) jako oddzielnych prac naukowych.



Zrozumienie procesów decydujących o kształtowaniu bioróżnorodności jest kluczowe dla działań związanych z praktyczną ochroną przyrody. W początkowej części wstępu mgr Gadawski przedstawia problemy związane z oceną różnorodności biologicznej w różnych skalach przestrzennych. Szczególnym zainteresowaniem badaczy cieszą się tutaj obszary tzw. *biodiversity hot-spots* charakteryzujące się wyjątkowym poziomem zróżnicowania gatunkowego będącym m.in. wynikiem endemizmu. W tym miejscu Doktorant przekonująco uzasadnia podjętą problematykę badawczą. Przedstawia także cztery spójnie, jasno i zwięźle wyrażone cele szczegółowe rozprawy. W dalszej części wstępu zostały scharakteryzowane kolejno Jezioro Szkoderskie jako lokalny *hot-spot* i miejsce badań, rodzina Chironomidae jako przedmiot badań, zagadnienia dotyczące podstaw taksonomii integratywnej i barkodingu DNA. Cały wstęp jest napisany zwięźle, przejrzystym i zrozumiałym językiem. Nie ma tu często spotykanej w dysertacjach „nadpodaży” wiedzy podręcznikowej, co w mojej opinii jest zaletą ocenianej pracy.

Następny w kolejności rozdział ma już pełną strukturę publikacji naukowej i dotyczy bezpośrednio różnorodności i ekologii Chironomidae basenu Jeziora Szkoderskiego. Pomijam omówienie wewnętrznego wstępu i części rozdziału „Material and Methods” ze względu na powtórzenie części treści z wstępu ogólnego. Liczbę i rozmieszczenie stanowisk badawczych oraz opisane metody zbioru materiału z wykorzystaniem siatki entomologicznej, odłowów na światło i zbierania osobników z powierzchni wody oceniam jako prawidłowe i wystarczające do uzyskania reprezentatywnej materiały w kontekście głównych celów dysertacji. Doktorant wykonał ogromną pracę dokonując morfologicznej identyfikacji zebranego materiału (zebrał 8845 osobniki), słusznie posiłkując się konsultacjami z ekspertami w tej dziedzinie. Zastosowane metody analizy danych w kontekście zagadnień ekologicznych są aktualne i szeroko stosowane w pracach naukowych o podobnym profilu. Doktorant wykazał obecność 164 gatunków Chironomidae, z których aż 152 zostało po raz pierwszy wykazanych z basenu Jeziora Szkoderskiego. Większą liczbę gatunków uzyskano analizując egzuwia niż postacie dorosłe. Uzyskane wyniki wskazują na wyjątkowe bogactwo fauny Chironomidae Jeziora Szkoderskiego w zestawieniu z innymi europejskimi akwenami. Analizy ekologiczne wskazały na przybrzeżne, pokryte makrofitami części jeziora jako najbardziej różnorodne w kontekście fauny Chironomidae. Jednak wykonane analizy wskazały na temperaturę wody a nie obecność makrofitów jako czynnik determinujący zgrupowania Chironomidae.



Liczba gatunków ochotkowatych stwierdzona przez Doktoranta w basenie Jeziora Szkoderskiego okazała się też być jedną z najwyższych w zestawieniu z wynikami badań dla podobnych europejskich akwenów o dobrze opracowanej faunie tych muchówek. Podsumowując, uzyskane w tej części dysertacji wyniki są interesujące, oryginalne i stanowią ważny wkład do znajomości różnorodności Chironomidae w skali kontynentu. W mojej ocenie rozdział jest właściwie manuskryptem gotowym do wysłania do czasopisma w celu publikacji.

