

UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI



nejczer

INSTYTUT NAUK O ŚRODOWISKU



**WARSZTATY METODOLOGICZNE DLA
DOKTORANTÓW: EKOLOGIA EWOLUCYJNA**

RAPORT KOŃCOWY

13 – 18 kwietnia, 2015

SPIS TREŚCI

I.	PROWADZĄCY, RECENZENCI, UCZESTNICY	6
II.	TEMATY ZAPROPONOWANE PRZEZ UCZESTNIKÓW	8
III.	TEMATY WYBRANE I ICH PIERWOTNE TYTUŁY	9
IV.	PROJEKTY, RAPORTY I RECENZJE	10
1.	Eksperymentalne zbadanie funkcji łusek u węży	
	1.1 Pierwsza wersja projektu	8
	1.2 Recenzje	12
	1.3 Ostateczna wersja projektu	19
2.	Dorastanie w towarzystwie osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny	
	2.1 Pierwsza wersja projektu	25
	2.2 Recenzje	30
	2.3 Ostateczna wersja projektu	40
3.	Dlaczego ptaki połykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków	
	3.1 Pierwsza wersja projektu	47
	3.2 Recenzje	53
	3.3 Ostateczna wersja projektu	60
4.	Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki	
	4.1 Pierwsza wersja projektu	66
	4.2 Recenzje	71
	4.3 Ostateczna wersja projektu	80
5.	Wpływ zanieczyszczenia powietrza na stężenie flawonoidów w wegetatywnych i generatywnych organach poziomki pospolitej (<i>Fragaria vesca</i> L.)	
	5.1 Pierwsza wersja projektu	86
	5.2 Recenzje	91
	5.3 Ostateczna wersja projektu	102

PROWADZĄCY:

Dr hab. Joanna Rutkowska, Instytut Nauk o Środowisku UJ

RECENZENCI:

Dr hab. Paweł Brzęk, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Prof. dr hab. Mariusz Cichoń, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Dr hab. Joanna Kapusta, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Dr Beata Klimek, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Prof. dr hab. Adam Łomnicki, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Dr Zofia Prokop, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Dr Edyta Sadowska, Instytut Nauk o Środowisku UJ

UCZESTNICY:

Stanisław Bury, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Marta Czarnocka-Cieciura, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Anna Giermek, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Katarzyna Janas, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Elżbieta Jędrzejczak, Instytut Botaniki UJ

Paulina Koszyła, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Małgorzata Lipowska, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Agata Rożik, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Bartłomiej Zając, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Jakub Dębowski, Instytut Botaniki UJ

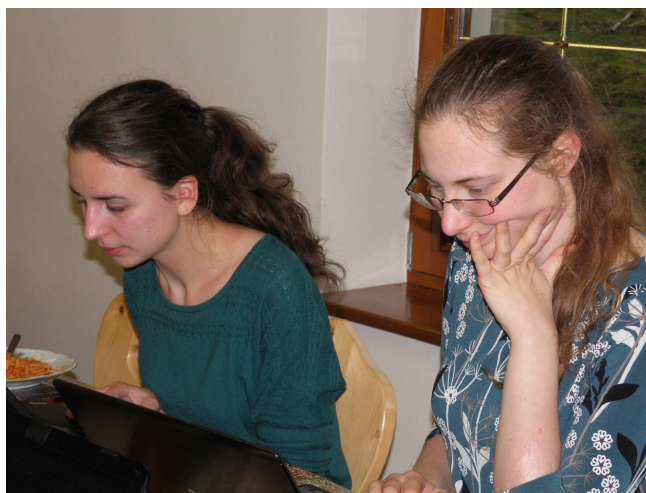
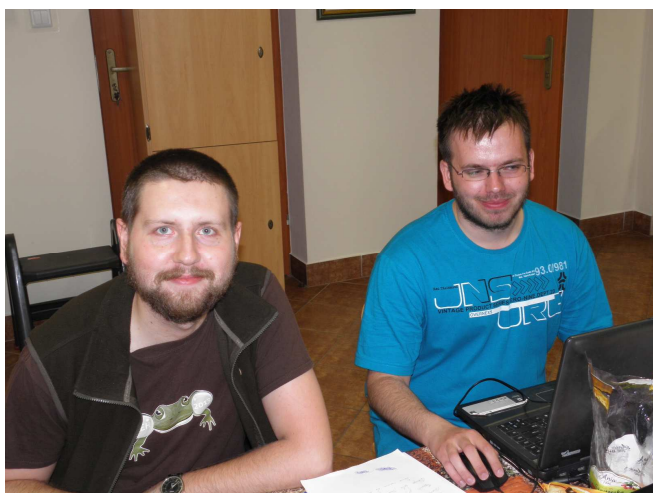
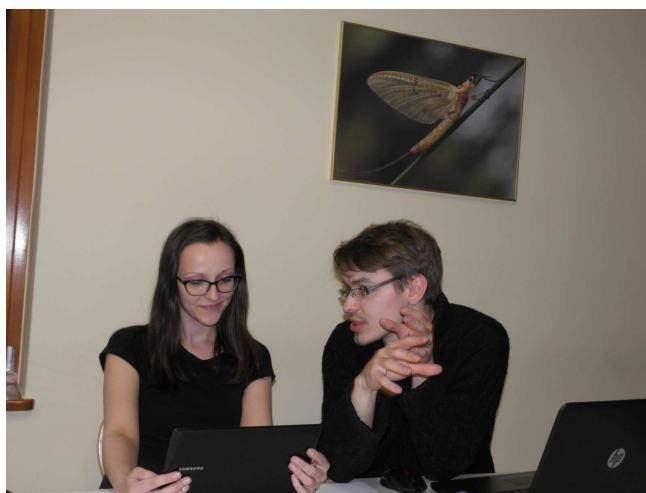
Jowita Niedojadło, Instytut Nauk o Środowisku UJ

AUTOR ZDJĘĆ:

Dr hab. Joanna Rutkowska, Instytut Nauk o Środowisku UJ

OPRACOWANIE:

Jakub Dębowski, Instytut Botaniki UJ



Rys. 1

Uczestnicy kursu Warsztaty Metodologiczne: Ekologia Ewolucyjna

TEMATY ZAPROPONOWANE PRZEZ UCZESTNIKÓW:

1. Czy zbieranie owocników grzybów stanowi dla nich zagrożenie? (M C-C)
2. Ekologiczne ograniczenia sposobu odżywiania Tyrannosaurusrex (M C-C)
3. Czy można rozpoznać emocje innych ludzi na podstawie ich zapachu? (M.C-C)
4. Po co węzom łuski? (S B)
5. Dlaczego niektóre salamandry plamiste są pasiaste? (SB)
6. Czy liczebność i preferencje pokarmowe żmii zygzakowatej zależą od liczebności gryzoni? (S B)
7. Wpływ pełni księżyca na jakość snu u ludzi (EJ)
8. Atrakcyjność miejskich form gołębia skalnego dla samic z terenów pozamiejskich (EJ)
9. Wpływ wypalania łąk na behavior mrówek (EJ)
10. Odrębność genetyczne populacji miejskich i zamiejskich gołębia grzywacza (ML)
11. Określenie źródeł adaptacji do osiągnięcia wysokiej wydolności tlenowej u psów różnych ras (M L)
12. Wpływ uwarunkowań socjalnych na nawyki żywieniowe i behawioralne młodych nornic (M L)
13. Czy ograniczenie dymorfizmu płciowego u pustułki jest związane z większą współpracą pary podczas polowania? (BZ)
14. Czy gastrolity wpływają na trawienie i metabolizm u kuraków?(BZ)
15. Czy opłaca się być melanistycznym? (BZ)
16. Olejki eteryczne stosowane w ochronie upraw a ich wpływ na zapylacze (AG)
17. Wpływ upraw medycznej marihuany na zwierzęta żyjące w ich otoczeniu (AG)
18. Wybór partnera ze względu na jego genetyczne predyspozycje do zachorowania na nowotwory (AG)
19. Wpływ zanieczyszczenia zbiorników wodnych kofeiną pochodzącą z oczyszczalni ścieków na cykl aktywności dobowej u rybitwy zwyczajnej (JN)
20. Zwiększenie częstotliwości kanibalizmu seksualnego u modliszki zwyczajnej wywołane zmianami w fotoperiodzie (JN)
21. Wiek odsadzenia od maciory a późniejsze zachowania socjalne prosiąt (JN)
22. Zmiany klimatyczne w ostatnim ćwierćwieczu w Europie a wielkość ciała ptaków (KJ)
23. Wydolność układu odpornościowego sikory bogatki w gradiencie zanieczyszczenia pyłem zawieszonym PM10 w aglomeracji krakowskiej i terenach przyległych (K J)
24. Długość telomerów a poziom heterozygotyczności w populacji głuźca z terenów Karpat Zachodnich i Białorusi (K J)
25. Identyfikacja mechanizmów ochrony i regeneracji uszkodzeń DNA u niesporczaków (P K)
26. Czynniki wpływające na zmniejszanie populacji bociana białego w Polsce (P K)
27. Sezonowa zmienność cech i występowania niesporczaków w zbiornikach wodnych (PK)
28. Wpływ użytkowania terenu na zasiedlanie przez gatunki inwazyjne roślin – jak zapobiec ich ekspansji? (J D)

29. Wpływ turystyki na przekształcenia środowiska naturalnego w obrębie obszarów chronionych (J D)
30. Wpływ stresorów chemicznych na występowanie białek alergicznych u roślin (J D)
31. Funkcja sygnałów socjalnych podczas rojenia nietoperzy (A R)
32. Czy zapasożycenie wpływa na wykorzystywanie schronień przez nietoperze? (A R)
33. Funkcja turkusowego ubarwienia padalców (A R)

TEMATY WYBRANE DO OPRACOWANIA:

4. Po co wężom łuski? (S B)
12. Wpływ uwarunkowań socjalnych na nawyki żywieniowe i behawioralne młodych normic (M L)
14. Czy gastrolity wpływają na trawienie i metabolizm u kuraków? (B Z)
23. Wydolność układu odpornościowego sikory bogatki w gradiencie zanieczyszczenia pyłem zawieszonym PM10 w aglomeracji krakowskiej i terenach przyległych (K J)
30. Wpływ stresorów chemicznych na występowanie białek alergicznych u roślin (J D)

PIERWOTNIE OBRANE TYTUŁY:

4. Funkcje łusek u węży (M C-C, A R)
12. Dorastanie w otoczeniu osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny. (M L, A G, P K)
14. Dlaczego ptaki połykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków. (B Z, S B)
23. Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki. (K J, E J)
30. Rola zmian zachodzących w roślinie w reakcji na zanieczyszczenie powietrza. (J D, J N)



PROJEKTY BADAWCZE I RECENZJE

1. Eksperymentalne zbadanie funkcji łusek u węży.

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

Funkcje łusek u węży.

Autorzy:

Marta Czarnocka-Cieciura, Instytut Nauk o Środowisku UJ
Agata Rozik, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Abstrakt:

Na temat funkcji łusek u węży istnieją utrwalone w środowisku naukowym opinie, ale brakuje ich weryfikacji eksperymentalnej. W niniejszym projekcie sprawdzone zostaną hipotezy, że łuski (1) ograniczają utratę wody, (2) zmniejszają wymianę ciepła z otoczeniem, (3) wspomagają funkcje lokomotoryczne oraz (4) zabezpieczają przed pasożytami i infekcjami. W tym celu zostaną porównane formy bezłuskie i normalne węża zbożowego (*Pantherophis guttatus*). Metodyka będzie obejmowała: pomiary utraty wody w komorach z przepływem powietrza, mierzenie temperatury ciała zwierząt przenoszonych do innych warunków termicznych lub nagrzewanych lampą grzewczą, pomiary prędkości i przyspieszenia węży na płaskim torze oraz umiejętność wspinaczki, obserwacje zapasożycenia kleszczami i roztoczymi oraz infekcji skórnych w warunkach półnaturalnych. Wyjaśnienie powyższych kwestii może być interesujące nie tylko dla herpetologów, ale również poszerzać ogólną wiedzę biologiczną dotyczącą ewolucji funkcji struktur skórnych u lądowych kręgowców.

Cel naukowy:

Łuski lub rogowe tarczki są jedną z najbardziej charakterystycznych cech gadów. Uważa się, że ich wykształcenie pozwoliło tej grupie kręgowców na początku mezozoiku w pełni uniezależnić się od środowiska wodnego i zdobyć przewagę nad płazami. Jest wiele utartych poglądów na temat funkcji łusek, szczególnie u węży, u których dodatkowo sugeruje się ich funkcje lokomotoryczne. Z powodu braku gatunków bezłuskich, hipotezy o znaczeniu łusek u węży pozostają nieweryfikowane (Bennett i Licht 1975). W warunkach naturalnych bezłuskie mutanty węży pojawiają się bardzo rzadko (Licht i Bennett 1972, Bennett i Licht 1975), jednak takie formy są utrzymywane w amatorskich hodowlach. Celem niniejszego projektu jest porównanie bezłuskich i normalnych węży zbożowych (*Pantherophis guttatus*) dla rozstrzygnięcia **serii hipotez**: łuski (1) chronią węża przed utratą wody, (2) zmniejszają wymianę ciepła z otoczeniem, (3) usprawniają funkcje lokomotoryczne oraz (4) zabezpieczają przed pasożytami i infekcjami skórnymi.

Znaczenie projektu:

Mimo, że poglądy na temat funkcji łusek u węży są szeroko akceptowane wśród naukowców, mało jest badań próbujących je zweryfikować. Lokomotoryczne znaczenie łusek jest wnioskowane na podstawie obserwacji, że węże przy poruszaniu się, a zwłaszcza wspinaczce, rozchylają łuski, zahaczając nimi o podłoże (Marvi i Hu 2012). Brak jednak badań pokazujących, że jest to niezbędne do efektywnego przemieszczania się. Podobnie, obecność łusek ze względu na zawartość wytrzymałej beta-keratyny (Toni i Alibardi 2007), może stanowić mechaniczną barierę dla patogenów i ektopasożytów, ale brak na to jednoznacznych dowodów. O funkcji łusek w ograniczaniu parowania i o ich wpływie na przewodnictwo cieplne wnioskowano głównie na

podstawie zmian w budowie łusek u gadów z siedlisk różniących się klimatem (Wegener i wsp. 2014). W tych badaniach wykryto, że gady z siedlisk ciepłych i suchych posiadają grubsze łuski. Temu tematowi są również poświęcone jedynie dwie prace badające bezłuskie węże w kontekście funkcji łusek (Licht i Bennett 1972, Bennett i Licht 1975). Prace te sugerują brak różnic w tempie utraty wody i nagrzewania się w porównaniu z normalnymi węzami, jednak z powodu bardzo małej próby (odpowiednio 1 i 2 bezłuskie), trudno uznać te wyniki za rozstrzygające. Również w opinii hodowców bezłuskie formy węży nie są upośledzone, jednak oprócz wspomnianych prac Lichta i Bennetta brak jest badań na ten temat. Planowane w tym projekcie zbadanie różnic w funkcjonowaniu zmutowanych i z normalnymi łuskami pomoże wyjaśnić rzeczywiste funkcje łusek. Pozwoli też rzucić światło na ewolucję owodniowców i wyjaśnić przyczyny, dla których nie są znane przypadki ewolucyjnej utraty łusek u węży, natomiast ptaki i ssaki mogły zrezygnować z takiej ścisłej okrywy ciała i wykształcić pióra lub włosy.

Koncepcja i plan badań

Całość trwania projektu planowana jest na trzy lata. Pierwszy rok poświęcony zostanie na pozyskanie węży, aklimację zwierząt do nowych warunków oraz zakup i testowanie niezbędnego sprzętu. W trakcie drugiego roku planowane jest zbadanie trzech kwestii wokół wpływu łusek na: (1) tempo utraty wody z organizmu, (2) tempo zmian temperatury ciała pod wpływem czynników zewnętrznych się oraz (3) zdolności lokomotoryczne zwierząt. W dwóch pierwszych zagadnieniach przewidziane jest uwzględnienie stanu fizjologicznego węża: czy jest on w fazie trawienia ofiary, czy też po jej całkowitym strawieniu. Zmiany temperatury będą dotyczyć tempa nagrzewania i chłodzenia się zwierzęcia w wyniku przewodnictwa cieplnego (przełożenie do cieplejszego lub chłodniejszego otoczenia) i nagrzewania pod wpływem promieniowania podczerwonego. Sprawdzanie hipotezy lokomotorycznej jest planowane w rozbiciu na trzy szczegółowe pytania: czy obecność łusek wpływa na szybkość przyspieszania węży w sytuacji zagrożenia, na ich prędkość poruszania się po płaskim podłożu oraz na umiejętność wspinania się.

W trzecim roku wykonany zostanie ostatni eksperyment, mający na celu zbadanie funkcji łusek w (4) ochronie przed pasożytami i patogenami skórnymi. Ma on na celu odpowiedzieć na pytanie, czy u węży przebywających w warunkach pół-naturalnych formy bezłuskie będą silniej zaatakowane przez kleszcze, roztocza oraz będą miały częstsze infekcje skórne.

Wszystkie eksperymenty zostaną przeprowadzone w okresie od maja do listopada, w celu wykluczenia dwóch okresów w fizjologicznym cyklu aktywności, związanych z godami i hibernacją. Dodatkowo węże, które będą przechodziły linienie będą okresowo wykluczane z udziału w eksperymentach.

Metodyka badań

Obiektem badawczym w projekcie jest wąż zbożowy (*Pantherophis guttatus*) - jeden z kilku gatunków węży, wśród których spotyka się formy bezłuskie. Naturalnym zasięgiem występowania tego gatunku są południowo-wschodnie regiony Ameryki Północnej. Jest on również jednym z najczęściej spotykanych gatunków w amatorskich hodowlach. Możliwość zakupu osobników obu form oraz łatwość utrzymywania ich w hodowli zdecydowały o wyborze tego gatunku jako obiektu badawczego.

W celu przeprowadzenia badań zakupione zostaną dorosłe osobniki, 10 form bezłuskich oraz 10 z łuskami. Każda grupa będzie się składać z równej proporcji samic i samców. Zwierzęta trzymane będą w osobnych terrariach, zawierających podłoże trocinowe, zbiornik z wodą oraz kryjówkę. Pokarm będą stanowiły dorosłe myszy, podawane raz na tydzień. W okresie od listopada do marca węże będą utrzymywane w niższej temperaturze, umożliwiającej im przejście w okres hibernacji.

1) Wpływ łusek na tempo utraty wody.

Dla każdego osobnika zostanie wykonanych 5 powtórzeń pomiarowych dla dwóch stanów fizjologicznych (trawienia oraz po strawieniu pokarmu).

W celu przeprowadzenia pomiarów zostaną wykorzystane komory, przez które przepuszczany będzie strumień pozbawionego pary wodnej powietrza. Analiza wilgotności będzie dokonywana na powietrzu wychodzącym z komory za pomocą mierników wilgotności. Zapis wartości wilgotności będzie się odbywał w sposób ciągły przez 3 godziny, podczas których wewnątrz komór przebywają indywidualnie zwierzęta. W analizach wykorzystywany jest 15-minutowy zapis, podczas którego obserwowane są najniższe wartości wilgotności powietrza w celu wyliczenia najniższego tempa utraty wody z organizmu (metodyka na podstawie pracy Bennett i Licht 1975).

2) Wpływ łusek na zmiany temperatury ciała.

Ta część badań będzie składała się z trzech eksperymentów. Dwa dotyczące przewodnictwa zostaną przeprowadzone za pomocą metody opisanej w pracy Lichta i Bennetta (1972). Każdy z węży, przebywający w temperaturze 27°C zostanie ochłodzony do temperatury 15°C, po czym ponownie ogrzany do 27°C, w wyniku przeniesienia do pomieszczeń o odpowiedniej temperaturze. Tempo nagrzewania się węża w wyniku promieniowania będzie zmierzone w czasie naświetlania węża żarówką na podczerwień w pomieszczeniu o temperaturze 23°C, po uprzednim ochłodzeniu go do 15°C. We wszystkich przypadkach obserwacje tempa ochładzania lub ogrzewania się zostaną przeprowadzone przy użyciu kamery termowizyjnej. Każde z doświadczeń zostanie przeprowadzone w 2 powtórzeniach: na węzach w trakcie trawienia pożywku i po pełnym strawieniu.

3) Wpływ łusek na zdolności lokomotoryczne węży.

Pierwsze z doświadczeń z tej serii będzie polegało na zbadaniu szybkości przyspieszania. Wąż zostanie spuszczonej na równi pochyłej tuż przed linię startu toru zbudowanego z wykładziny zapewniającej szorstkie podłoże i pleksiglasowych ścianek, uniemożliwiających wężowi ucieczkę na boki. Wąż zostanie przestraszony poprzez nagły ruch, eksperymentatora połączony z uderzeniem w podłoże w pobliżu węża i ewentualną stymulację ogona zwierzęcia przy użyciu pędzla. Zostanie zmierzony czas, jaki zajmuje wężowi pokonanie 50 cm, poprzez zmierzenie, przy użyciu fotokomórek, w którym momencie głowa węża przetnie linię startu i mety (metodyka na podstawie pracy Plummer 1997).