Kolejny rozdział („Chapter II”) ma także strukturę oddzielnego artykułu naukowego, tym razem dotyczącego zastosowania barkodingu DNA do oceny bioróżnorodności fauny Chironomidae basenu Jeziora Szkoderskiego. Ponownie pomijam omówienie części treści z wewnętrznego wstępu tego rozdziału, poruszanych już we wstępach ogólnym i do poprzedniego rozdziału. W przypadku tej części materiał do analiz został wzbogacony o kolejne stanowiska a także, co szczególnie ważne, o materiał larwalny. Łącznie do analiz włączono 770 okazów (399 larw, 371 samców). Izolacja DNA i jego amplifikacja zostały wykonane standardowymi metodami, dzięki którym w wyniku sekwencjonowania dla każdego z analizowanych osobników uzyskano sekwencję barkodową genu COI o długości 658 par zasad. W przypadku większych gatunków DNA izolowano z odnóży, w przypadku mniejszych całe okazy trawiono w odpowiednim buforze, tak aby chitynowe części ciała pozostały nieuszkodzone. Dzięki temu pozostawiono możliwość weryfikacji morfologii barkodowanych okazów. Sekwencje te zostały przy wykorzystaniu odpowiednich narzędzi informatycznych zestawione z odpowiadającymi sekwencjami dostępnymi dla europejskich Chironomidae w bazie BOLD (z podaną identyfikacją gatunkową). Analizy bioinformatyczne zostały wykonane przy wykorzystaniu aktualnych różnorodnego zestawu narzędzi (środowisko R, Best Close Match, PopART, Fabox DNA Collapser, MUSCLE i in.), adekwatnie do założonych zadań badawczych. Analizy wskazały na istnienie w zebranych materiale 165 klastrów BIN (Barcode Index Number) i 168 operacyjnych jednostek taksonomicznych OTU (Operational Taxonomic Units). Larwy poddano tylko analizie molekularnej, natomiast wśród barkodowanych samców wykazano obecność osobników należących do 76 odrębnych morfogatunków. Analizy bioinformatyczne sekwencji należących do samców wykazały odpowiednio 88 BIN i 91 OTU, co może wskazywać na konieczność dokładniejszej analizy cech morfologicznych w poszukiwaniu cech różnicujących prawdopodobnie dotąd nie zdefiniowane, odrębne



gatunki. Uzyskane rezultaty są znaczące: 65 uzyskanych klastrów BIN nie miało wcześniej swojego odpowiednika w bazie BOLD. Wśród nich zdecydowana większość była zgodna (56.6%) lub reprezentowana przez pojedyncze sekwencje (42.7%). Osiągnięty wysoki poziom zgodności w obrębie uzyskanych klastrów BIN jest pośrednio świadectwem solidnej pracy Doktoranta podczas identyfikacji gatunkowej materiału opartej na cechach morfologicznych. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką użyteczność barkodingu DNA w identyfikacji gatunkowej Chironomidae. Wskazują jednak także na konieczność wyznaczania progów granic międzygatunkowych zoptymalizowanych dla poszczególnych podrodzin. Takie działanie znacząco wpływa na wzrost efektywności barkodingu. Także ten rozdział także oceniam jako manuskrypt niemal gotowy do skierowania do redakcji czasopisma naukowego.

W następnych dwóch rozdziałach „General discussion” i „Conclusions” mgr Gadawski dyskutuje ogólnie uzyskane wyniki, odnosząc się do celów przedstawionych we wstępie. Dyskusja ta ma charakter podsumowania, z powtórzeniem i uwypukleniem najważniejszych zagadnień przedyskutowanych już w rozdziałach „Chapter I” i „Chapter II”. Zgadzam się z argumentacją Doktoranta, w mojej opinii wszystkie cztery cele rozprawy zostały zrealizowane. Niewątpliwe osiągnięcia pracy to; 1) wykazanie obecności 164 taksonów Chironomidae w basenie Jeziora Szkoderskiego, 2) przedstawienie ekologicznej charakterystyki zgrupowań tych muchówek na badanym obszarze, 3) opracowanie pierwszej biblioteki referencyjnej barkodów DNA dla Chironomidae tego obszaru, 4) oszacowanie efektywności barkodingu DNA dla europejskich Chironomidae, 5) umieszczenie w repozytoriach (BOLD, GenBank) 770 nowych sekwencji barkodowych należących do 75 morfologicznie zidentyfikowanych gatunków.

Dysertację zamyka obszerny, liczący aż 225 pozycji spis literatury. Literatura jest starannie dobrana i bezpośrednio dotyczy zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej.

Dołączone materiały dodatkowe („Supplements”) mają postać 10 tabel o zróżnicowanej wielkości (od 1 do 18 stron) zawierających wszystkie podstawowe dane związane z dysertacją a ze względu na dużą objętość nie włączone do rozdziałów „Chapter I” i „Chapter II”. Tutaj znajdziemy m.in. pełny spis stwierdzonych gatunków.