Drugie doświadczenie, dotyczące prędkości poruszania się na płaskim podłożu, zostanie przeprowadzone w podobny sposób do poprzedniego, z tym, że wąż będzie musiał przebyć odległość 5m i będzie stale stymulowany poprzez muskanie końca ogona pędzlem. Tak jak poprzednie, doświadczenie to zostanie przeprowadzone w temperaturze 27°C.

Ostatnie z doświadczeń z tej serii będzie dotyczyło umiejętności wspinania się. Wąż zostanie umieszczony w wysokim terrarium w temperaturze 23°C, suboptymalnej dla węży zbożowych. O jedną ze ścian terrarium będzie oparty ścinek drewna liściastego szerokości terrarium i wysokości 120 cm, pokryty naturalną, chropowatą korą (np. dębu, lipy lub klonu), nachylony pod kątem 80 stopni, aby ułatwić zwierzęciu wspinaczkę. Nad tą ścianką zostanie umieszczone źródło ciepła: żarówka na podczerwień, stanowiące zachętę do wspinaczki. W czasie 3 godzin przebywania zwierzęcia w terrarium doświadczalnym będzie notowana liczba nieudanych prób wspinaczki i czas wejścia, jeśli zwierzęciu uda się dostać na szczyt ścinka.

4) Wpływ łusek na obecność ektopasożytów oraz patogenów skórnych.

W tym eksperymencie węże będą trzymane w osobnych schronieniach na otwartej przestrzeni. Miejscem przeprowadzenia badań będzie sucha łąka o heterogennej strukturze, na której w dwumetrowych odstępach zostaną rozmieszczone klatki o drobnych oczkach. Dolna ścianka zostanie wkopana w ziemię, a ich dno zostanie pokryte darnią z łąki. W każdej klatce wąż będzie

miał do dyspozycji naczynie z wodą, kryjówkę oraz miejsce zadaszone na wypadek pogorszenia pogody.

Badania będą trwały dwa miesiące: lipiec oraz sierpień. Co tydzień węże będą karmione oraz sprawdzane pod kątem obecności pasożytów oraz infekcji skórnych. W tym celu każdy osobnik będzie przeniesiony do pudełka wyłożonego białym papierem. Zliczane będą roztocza, które zostaną zaobserwowane na wężu oraz te, które uciekną ze zwierzęcia, a także kleszcze, usuwane po każdym oględzinach. Do analiz brana będzie pod uwagę suma pasożytów dla każdego osobnika oraz obecność lub brak infekcji skórnych.

Analiza statystyczna

Do wyników wszystkich eksperymentów zostanie zastosowana wieloczynnikowa analiza wariancji (ANOVA). W każdym modelu obecność łusek i płeć będą traktowane jako czynniki ustalone. W eksperymentach dotyczących utraty wody (1) i zmian temperatury ciała (2) czynnikiem ustalonym będzie również stan fizjologiczny (trawienie lub po trawieniu). Eksperymenty dotyczące utraty wody (1) i lokomocji (bez wspinaczki) (4) będą przeprowadzone kilkakrotnie dla każdego osobnika i numer zwierzęcia będzie zagnieżdżonym czynnikiem losowym.

Literatura

Bennett, A. F., i Licht, P. (1975). Evaporative water loss in scaleless snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 52(1), 213-215.

Licht, P., i Bennett, A. F. (1972). A scaleless snake: tests of the role of reptilian scales in water loss and heat transfer. *Copeia*, 702-707.

Marvi, H., i Hu, D. L. (2012). Friction enhancement in concertina locomotion of snakes. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(76), 3067-3080.

Plummer, M. V. (1997). Speed and endurance of gravid and nongravid green snakes, *Opheodrys aestivus*. *Copeia*, 191-194.

Toni, M., i Alibardi, L. (2007). Soft epidermis of a scaleless snake lacks beta-keratin. *European Journal of Histochemistry*. 51(2),145-151.

Wegener, J. E., Gartner, G. E., i Losos, J. B. (2014). Lizard scales in an adaptive radiation: variation in scale number follows climatic and structural habitat diversity in *Anolis* lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(2), 570-579.

Koszty

Pozycja	Fundusze na każdy rok badań (zł)			Razem
	2016	2017	2018	
1.Koszty bezpośrednie, w tym:	94465	44530	59060	198055
1/Wynagrodzenia	36000	36000	36000	108000
2/ Aparatura	13425	-	-	13425
3/ Inne	45040	8530	23060	76630
2. Koszty bezpośrednie	16208	8906	11812	36926
Razem	110673	53436	70872	234981

Koszty wynagrodzeń obejmują wypłaty 1500 zł miesięcznie dla dwóch osób.

Aparatura obejmuje koszty terrariów, klatek zewnętrznych, kamery termowizyjnej z pirometrem, fotokomórek i urządzeń regulujących temperaturę i wilgotność w pomieszczeniu dla węży.

Inne koszty bezpośrednie obejmują koszt zakupu węży (koszt pojedynczego węża bezłuskiego wynosi około 4000 zł), koszt wyjazdów na konferencje (planujemy wyjazd na trzy konferencje dla dwóch osób) oraz koszt pokarmu dla węży.

RECENZJE

Ocena merytoryczna projektu

Projekt został napisany w prawidłowy sposób i stanowi logiczną całość. Spełnia kryteria badań podstawowych i ma charakter naukowy.

Zaprezentowany przez autorów projektu problem badawczy z punktu widzenia laika stanowi poważną zachętę do zainteresowania się tematem łusek u węży. Uważam, że skonfrontowanie ze sobą dwóch tak różnych fenotypowo form w obrębie jednego gatunku może być podstawą do wyciągnięcia interesujących wniosków. Autorki projektu w sposób interesujący zaproponowały badania cech obu form hodowlanych węża zbożowego stawiając szereg niesprawdzonych dotychczas hipotez. Wiadomości do tej pory przyjmowane za oczywiste nie zostały skutecznie zweryfikowane i uważam że ten projekt pomoże ostatecznie zweryfikować przyjmowane przez naukowców hipotezy dotyczące zastosowania łusek. Niezależnie od wyniku badań ciekawe jest pytanie dlaczego akurat takie przekształcenie skóry zyskało znaczenie dla tej grupy gadów. Nie jestem tylko pewien dlaczego konieczne jest tak długie prowadzenie hodowli. Nie zostało to do końca uzasadnione, a działania nie zostały rozpisane na kolejne lata projektu.

Ocena kosztorysu

Kosztorys projektu nie jest do końca przejrzysty i po zapoznaniu się z nim trudno ocenić czego dotyczą niektóre wydatki. Nie jestem pewien czy zakupiono 20 węży, ani czy ich karmienie

zostało uwzględnione w poszczególnych latach. Nie wiadomo też ile kosztowały węże z łuskami. Sumaryczne koszty stanowią dość wysoką kwotę zważywszy niski stopień komplikacji badań.

Ocena możliwości wykonania

Oceniam, że projekt jest wykonalny przy opisywanych założeniach. Opisane metody umożliwiają doświadczalne zbadanie przyjętych hipotez, a próba zwierząt wykorzystanych w doświadczeniach jest wystarczająca. Jediną trudnością może być ocena wyników oraz interpretacja nieprzewidywalnych zachowań zwierząt. Opisywane reguły eksperymentu wydają się nie uwzględniać komplikacji z tego płynących.

Mocne strony wniosku

- Możliwość zakupu zwierząt o odpowiednich cechach
- Tematyka dotycząca utartych przekonań dotąd nieopartych eksperymentalnie
- Łatwość wykonania

Słabe strony wniosku

- Wysokie planowane koszty projektu
- Mała przejrzystość wydatków w ramach projektu
- Brak uzasadnienia potrzebnego na projekt czasu trzech lat

Jakub Dębowski

Mocne strony projektu

Podoba mi się ujęcie problemu w szerokim, ewolucyjnym kontekście oraz postawienie pytań badawczych w taki sposób by uzyskane odpowiedzi nie tylko charakteryzowały węże bezłuskie ale odpowiadały na pytanie czemu nie stały się one dominującą formą.

Eksperymenty mające na celu weryfikację postawionych hipotez, zaprojektowane są w bardzo logiczny sposób i sprawiają wrażenie dobrze przemyślanych od strony praktycznego wykonania. Cały projekt przygotowany jest bardzo starannie, napisany ładnym językiem, a przedstawione w nim myśli sformułowane są w sposób przejrzysty i precyzyjny.

Myślę że proponowany projekt ma duże szanse realizacji a jego wyniki mogą być opublikowane w prestiżowych czasopismach. Wyniki tych badań będą ciekawe nie tylko dla grona specjalistów zajmujących się tą dziedziną ale dla wszystkich których choćby w niewielkim stopniu interesuje biologia ewolucyjna.

Słabe strony projektu

Zasadniczo nie widzę w projekcie słabych stron, mogę jedynie wspomnieć o kilku detalach, które rzucają się w oczy przy jego czytaniu. Bardzo ogólnie sformułowany tytuł nie oddaje w pełni specyfiki planowanych badań. Myślę że można by było doprecyzować go nieco tak by na

pierwszy rzut oka przyciągał należą mu uwagę. Zdarzają się również bardzo nieliczne niezręczne sformułowania jak „badanie kwestii **wokół** wpływu łusek” (...), lub „sprawdzone zostaną hipotezy, **że**”(…)

Ocena kosztorysu

Całkowity szacowany koszt projektu wydaje się dosyć spory jednak w większości uzasadniony potrzebami projektu. Wątpliwości budzą jedynie: przewidywany koszt aparatury, który wydaje się być niedoszacowany (zwłaszcza w porównaniu z całkowitym kosztem projektu) oraz aż trzykrotny wyjazd obydwu wykonawców projektu na konferencje, przy braku środków przeznaczonych na opublikowanie wyników. W tabeli z kosztorysem w drugim punkcie wkradł się mały błąd – zamiast kosztów pośrednich ponownie wpisano bezpośrednie.

Ocena ogólna

Ogólnie proponowany projekt uważam za bardzo ciekawy, znakomicie przygotowany i jak najbardziej warty realizacji. Po delikatnej korekcie kosztorysu postulowałabym przyznanie środków na jego realizację.

Katarzyna Janas

Recenzja projektu „Funkcje łusek u węży”

Cel projektu jest atrakcyjny i jasno postawiony, wydaje się też jednym z ważniejszych zagadnień do zbadania szczególnie w kontekście mechanizmu poruszania się węży. Pozostałe zaproponowane tematy badań również wybrane są rozsądnie i rzeczywiście mogą być związane z powstaniem i funkcją łusek. Ułatwienie poruszania się, zmniejszenie utraty wody i ochrona przed pasożytami są z pewnością korzystne dla zwierzęcia, nie mam jednak takiej pewności co do korzyści ze zmniejszenia tempa wymiany temperatury z otoczeniem – z jednej strony rzeczywiście może to pomagać w utrzymaniu ciepła przez dłuższy czas, ale za to może wydłużać czas, jaki zwierzę musi poświęcić na nagrzanie się w słońcu. Sugeruję też, że warte przemyślenia byłoby zagadnienie zbadania kosztów związanych z wytworzeniem łusek.

W świetle przytoczonych danych, a raczej braków w literaturze naukowej na dany temat, zadziwiające jest dlaczego temat ten nie został jeszcze w zadowalający sposób zbadany, mimo iż w grę wchodzi jedna z podstawowych cech gadów, która może być szczególnie istotna pod względem lokomotorycznym w przypadku węży. Tym większa jest szansa, że uzyskane w projekcie wyniki uda się opublikować w wysoko cytowanym czasopiśmie, jeżeli tylko badania zostaną przeprowadzone w sposób rzetelny. Część projektu powtarza badania przeprowadzone wcześniej, lecz z racji rażąco niskiej wielkości próby wykorzystanej w cytowanym badaniu powtórzenie pomiarów na większej ilości osobników, takiej jak przewidywana w projekcie, jest wysoce wskazane i pozwoli uzyskać o wiele bardziej rzetelne wyniki.

W metodyce badań należy uwzględnić albo zakup węży o możliwie zbliżonej wielkości ciała, albo użycie masy lub długości ciała jako kowarianty w obliczeniach.

Większe zwierzęta mają większy stosunek objętości do powierzchni ciała, co może mieć znaczenie dla tempa utraty wody i wymiany ciepła. Szybkość poruszania się, tak w pionie jak i w poziomie, może również zależeć od rozmiarów węża.

Metoda pomiaru utraty wody nie budzi zastrzeżeń, prędkość poruszania się również wydaje się dość dobrze zaplanowana, jeżeli zastosowane metody płoszenia węży są dostatecznie skuteczne by skłonić je do ucieczki, a żarówka nagrzewająca jest na tyle skuteczną przynętą, by skłonić je do wysiłku i opuszczenia suboptymalnych warunków. Co do wykorzystania kamery termowizyjnej, można mieć wątpliwości czy mierzona w ten sposób temperatura powierzchni ciała węża odpowiada temperaturze w jego wnętrzu. Największe zastrzeżenia mam do metodyki testu badającego podatność na pasożyty i infekcje – jak zostało to powiedziane w tekście, gatunek pochodzi z południowej części Ameryki Pn. i preferuje dość wysokie temperatury. Czy nasz klimat, nawet w środku lata, nie jest jednak dla niego za zimny? Dodatkowo węże mają być wystawione na czynniki środowiskowe mogące różnić się od tych na które narażone by były w swoim naturalnym środowisku – dotyczy to w szczególności infekcji, na które mogą okazać się zupełnie nieodporne.

W moim odczuciu budżet mógłby być znacznie niższy niż sugerowany, gdyby udało się skrócić eksperyment. Przeznaczanie całego roku na kompletowanie sprzętu i adaptację zwierząt do warunków hodowlanych wydaje się zdecydowanie zbyt długim okresem, a badania nie wydają się aż tak czasochłonne by szczelnie wypełnić kilkumiesięczny czas aktywności węży. Skrócenie czasu trwania eksperymentu sprawiłoby, że większość pieniędzy przyznanych w granie rzeczywiście zostałyby spożytkowane na eksperyment, a nie na wynagrodzenia.

Mocnymi stronami projektu z pewnością jest wkład jaki wniesie w zrozumienie funkcji łusek u węży, i sprawdzenie szeregu hipotez tłumaczących zalety z ich posiadania.

Najslabszą stroną z mojego punktu widzenia jest zbyt długi czas przewidziany na przeprowadzenie doświadczenia i niepotrzebnie zwiększający koszty całego przedsięwzięcia.

Małgorzata Lipowska

Ocena merytoryczna:

Projekt przygotowany starannie przy zachowaniu obowiązujących norm. Badanie ma na celu potwierdzenie eksperymentalne utartych opinii na temat funkcji łusek. Dodatkowo zauważam, że skutkiem badania będzie ocena dostosowania form bezłuskich i poznania ich biologii. Bardzo rzadkie występowanie bezłuskich węży w przyrodzie może sugerować, że ich dostosowanie jest mniejsze. Warto może było by dodać predykcje co do otrzymanych wyników. Mogło by to pomoc w zaznaczeniu rangi problemu. Czepiając się: nie jestem pewna czy użycie stwierdzenia „normalne węże” na określenie form z łuskami jest najbardziej właściwe. Ostatnie zdanie w części Znaczenie projektu nie jest dla mnie całkowicie zrozumiałe. Ptaki i ssaki są stałocieplne, węże zmiennocieplne. Nie porównujecie w badaniu pomiędzy funkcjami piór i sierści a łusek. Według mnie konieczne jest ewentualne rozwinięcie tej myśli, bo obecnie brzmi

jak skrót myślowy. Uwagi mam tylko do szczegółów, bo projekt wydaje się być przemyślany. Do mocnych stron projektu zaliczam przede wszystkim wykorzystanie węży bezłuskich. Nawet jeśli badania nie przyniosą oczekiwanych rezultatów, to dane na temat biologii węży bezłuskich będą same w sobie publikowalne.

Metodyka:

Użyte w projekcie metody uważam za dobrze dobrane i większości przypadków pozwolą one na jasne zweryfikowanie postawionych hipotez.

Kosztorys:

Wydaje się być szczegółowy i zawiera wszystkie potrzebne elementy do przeprowadzenia doświadczenia. Zwróciłam uwagę na pobieranie wynagrodzenia przez cały okres trwania projektu pomimo, iż prace zaplanowane są tylko na kilka miesięcy w roku. To sprawia, że suma wynagrodzenia to prawie połowa kosztów całego projektu. Może skumulowanie badań i przełożenie ostatniego eksperymentu na rok drugi pozwoliło by na ograniczenie kosztów.

Wykonalność:

Przy drobnym doszlifowaniu projekt mógłby zostać zrealizowany.

Jowita Niedojadło

Recenzja projektu: „Funkcje łusek u węży”

Ten projekt bardzo mi się podoba, ale powiedzmy sobie, rewolucyjnego postępu w biologii nie przyniesie. Hipotezy dotyczące funkcji łusek wydają się uzasadnione, brakuje jedynie ich porządnego eksperymentalnego potwierdzenia. Dopiero gdy choć jedną hipotezę przyjdzie zdecydowanie odrzucić, to dopiero wówczas będzie rewelacja. Brak bardziej ogólnych konsekwencji tego projektu widoczny jest w spisie literatury. Prace na ten temat są publikowane w pismach raczej specjalistycznych a nie ogólnobiologicznych takich jak *Nature* lub *Science*. Może autorki wymyślą coś jeszcze bardziej rewelacyjnego.

W tym projekcie brakuje mi jednoznacznego ustalenia co już zostało eksperymentalnie ustalone i czy rzeczywiście wielkości badanych prób były dotychczas tak małe, że mamy jedynie do czynienia z niepotwierdzonymi hipotezami. Bo przy powoływaniu się na literaturę, autorki stwierdziły, że już wiele zrobiono, szczególnie w samej metodyce badań. Po drugie, nie da się ukryć, że mutacja lub mutacje powodujące brak łusek, mogą mieć jakieś efekty plejotropowe i zmieniać fizjologię węży niezależnie od efektów samych łusek. Węże te mogły też przystosowań umożliwiających normalne procesy fizjologiczne bez łusek. Ustalenie tego wymaga wejścia w genetykę i fizjologię węży i może być bardzo trudne jeśli nie niemożliwe. Ale nawet jeśli tego nie będzie można poznać, to taką możliwość trzeba przedyskutować, z wszystkimi argumentami za i przeciw, nie tylko w ostatecznej pracy, ale także w jej projekcie.

Adam Łomnicki

Ogólna ocena merytoryczna projektu

Celem projektu jest przetestowanie czterech hipotez dotyczących funkcji łusek węży. Temat jest intrygujący: jak słusznie zauważają autorki, rogowe tarczki lub łuski to jedna z wyróżniających cech gadów, przypuszczalnie bardzo istotna w ewolucji tej grupy zwierząt, a jednocześnie – właśnie przez powszechność występowania, uniemożliwiającą badania porównawcze – funkcje tych struktur są bardzo trudne do określenia. Wykorzystanie bezłuskich mutantów jest pomysłem sposobem na testowanie hipotez dotyczących tychże funkcji – niestety, wiąże się z poważnymi problemami metodologicznymi, które moim zdaniem stawiają pod znakiem zapytania wartość poznawczą proponowanego projektu.

Projekt przewiduje bowiem porównanie bezłuskich i ‘łuskowych’ form węża zbożowego, zakupionych z hodowli. Autorki nie napisały, czy cokolwiek wiadomo na temat genetycznego podłoża bezłuskowości. Niezależnie jednak od charakterystyki mutacji powodującej (powodujących?) bezłuskowość, porównywane dwa typy osobników będą bez wątpienia różnić się genetycznie w znacznie większej liczbie loci, niż te warunkujące posiadanie lub brak łusek. Jeśli dobrze rozumiem, bezłuskie formy węży są utrzymywane w hodowlach na drodze sztucznej selekcji, gdzie do reprodukcji wybierane są osobniki o odpowiednim fenotypie (w tym przypadku: nie mające łusek). Tego typu selekcja prowadzi jednak nie tylko do utrzymania w populacji pożądanej cechy, ale również do (1) wzrostu wsobności i (2) skorelowanych zmian w innych cechach. Pierwszy z tych efektów wynika po prostu z krzyżowania spokrewnionych osobników będących nosicielami pożądanej mutacji, i może skutkować depresją wsobną, która wpłynie na wyniki eksperymentów. Na drugi efekt może składać się kilka czynników: (a) plejotropia: mutacja(/e) powodująca(/e) brak łusek może/mogą oddziaływać również na inne cechy; (b) ‘efekt założyciela,’ związany z wyżej wspomnianą wsobnością: w bezłuskiej linii hodowlanej będą występować tylko takie allele, we wszystkich loci, jakie były obecne u osobników, z których ta linia została wyprowadzona (na przykład, jeśli w wyjściowej populacji osobniki różniły się genetycznie pod względem zdolności lokomotorycznych, i mutacja ‘bezłuskowa’ pojawiła się akurat u osobnika kiepskiego w tym względzie, to jest spora szansa, że formy bezłuskowe będą lokomotorycznie słabe z powodów innych niż brak łusek); czy wreszcie (c) siła lub/i kierunek doboru zmieniony przez bezłuskowość (na przykład, jeśli brak łusek faktycznie zwiększa tempo utraty wody, to dobór może faworyzować cechy rekompensujące ten mankament, tj. na inne mechanizmy ograniczania utraty wilgoci).