Uwagi

W dysertacji zwraca uwagę szeroki zakres badań wynikający z różnorodności badanej grupy, unikatowego charakteru badanego obszaru a przede wszystkim z zastosowania różnorodnych metod taksonomii integratywnej. Te elementy na równi z uzyskanymi wynikami decydują o oryginalnym i nowatorskim charakterze badań.

Z kolei nieco nużące dla czytelnika jest trzykrotne powtórzenie w dysertacji charakterystyki basenu Jeziora Szkoderskiego i ogólnej charakterystyki Chironomidae. Zbiornik ten ma niewątpliwie charakter lokalnego *hot-spot*, co wynika z badań innych grup organizmów i zostało potwierdzone przez Doktoranta. Zastanawiam się, czy w Jego opinii formy ochrony tego akwenu obowiązujące w czarnogórskiej i jak albańskiej części akwenu są wystarczające? Czy oba kraje prowadzą jakąś współpracę w tym zakresie? Jakie dodatkowe rozwiązania związane z praktyczną ochroną przyrody można tu zaproponować mając na uwadze badany takson?

Skutkiem badań jest opracowanie imponująco długiej listy gatunków dla badanego akwenu. Co zaskakujące, niemal brak tu gatunków endemicznych. Dlaczego basen Jeziora Szkoderskiego, mimo bogactwa fauny, nie ma własnych endemitów reprezentujących rodzinę Chironomidae?

Jak wspomniałem wcześniej, zastosowane metody analizy danych w kontekście zagadnień ekologicznych oceniam jako prawidłowe. Pewne wątpliwości budzi zastosowanie współczynników różnorodności, których kalkulacja opiera się na liczebności względnej gatunków. Czy sposób zebrania materiału pozwalał na wykonanie wiarygodnych analiz opartych na danych ilościowych?

W ramach dysertacji został opracowane samce, egzuwia i częściowo larwy. Jak bardzo na uzyskane wyniki może wpłynąć opracowanie pozostałej części pozyskanego materiału, głównie samic? Myślę tu głównie o analizach ekologicznych opartych na danych ilościowych oraz oczywiście ogólnej liczbie stwierdzonych gatunków.

Uzyskane wyniki wskazują na niezwykle dużą liczbę gatunków Chironomidae stwierdzonych w basenie Jeziora Szkoderskiego. Na ile porównywalne są tutaj wyniki badań innych akwenów? Doktorant częściowo dyskutuję tą kwestię, ale na ile ta wyjątkowo wysoka różnorodność nie jest artefaktem wynikającym z zastosowania bardzo efektywnej kombinacji metod zbioru materiału, nie stosowanej przez innych badaczy?



Doktorant wykorzystał głównie dane pochodzące z bazy BOLD. Baza ta posiada pewne wady dotyczące procesu weryfikacji identyfikacji gatunkowej deponowanych sekwencji i bywa krytykowana za znaczny procent danych pochodzących od błędnie oznaczonych okazów. Równie popularna (popularniejsza?) baza sekwencji GenBank została wykorzystana przez Doktoranta w mniejszym stopniu. Właściwie nie wiemy w jakim, ponieważ poza jedną wzmianką (Chapter II, Results and discussion: 3.3., str. 54) brakuje na ten temat informacji. Dlaczego przedstawione w dysertacji analizy zostały oparte przede wszystkim na zasobach bazy BOLD?

Chciałbym zaznaczyć, że żadna z powyższych uwag nie wpływa znacząco na moją bardzo dobrą ogólną ocenę pracy.

Podsumowanie

Podsumowując, chciałbym podkreślić duży wkład Doktoranta w poszerzenie wiedzy dotyczącej taksonomii molekularnej, ekologii i biogeografii europejskich Chironomidae. Praca ma całkowicie oryginalny charakter, ponieważ dzięki badaniom Doktoranta fauna Chironomidae basenu Jeziora Szkoderskiego, lokalnego *hot-spot*, doczekała się po raz pierwszy kompletnej, wieloprofilowej charakterystyki opracowanej przy wykorzystaniu nowoczesnych metod. Uważam, że mgr Piotr Gadawski 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 „Species diversity and origin of non-biting midges (Chironomidae) from a geologically young lake and its old spring system” spełnia kryteria rozprawy doktorskiej wynikającej z ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. Nr 65, poz. 595) i zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Ponadto, ze względu na wysoką jakość przedstawionej dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie (zgodne z regulaminem Jednostki).