Krótko mówiąc: należy oczekiwać, że osobniki z łuskami i bezłuskowe będą różnić się pod wieloma względami poza samą obecnością łusek. To spowoduje problemy z interpretacją wyników proponowanych eksperymentów. I to w obie strony: (1) jeśli zostanie wykryty efekt formy (łuskowej vs. bezłuskowej), to nie będzie wiadomo, czy wynika on z obecności łusek, czy z innych różnic między formami; (2) jeśli brak będzie efektu formy, to też nie będzie jasne, czy oznacza to brak wpływu łusek, czy wynika z kompensacji w innych cechach.

Rozwiązaniem tych problemów mogłaby być introgresja mutacji ‘bezłuskowej’ na tło genetyczne populacji typu dzikiego (nie pomogłoby to, oczywiście, na plejotropię, ale na pozostałe kwestie – tak, co znacznie zwiększyłoby siłę wnioskowania), co jednak byłoby, logistycznie i czasowo, ogromnym przedsięwzięciem.

Uwagi dotyczące metodyki i jej opisu:

1) Wpływ łusek na tempo utraty wody.

Ostatnie zdanie jest niejasne.

2) Wpływ łusek na zmiany temperatury ciała.

Zapowiedziane są trzy eksperymenty, ale opisane tylko dwa.

3) Wpływ łusek na zdolności lokomotoryczne węży.

Jeśli dobrze rozumiem, w pierwszym eksperymencie wąż ‘wspina się’ do góry po równi pochyłej – nie jest to jednak jasne z opisu.

W analizie statystycznej wyników wszystkich eksperymentów należałoby koniecznie uwzględnić wielkość ciała osobnika.

Mocne strony wniosku

- Interesujący temat i niezłe przedstawione uzasadnienie jego podjęcia
- Wniosek jest w większości napisany w sposób klarowny, logiczny i zrozumiały
- Uwzględnienie obu płci w badaniach (bynajmniej nie oczywista sprawa – używanie tylko jednej płci, zwykle samców, w badaniach cech i procesów, które mogą różnić się między płciami, to częsty problem)

Słabe strony wniosku

- Problemy z interpretacją wyników (zob. powyżej)
- Miejscami niewystarczający opis proponowanych metod (co jednak można zrozumieć zważywszy na ograniczony czas i dostęp do literatury).

Zofia Prokop

OSTATECZNA WERSJA PROJEKTU

Eksperymentalne zbadanie funkcji łusek u węży

Autorzy:

Marta Czarnocka-Cieciura, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Agata Rozik, Instytut Nauk o Środowisku UJ

Abstrakt:

Na temat funkcji łusek u węży istnieją utrwalone w środowisku naukowym opinie, ale brakuje ich weryfikacji eksperymentalnej. W niniejszym projekcie sprawdzone zostaną hipotezy, że łuski na grzbiecie i bokach ciała (1) ograniczają utratę wody, (2) zmniejszają wymianę ciepła z otoczeniem, (3) wspomagają funkcje lokomotoryczne oraz (4) zabezpieczają przed pasożytami i infekcjami. Zbadamy też czy (5) łuski są kosztowne do wytworzenia. W tym celu zostaną porównane formy bezłuskie i normalne węża zbożowego (*Pantherophis guttatus*). Metodyka będzie obejmowała: pomiary utraty wody w komorach z przepływem powietrza, mierzenie temperatury ciała zwierząt przenoszonych do innych warunków termicznych lub nagrzewanych lampą grzewczą, pomiary prędkości i przyspieszenia węży na płaskim torze oraz umiejętność wspinaczki, obserwacje zapasożycenia kleszczami i roztoczymi oraz infekcji skórnych w warunkach półnaturalnych oraz porównania tempa wzrostu pomiędzy osobnikami z obu form. Wyjaśnienie powyższych kwestii może być interesujące nie tylko dla herpetologów, ale również poszerzać ogólną wiedzę biologiczną dotyczącą ewolucji funkcji struktur skórnych u lądowych kręgowców.

Cel naukowy:

Łuski lub rogowe tarczki są jedną z najbardziej charakterystycznych cech gadów. Uważa się, że ich wykształcenie pozwoliło tej grupie kręgowców na początku mezozoiku w pełni uniezależnić się od środowiska wodnego i zdobyć przewagę nad płazami. Jest wiele utartych poglądów na temat funkcji łusek, szczególnie u węży, u których dodatkowo sugeruje się ich funkcje lokomotoryczne. Z powodu braku gatunków bezłuskich, hipotezy o znaczeniu łusek u węży pozostają niezwerifikowane (Bennett i Licht 1975). W warunkach naturalnych mutanty węży o zredukowanych łuskach pojawiają się bardzo rzadko (Licht i Bennett 1972, Bennett i Licht 1975), jednak takie formy są utrzymywane w amatorskich hodowlach. Wygląd tych osobników, nazywanych dalej bezłuskimi, cechuje się brakiem łusek na niemal całej powierzchni ciała, oprócz strony brzusznej. Celem niniejszego projektu jest porównanie bezłuskich i normalnych węży zbożowych (*Pantherophis guttatus*) dla rozstrzygnięcia **serii hipotez**: łuski na grzbiecie i bokach ciała (1) chronią węża przed utratą wody, (2) zmniejszają wymianę ciepła z otoczeniem, (3) usprawniają funkcje lokomotoryczne oraz (4) zabezpieczają przed pasożytami i infekcjami skórnymi. Dodatkowo sprawdzimy hipotezę, czy (5) łuski są kosztowne do wytworzenia.

Znaczenie projektu:

Chociaż poglądy na temat funkcji łusek u węży są szeroko akceptowane wśród naukowców, mało jest badań próbujących je zweryfikować. Lokomotoryczne znaczenie łusek jest wnioskowane na podstawie obserwacji, że węże przy poruszaniu się, a zwłaszcza wspinaczce, rozchylają łuski,

zahaczając nimi o podłoże (Marvi i Hu 2012). Dotyczy to głównie strony brzusznej, ale formy rogowe na bokach i grzbiecie ciała mogą usztywniać skórę, do której przyczepione są mięśnie lokomotoryczne (Lissmann 1950), nie ograniczając równocześnie swobody ruchów. Brak jednak badań pokazujących, że obecność tych łusek jest niezbędna do efektywnego przemieszczania się. Podobnie, łuski ze względu na zawartość wytrzymałej beta-keratyny (Toni i Alibardi 2007), mogą stanowić mechaniczną barierę dla patogenów i ektopasożytów, ale brak na to jednoznacznych dowodów. O funkcji łusek w ograniczaniu parowania i o ich wpływie na przewodnictwo ciepłe wnioskowano głównie na podstawie zmian w budowie łusek u gadów z siedlisk różniących się klimatem (Wegener i wsp. 2014). W tych badaniach wykryto, że gady z siedlisk ciepłych i suchych posiadają grubsze łuski. Temu tematowi są poświęcone jedynie dwie prace badające bezłuskie węże w kontekście funkcji łusek (Licht i Bennett 1972, Bennett i Licht 1975). Badania te sugerują brak różnic w tempie utraty wody i nagrzewania się w porównaniu z normalnymi wężami, jednak z powodu bardzo małej próby (odpowiednio 1 i 2 osobniki bezłuskie), trudno uznać te wyniki za rozstrzygające. Również w opinii hodowców bezłuskie formy węży nie są upośledzone, jednak oprócz wspomnianych prac Lichta i Bennetta brak jest badań na ten temat. Planowane w tym projekcie zbadanie różnic w funkcjonowaniu form zmutowanych i z normalnymi łuskami pomoże wyjaśnić rzeczywiste funkcje łusek. Pozwoli też rzucić światło na przyczyny, dla których nie są znane przypadki ewolucyjnej utraty łusek u węży, natomiast ptaki i ssaki mogły zrezygnować z takiej ścisłej okrywy ciała i wykształcić pióra lub włosy.

Koncepcja i plan badań

Obiektem badawczym w projekcie jest wąż zbożowy (*Pantherophis guttatus*) - jeden z kilku gatunków węży, wśród których spotyka się formy bezłuskie. Naturalnym zasięgiem występowania tego gatunku są południowo-wschodnie regiony Ameryki Północnej. Jest on również jednym z najczęściej spotykanych gatunków w amatorskich hodowlach. Możliwość zakupu osobników obu form oraz łatwość utrzymywania ich w hodowli zdecydowały o wyborze tego gatunku jako obiektu badawczego. Utrata łusek u węża zbożowego jest spowodowana mutacją recesywną w pojedynczym genie. Powoduje ona brak łusek na większości powierzchni ciała, poza częścią brzuszną. Pierwszy bezłuski osobnik, od którego rozpoczęto hodowlę, wyklął się w 2002 roku (http://www.scaleless-cornsnake.com/collection_eng.html). W tak krótkim czasie nie spodziewamy się w tej linii dodatkowych przystosowań kompensujących brak łusek. Nie jesteśmy w stanie skontrolować wszelkich możliwych efektów plejotropowych tej mutacji, ale w czasie doświadczeń będziemy notować wszystkie różnice między grupami, mogących świadczyć o istnieniu tych efektów.

Projekt będzie trwał trzy lata. Pierwszy rok poświęcony zostanie na pozyskanie węży, aklimatyzację zwierząt do nowych warunków oraz zakup i testowanie niezbędnego sprzętu. W tym czasie będziemy również obserwować różnice w tempie wzrostu między osobnikami z obu grup, aby wykryć, czy posiadanie łusek jest kosztowne (5). W trakcie drugiego roku planowane jest zbadanie trzech kwestii dotyczących wpływu łusek na (1) tempo utraty wody z organizmu, (2) tempo zmian temperatury ciała pod wpływem czynników zewnętrznych się oraz (3) zdolności lokomotoryczne zwierząt. W dwóch pierwszych zagadnieniach przewidziane jest uwzględnienie stanu fizjologicznego węża: czy jest on w fazie trawienia ofiary, czy też po jej całkowitym strawieniu. U węży po posiłku wyraźnie podnosi się poziom metabolizmu i w związku z tym również utraty wody (Dupoué i współpracownicy 2015). W tym okresie obecność łusek może być kluczowa, choć ze względu na rozciągnięcie powłok ciała, mogą one gorzej chronić zwierzę przed parowaniem. W okresie trawienia węże preferują cieplejsze mikrosiedliska (Dupoué i współpracownicy 2015), co wskazuje, że w tym okresie wymiana ciepła z otoczeniem jest dla węża szczególnie ważna. Może też przebiegać inaczej, z powodu zwiększonej endogennej

produkcji ciepła. Badania zmian temperatury będą dotyczyły tempa nagrzewania i chłodzenia się zwierzęcia w wyniku przewodnictwa cieplnego (przełożenie do cieplejszego lub chłodniejszego otoczenia) i nagrzewania pod wpływem promieniowania podczerwonego. Sprawdzenie hipotezy lokomotorycznej jest planowane w rozbiciu na trzy szczegółowe pytania: czy obecność łusek wpływa na szybkość przyspieszania węży w sytuacji zagrożenia, na ich prędkość poruszania się po płaskim podłożu oraz na umiejętność wspinania się.

W trzecim roku wykonany zostanie ostatni eksperyment, mający na celu zbadanie funkcji łusek w (4) ochronie przed pasożytami i patogenami skórnymi. Ma on na celu odpowiedzieć na pytanie, czy u węży przebywających w warunkach pół-naturalnych formy bezłuskie będą silniej zaatakowane przez kleszcze, roztocza oraz czy będą miały częstsze infekcje skórne. Zwierzęta przejdą etap aklimatyzacji do warunków zewnętrznych przez dwa tygodnie przed rozpoczęciem eksperymentu.

Eksperymenty zostaną przeprowadzone z wykluczeniem dwóch okresów w fizjologicznym cyklu aktywności, związanych z godami (marzec-maj) i hibernacją (listopad-marzec). Dodatkowo węże, przechodzące linienie będą okresowo wykluczane z udziału w eksperymentach. Aby zminimalizować wpływ różnic w stanie fizjologicznym zwierząt, poszczególne eksperymenty będą powtarzane w tym samym dniu od strawienia pokarmu, czyli nie częściej niż raz na tydzień. Eksperyment w warunkach półnaturalnych musi zostać przeprowadzony jako ostatni ze względu na najwyższe ryzyko dla zdrowia zwierząt. Z tych powodów, a także ze względu na ograniczenia sprzętowe, projekt został rozplanowany na trzy lata.

Metodyka badań

W celu przeprowadzenia badań zakupione zostaną świeżo wyklute osobniki, 10 form bezłuskich oraz 10 z łuskami. Aby różnice pomiędzy grupami nie wynikały z innych cech genetycznych, osobniki z łuskami będą rodzeństwem osobników bezłuskich. Wszystkie osobniki będą pochodziły z kilku miotów wyklutych w tym samym sezonie. Każda grupa będzie się składać z równej proporcji samic i samców. Zwierzęta trzymane będą w osobnych terrariach, zawierających podłoże trocinowe, zbiornik z wodą oraz kryjówkę. Pokarm będą stanowić dorosłe myszy, a u młodych osobników mysie oeski (zakupione martwe), podawane raz na tydzień. W okresie od listopada do marca węże będą utrzymywane w niższej temperaturze, umożliwiającej im przejście w okres hibernacji.

1) Wpływ łusek na tempo utraty wody.

Dla każdego osobnika zostanie wykonanych 5 powtórzeń pomiarowych dla dwóch stanów fizjologicznych (trawienia oraz po strawieniu pokarmu). W celu przeprowadzenia pomiarów zostaną wykorzystane komory, przez które przepuszczany będzie strumień pozbawionego pary wodnej powietrza. Analiza wilgotności będzie dokonywana na powietrzu wychodzącym z komory za pomocą mierników wilgotności. Zapis odczytów wilgotności będzie się odbywał w sposób ciągły przez 3 godziny, podczas których wewnątrz komór będą przebywać pojedyncze zwierzęta. Mierzona będzie ilość wody traconej przez zwierzę (metodyka na podstawie pracy Bennett i Licht 1975). Analizy zostaną wykonane przy użyciu komór respirometrycznych dostępnych w Instytucie Nauk o Środowisku UJ.

2) Wpływ łusek na zmiany temperatury ciała.

Ta część badań będzie składała się z dwóch eksperymentów. Pierwszy dotyczący przewodnictwa zostanie przeprowadzony za pomocą metody opisanej w pracy Lichta i Bennetta (1972). Każdy z węży, przebywający w temperaturze 27°C zostanie ochłodzony do temperatury 15°C, po czym ponownie ogrzany do 27°C, w wyniku przeniesienia do pomieszczeń o odpowiedniej temperaturze. Mierzone będzie tempo chłodzenia i ogrzewania się osobników. W drugim eksperymencie tempo nagrzewania się węża w wyniku promieniowania będzie zmierzone w czasie naświetlania węża lampą grzewczą w pomieszczeniu o temperaturze 23°C, po uprzednim ochłodzeniu go do 15°C. We wszystkich przypadkach obserwacje tempa ochładzania lub ogrzewania się zostaną przeprowadzone przy użyciu kamery termowizyjnej oraz termometru umieszczonego w kloace zwierzęcia. Oba doświadczenia zostaną przeprowadzone w 2 powtórzeniach: na węzach w trakcie trawienia posiłku i po pełnym strawieniu.

3) Wpływ łusek na zdolności lokomotoryczne węży.

Pierwsze z doświadczeń z tej serii będzie polegało na zbadaniu szybkości przyspieszania. Wąż zostanie umieszczony tuż przed linią startu poprzez opuszczenie go na równi pochyłej, aby zwierzę nie zaczęło poruszać się przed rozpoczęciem eksperymentu. Tor testowy będzie płaski i wyścielony wykładziną zapewniającą szorstkie podłoże i ograniczony pleksiglasowymi ściankami, uniemożliwiającymi wężowi ucieczkę na boki. Wąż zostanie przestraszony poprzez nagły ruch eksperymentatora połączony z uderzeniem w podłoże w pobliżu węża i ewentualną stymulację ogona zwierzęcia przy użyciu pędzla. Zostanie zmierzony czas, jaki zajmuje wężowi pokonanie 50 cm, poprzez zmierzenie, przy użyciu fotokomórek, w którym momencie głowa węża przetnie linię startu i mety (metodyka na podstawie pracy Plummer 1997).

Drugie doświadczenie, dotyczące prędkości poruszania się na płaskim podłożu, zostanie przeprowadzone w podobny sposób do poprzedniego, z tym, że wąż będzie musiał przebyć odległość 5m i będzie stale stymulowany poprzez muskanie końca ogona pędzlem. Tak jak poprzednie, doświadczenie to zostanie przeprowadzone w temperaturze 27°C.

Ostatnie z doświadczeń z tej serii będzie dotyczyło umiejętności wspinania się. Wąż zostanie umieszczony w wysokim terrarium w temperaturze 23°C, suboptymalnej dla węży zbożowych. O jedną ze ścian terrarium będzie oparty ścinek drewna liściastego szerokości terrarium i wysokości 120 cm, pokryty naturalną, chropowatą korą (np. dębu, lipy lub klonu), nachylony pod kątem 80 stopni, aby ułatwić zwierzęciu wspinaczkę. Nad tą ścianką zostanie umieszczone źródło ciepła: lampa grzewcza, stanowiące zachętę do wspinaczki. W czasie 3 godzin przebywania zwierzęcia w terrarium doświadczalnym będzie notowana liczba nieudanych prób wspinaczki i czas wejścia, jeśli zwierzęciu uda się dostać na szczyt ścinki.

4) Wpływ łusek na obecność ektopasożytów oraz patogenów skórnych.

W tym eksperymencie węże będą trzymane w osobnych schronieniach na otwartej przestrzeni. Miejscem przeprowadzenia badań będzie sucha łąka o heterogennej strukturze, na której w dwumetrowych odstępach zostaną rozmieszczone klatki o drobnych oczkach. Dolna ścianka zostanie wkopana w ziemię, a dno klatki zostanie pokryte darnią z łąki. W każdej klatce wąż będzie miał do dyspozycji naczynie z wodą, kryjówkę oraz miejsce zadaszone na wypadek pogorszenia pogody.

Badania będą trwały dwa miesiące: lipiec oraz sierpień. Co tydzień węże będą karmione oraz sprawdzane pod kątem obecności pasożytów oraz infekcji skórnych. W tym celu każdy osobnik będzie przeniesiony do pudełka wyłożonego białym papierem. Zliczane będą roztocza, które zostaną zaobserwowane na wężu oraz te, które uciekną ze zwierzęcia, a także kleszcze, usuwane po każdym oględzinach. Do analiz brana będzie pod uwagę suma pasożytów dla każdego osobnika oraz obecność lub brak infekcji skórnych.

Analiza statystyczna

Do wyników wszystkich eksperymentów zostanie zastosowany ogólny model liniowy (GLM). W każdym modelu obecność łusek i płeć będą traktowane jako czynniki ustalone, przynależność do miotu będzie czynnikiem ustalonym, a masa zwierząt będzie kowariatą. W eksperymentach dotyczących utraty wody (1) i zmian temperatury ciała (2) czynnikiem ustalonym będzie również stan fizjologiczny (trawienie lub po trawieniu). Eksperymenty dotyczące utraty wody (1) i lokomocji (bez wspinaczki) (4) będą przeprowadzone kilkakrotnie dla każdego osobnika i numer zwierzęcia będzie zagnieżdżonym czynnikiem losowym. Do analizy tempa wzrostu (5) zostanie wykorzystana technika *repeated measures ANOVA*.

Literatura

Bennett, A. F., i Licht, P. (1975). Evaporative water loss in scaleless snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 52(1), 213-215.

Dupoué, Andréaz, et al. "Physiological state influences evaporative water loss and microclimate preference in the snake *Vipera aspis*." *Physiology & behavior* 144 (2015): 82-89.

Licht, P., i Bennett, A. F. (1972). A scaleless snake: tests of the role of reptilian scales in water loss and heat transfer. *Copeia*, 702-707.

Lissmann, H. W. (1950). Rectilinear locomotion in a snake (*Boa occidentalis*). *Journal of Experimental Biology*, 26(4), 368-379.

Marvi, H., i Hu, D. L. (2012). Friction enhancement in concertina locomotion of snakes. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(76), 3067-3080.

Plummer, M. V. (1997). Speed and endurance of gravid and nongravid green snakes, *Opheodrys aestivus*. *Copeia*, 191-194.

Toni, M., i Alibardi, L. (2007). Soft epidermis of a scaleless snake lacks beta-keratin. *European Journal of Histochemistry*. 51(2), 145-151.

Wegener, J. E., Gartner, G. E., i Losos, J. B. (2014). Lizard scales in an adaptive radiation: variation in scale number follows climatic and structural habitat diversity in *Anolis* lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(2), 570-579.

Informacje o dostępnej w hodowli formie bezłuskich węży zbożowych pochodzą ze strony: http://www.scaleless-cornsnake.com/collection_eng.html

Koszty

Pozycja	Fundusze na każdy rok badań (zł)			Razem
	2016	2017	2018	
1. Koszty bezpośrednie, w tym:	87885	30050	42050	159985
1/ Wynagrodzenia	24000	24000	24000	72000
2/ Aparatura	12425	-	-	12425
3/ Inne	51460	6050	18050	75560
2. Koszty pośrednie	15092	6010	8410	29512
Razem	102977	36060	50460	189497

Koszty wynagrodzeń obejmują wypłaty 1000 zł miesięcznie dla dwóch osób przez okres trzech lat.

Aparatura obejmuje koszty terrariów, klatek zewnętrznych, kamery termowizyjnej z pirometrem, fotokomórek i urządzeń regulujących temperaturę i wilgotność w pomieszczeniu dla węży. Koszty sprzętu są niewielkie ze względu na wykorzystanie komór respirometrycznych obecnych w Instytucie Nauk o Środowisku UJ.

Inne koszty bezpośrednie obejmują koszt:

- zakupu węży (koszt węży bezłuskich 12*4000 zł, węże z łuskami 12*150zł). Planujemy zakup dwóch dodatkowych węży z każdej grupy na wypadek, gdyby któreś zwierzę padło.
- pokarmu dla zwierząt (karmienie węży w pierwszym roku wyniesie 1080 zł, a w kolejnych latach 1920 zł)
- wyjazdu na dwie konferencje (koszt wyjazdu dwóch osób na jedną konferencje wyniesie 4000 zł)
- wydania dwóch publikacji (koszt opublikowania jednej publikacji w systemie Open Access wyniesie 6000 zł)

2. Dorastanie w towarzystwie osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

Dorastanie w otoczeniu osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny

*Anna Giermek / Paulina Koszyła / Małgorzata Lipowska
Uniwersytet Jagielloński, Instytut Nauk o Środowisku*

Streszczenie projektu

W środowisku występują liczne czynniki fizyczno-chemiczne i psychologiczne, które mogą wywołać stres o różnorodnej sile. Choć osobniki poddane stresowi krótkotrwałemu poprawiają wydolność organizmu i taka sytuacja działa na nie korzystnie, stres chroniczny sprawia, że organizm zostaje nadwyrężony i pomimo początkowego wzrostu wydolności skutkuje to niekorzystnymi zmianami w jego funkcjonowaniu.

Przebywanie w otoczeniu, które nie jest naturalne jest jednym z najsilniejszych bodźców wywołujących stres. W projekcie chcemy skupić się na problemie dorastania i dojrzewania w otoczeniu osobników wykazujących odmienne wzorce zachowań. Młode samice myszy, w dniu odstawienia od matki, znajdują się w towarzystwie zwierząt o diametralnie różniącym się od nich zachowaniu. Część samic zamieszka z osobnikami nadpobudliwymi ruchowo, część będzie dorastała w otoczeniu linii myszy, które są ospałe, mało ruchliwe, większość czasu spędzają na jedzeniu i mają skłonność do nadwagi oraz depresji, a pozostałe samice będące grupą kontrolną będą dzielić klatkę z myszami podobnymi do siebie pod względem zachowania.

Chcemy sprawdzić w jaki sposób młode samiczki reagują na odmienne od siebie towarzystwo i czy starają się dopasować do nich swoje nawyki behawioralne. Głównym celem projektu jest sprawdzenie jak mocno doświadczanie niedopasowania do grupy wpływa na podniesienie się poziomu stresu oraz czy skutkuje to obniżeniem późniejszego sukcesu reprodukcyjnego.

Celem projektu jest odpowiedź na pytanie w jakim stopniu grupa zwierząt w której przebywa samica w okresie dojrzewania ma wpływ na doświadczany przez nią stres, jej behavior i fizjologię, a w konsekwencji na sukces reprodukcyjny i jakość potomstwa. Postulujemy, że samice dorastające w grupie rówieśników o odmiennych od niej zachowaniach są narażone na stres, wynikający z niedopasowania do otoczenia, a ponadto mogą próbować powielać zaobserwowane wzorce. Narażenie na taki rodzaj stresu w okresie dojrzewania może mieć konsekwencje w dorosłym życiu, powodując między innymi zmniejszony sukces reprodukcyjny i spadek jakości potomstwa.

Cel naukowy projektu

(jaki problem naukowy wnioskodawca podejmuje się rozwiązać, hipotezy badawcze)

Główna hipoteza projektu: Dorastanie w otoczeniu osobników o odmiennych nawykach behawioralnych jest stresorem i ma wpływ na sukces reprodukcyjny.

Przewidywania:

- a) samice dorastające w otoczeniu rówieśników o odmiennych nawykach behawioralnych będą narażone na silniejszy stres niż samice dorastające w grupie nie różniącej się zachowaniem;
- b) osobniki przebywające w grupie o odmiennych nawykach behawioralnych będą starały się do niej dopasować zmieniając swoje dotychczasowe zachowania;
- c) stopień oddziaływania grupy będzie różny w zależności od rodzaju przejawianych przez nią zachowań – dorastanie w grupie nadpobudliwej będzie wywoływać wyższy poziom stresu niż wzrost w grupie ospalej ze skłonnością do otyłości;
- d) stres związany z odmiennością od grupy w okresie dojrzewania obniży sukces rozrodczy samic oraz jakość ich potomstwa

Hipotezy wynikające z poszczególnych eksperymentów:

Eksperyment 1:

- W jakim stopniu dorastanie w grupie osobników o odmiennych nawykach behawioralnych jest czynnikiem stresogennym dla samic?
- Czy młodociane samice dorastające w grupie rówieśników wykazujących odmienne wzorce zachowania będą przejmowały ten wzorec?

Eksperyment 2:

- Czy dorastanie w środowisku stresogennym związanym z przebywaniem w grupie zwierząt wykazującej odmienne wzorce zachowań wpływa na sukces reprodukcyjny?
- Czy jakość potomstwa samic, które dojrzewały w warunkach stresu socjalnego różni się od potomstwa samic niestresowanych?

Znaczenie projektu

(dotychczasowy stan wiedzy, uzasadnienie podjęcia problemu badawczego, uzasadnienie nowatorskiego charakteru badań, znaczenie wyników projektu dla rozwoju danej dziedziny i dyscypliny naukowej oraz rozwoju cywilizacyjnego)

Większość organizmów, w tym ludzie, jest narażona na działanie stresu na różnych etapach swojego życia. Wielu badaczy stara się zrozumieć i przewidzieć w jakim stopniu i w jaki sposób stres wpływa na osobniki, populacje a nawet całe ekosystemy (Brooks-Gunn i wsp, 1989). Interesującym i rozpracowywanym na wielu gatunkach zagadnieniem jest także odpowiedź na pytanie po jakim czasie od ekspozycji na stres można wciąż obserwować jego efekty i negatywne konsekwencje (Pryce i wsp. 2002). Badania dotyczące stresu w większości są prowadzone na osobnikach dorosłych lub oseskach (Pryce i wsp., 2002), a lekceważone są osobniki młodociane, które są najbardziej wrażliwe na wpływ otoczenia, nie mają doświadczenia ani wytworzonych mechanizmów niwelujących negatywne skutki stresu. W istocie, niektóre prace sugerują, że stres w okresie dorastania może trwale wpłynąć na zachowanie osobników dorosłych (Avital i wsp., 2005; Buwalda, 2011).

Analizowanym w licznych pracach i na rozmaitych gatunkach czynnikiem jest stres wynikający z przegęszczenia (Burroni i wsp., 2014), jednak przez wysoce socjalny charakter wielu gatunków, takich jak na przykład mysz, równie istotnym czynnikiem wpływającym na zdrowie i rozród może być stres spowodowany niedopasowaniem do grupy. W projekcie chcemy skupić się na problemie stresu wywoływanego istnieniem wyraźniej różnicy między badanym osobnikiem a grupą rówieśników, który dotyka osobniki w okresie dojrzewania. W odróżnieniu od innych, przeprowadzonych badań, chcemy skupić się na osobnikach młodocianych, które są

odstawione od matki i przechodzą przez okres dojrzewania. Dorastanie w grupie rówieśników wykazujących odmienne wzorce zachowania może być czynnikiem silnie stresogennym, ponadto próby zmiany zachowania i dostosowania się do grupy dodatkowo mogą zwiększyć stres.

Badania będą przeprowadzane na gatunku modelowym - myszy domowej, który jest gatunkiem socjalnym dlatego ważne są dla niego interakcje w obrębie grupy, a niedopasowanie do niej może być wysoce stresujące. Stres może skutkować znaczącymi zmianami w zachowaniu i fizjologii wpływając na obniżenie sukcesu reprodukcyjnego (Burroni i wsp., 2014). Do badań wybrano samice, ponieważ to one ponoszą wyższe niż samce koszty produkcji i wychowywania potomstwa, z racji czego stres wywiera silniejszy efekt na ich zdolność do rozrodu.

Wiele podstawowych mechanizmów, w tym działanie stresu, jest powtarzalnych w różnych grupach kręgowców, a wyniki tych badań mają ogólne zastosowanie i mogą być interpretowane w kontekście różnych gatunków, w tym ludzi (Mariano i Harton, 2005). Wyniki dotyczące związku między grupą socjalną a fizjologiczną odpowiedzią organizmu mogą mieć też implikacje w obszarze nauk biomedycznych (Cohen i wsp., 2007).

Koncepcja i plan badań

(ogólny plan badań, szczegółowe cele badawcze, wyniki badań wstępnych)

Młode samice odstawiane od matki zostaną umieszczone w grupach niespokrewnionych z nimi zwierząt tej samej płci i wieku. Grupy do których trafią młode samice będą zróżnicowane pod względem standardów zachowania się jej członków – badane zwierzę może albo trafić do klatki podobnych sobie zwierząt z tej samej linii lub osobników, u których w wyniku mutacji wykształciła się skłonność do zachowań hiperaktywnych lub ospałości i jedzenia ponad miarę.

Następnym krokiem będzie zbadanie czy i w jakim stopniu zwierzęta dostosują się do zachowania pozostałych zwierząt w klatce i stresu z tym związanego. Długotrwały stres może mieć długofalowe skutki negatywnie wpływające na fizjologię i sukces reprodukcyjny organizmu, co zostanie zbadane poprzez pomiar poziomu hormonów we krwi i rozmnożenie samic dorastających w różnym towarzystwie oraz określenie jakości ich potomstwa.

Metodyka badań

(sposób realizacji badań, metody, techniki i narzędzia badawcze, metody analizy i opracowania wyników, urządzenia i aparatura wykorzystywane w badaniach)

Badania zostaną przeprowadzone na myszy laboratoryjnej (*Mus musculus*) z wykorzystaniem zwierząt należących do trzech różnych szczepów (c57bl/6j; B6.129S4-Pm^{chtm1}Emf/J; ob/ob). Hodowla będzie przeprowadzona w warunkach standardowych, w zwierzętarni należącej do Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Do badania zostaną wybrane myszy odstawiane od matki w tym samym czasie, w jednakowym wieku - 20 dni. Po odstawieniu zwierzęta trafią do standardowych klatek hodowlanych, po 4 niespokrewnione zwierzęta tej samej płci na klatkę i będą przebywać w niezmiennych grupach przez następne 20 dni.

Grupy zostaną uformowane w następujący sposób: z dziesięciu miotów myszy c57bl/6j zostaną wybrane po trzy samice. Trójki siostr z jednego miotu zostaną rozdzielone tak, by poszczególne samice trafiły do różnych grup wykazujących trzy różne typy nawyków behawioralnych. Każda z samic przed umieszczeniem w nowej klatce zostanie wyraźnie oznakowana przez wpięcie kolorowego kolczyka w ucho.

W każdej klatce, do której będą trafiać badane zwierzęta, znajdą się też 3 inne, niespokrewnione z nim ani ze sobą nawzajem samice, tworzące grupę rówieśników pośród których osobnik będzie dojrzewać. Grupy będą dzielić się na 3 rodzaje:

- K – kontrolna (10 klatek) – cztery niespokrewnione ze sobą samice z linii c57bl/6j, z czego jedna, zakolczykowana i mająca rodzeństwo w pozostałych dwóch rodzajach grup, jest traktowana jako właściwy obiekt badania;
- A – aktywna (10 klatek) – jedna samica c57bl/6j traktowana jako właściwy obiekt badania i trzy samice z hiperaktywnej linii B6.129S4-Pm^{chtml}Emf/J;
- O – otyła (10 klatek) – jedna samica c57bl/6j traktowana jako właściwy obiekt badania i trzy samice z wykazującej się tendencją do otyłości i ospałości linii ob/ob.

Eksperyment 1:

Pierwszego i ostatniego (20 dnia) przebywania razem wszystkie zwierzęta w klatce zostaną zważone, zmierzone pod względem szerokości głowy i zachowania w klatce hodowlanej. Obserwacja zachowania będzie przeprowadzona w warunkach możliwie neutralnych dla zwierząt, poprzez dziesięciokrotne zajrzenie przez badacza do wnętrza klatki dwukrotnie w ciągu doby - dzień i nocy, kiedy zwierzęta są bardziej aktywne. Przy każdej takiej obserwacji zostanie odnotowana czynność przy której badacz zastał badaną samicę i jej towarzyszy z klatki. Porównanie masy zwierząt i procentowego udziału odpoczynku, biegania, jedzenia i pielęgnacji w stosunku z pozostałymi zwierzętami w klatce ma na celu określenie, czy nastąpiło ujednolicenie schematów zachowania lub apetytu (przekładającego się na zbliżoną masę ciała współbytujących osobników).

Dwudziestego dnia od utworzenia grup zostaną one rozwiązane, a od zakolczykowanych zwierząt zostanie pobrana krew. Na bazie pobranych próbek zostanie wykonany szereg testów: pomiar poziomu hormonów (kortyzolu, kortykosteronu, estrogenu, CRF) (Bale i Vale, 2004; Maxwell, 1993) i liczby białych krwinek (Maxwell, 1993). Badane hormony pozwolą nam stwierdzić poziom stresu zwierzęcia, a estrogen dodatkowo umożliwi stwierdzenie, czy odbiegające od optymalnych warunki życia negatywnie wpłynęły na poziom kluczowych czynników związanych z rozrodem. Stężenie hormonów zostanie określone z użyciem testu ELISA, a do uzyskania parametrów morfologii krwi zostanie wykorzystany analizator hematologiczny znajdujący się w wyposażeniu Zakładu Biotechnologii Medycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Eksperyment 2:

Czterdziestego dnia życia samice z wszystkich trzech grup zostaną połączone w pary z samcami w zbliżonym wieku, chowanymi w warunkach analogicznych do samic z grupy K i umieszczone w klatkach rozrodczych. Utworzonych zostanie w ten sposób 30 par złożonych z samic dorastających w towarzystwie osobników o odmiennych nawykach behawioralnych i samców o masie ciała odpowiednio zrandomizowanej dla każdej z grup.

Po urodzeniu się miotów z tak powstałych par zostanie odnotowany wiek samicy w dniu porodu, liczba młodych i ich masa urodzeniowa. Dalsza obserwacja pozwoli również określić przeżywalność potomstwa przez pierwsze 20 dni życia. Masa ciała młodych będzie też mierzona codziennie do momentu odstawienia od matki, w celu prześledzenia ich tempa wzrostu. W 20 dniu życia od młodych zostanie pobrana krew w celu zbadania jej morfologii (liczba białych i czerwonych krwinek, ilość hemoglobiny we krwi) i poziomu hormonów stresu (kortykosteronu, kortyzolu i CRF).

Analizy statystyczne:

Podobieństwo zachowania i masy ciała w obrębie klatki zostanie sprawdzona testem T dla grup zależnych. Różnice między grupami społecznymi i wyniki badań próbek krwi zostaną sprawdzone testem ANOVA, z uwzględnieniem pokrewieństwa i rodzaju grupy do której przydzielono zwierzę jako predyktorów i każdej z mierzonych wielkości jako zmiennej zależnej.

Do analizy jakości młodych użyta zostanie ANCOVA, uzupełniona o masę ciała matki jako kowariatę.

Literatura

Avital A, Richter-Levin G (2005) Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 8, 163-173

Bale TL, Vale WW (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44, 525-557.

Brooks-Gunn J, Warren MP (1989) Biological and social contributions to negative affect in young adolescent girls *Child Dev.*, 60, 40-55

Burroni, N, Loetti, MV, Busch, M (2014). Reproductive success in *Mus musculus* (Rodentia) exposed to conspecific's odors and overcrowding in laboratory conditions. *Mastozoologia neotropical*, 21(1), 115-120.

Buwalda B, Kole M, Veenema AH, Huining M, Boer de SF, Kort SM, Koolhaas JM (2005) Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), 83-97.

Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas J.M (2011) Social behavior and social stress in adolescence: A focus on animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(8), 1713-1721

Cohen, S, Janicki-Deverts, D, Miller, GE (2007). Psychological stress and disease. *Jama*, 298(14), 1685-1687.

Maxwell MH (1993) Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poultry Science Journal*, 49(1), 34-43.

Mariano, KA, Harton, HC (2005). Similarities in aggression, inattention/hyperactivity, depression, and anxiety in middle childhood friendships. *Journal of Social and Clinical Psychology*, 24(4), 471-496.

Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Feldon J (2002) Early Life Stress: Long-Term Physiological Impact in Rodents and Primates. *Physiology*, 17(4), 150-155.

Kosztorys

Przewidywany czas trwania eksperymentu to pięć miesięcy, z czego trzy miesiące wymagają wynajęcia zwierzętarni i ponoszenia kosztów opieki nad zwierzętami, a pozostałe dwa miesiące przeznaczone są na przygotowanie eksperymentu i pracę z danymi.

Koszty	Fundusze (zł)
1. Koszty bezpośrednie	102300
1.1 Wynagrodzenia	30000
1.2 Wyposażenie	39800
Wynajem zwierzętarni z wyposażeniem	27000
Sprzęt do pobrania i analiz krwi	12800
1.3 Inne koszty bezpośrednie	32500
Zwierzęta	29100
Środki związane z utrzymaniem zwierząt	1400
Inne koszty	2000
2. Koszty pośrednie	12500
Całość kosztów	114800

RECENZJE

Recenzja projektu pt.

„Dorastanie w otoczeniu osobników odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny”

Projekt dotyczy wpływu warunków socjalnych na poziom stresu, a w dalszej perspektywie na efektywność reprodukcji, u osobników eksponowanych na stres w wieku dojrzewania. Autorki odnalazły lukę w wiedzy, którą postanowiły wypełnić i faktycznie na pierwszy rzut oka wydaje się to sensowne. Niemniej jednak trochę dziwi mnie pomysł, że zwyczaje żywieniowe innych osobników mogą być stresujące. Nie rozumiem też, dlaczego mniejsza lub większa aktywność towarzyszących osobników ma wywoływać stres. Czy są ku temu jakieś przesłanki? W tekście takich przesłanek nie odnalazłem, poza samym stwierdzeniem autorek, że jest to możliwe. Czy raczej nie należy spodziewać się stresu w momencie gdy pozostałe osobniki w grupie przejawiają agresję lub gdy stanowią konkurencję pokarmową (a w tym eksperymencie pokarm nie jest limitowany, a przynajmniej nigdzie tak nie napisano)?

Zastanawia mnie dobór obiektu badań. Skąd wiadomo, że myszy z badanego szczepu nie wykształciły na drodze selekcji innych cech, skorelowanych, np. cech związanych z odpornością na stres bądź cech związanych z wydolnością reprodukcyjną? A być może pozostałe dwa szczepy, ospały i nadaktywny, wykazują dodatkowe zachowania, które mogą wpływać na wynik (np. wspomniana agresja u szczepu aktywnego? tylko, że wtedy wynik nie byłby rezultatem aktywności tych myszy, ale ich agresji).

We wstępnie metodyki schemat podziału myszy do grup mógłby ułatwić zrozumienie układu eksperymentalnego, ale jest to raczej wskazówka niż krytyka. Opisane eksperymenty budzą kilka wątpliwości. Po co mierzyć szerokość głowy? Po co będą badane białe krwinki (to samo z badaniami krwi w drugim eksperymencie)? Jakie to ma odniesienie do tematu badań? Po co mierzyć estrogen? Rozumiem, że jest to hormon o ważnej roli w rozrodcie, ale skoro sukces reprodukcyjny i tak będzie mierzony to po co tracić czas i pieniądze na mierzenie poziomu estrogenu? Czy nie lepiej nagrywać zachowania tych myszy? Czy zajrzenie do klatki nie wywoła reakcji ucieczki, przez co wyniki tak naprawdę przyniosą niewiele informacji? Czy samo zajrzenie 10 razy na dobę będzie stanowić reprezentatywną próbę (zajrzenie kojarzy się raczej z krótkim momentem, 10 takich kilkusekundowych momentów na dobę to niewiele). Czy zatem opis podobieństwa pomiędzy osobnikami badanymi a ich grupą socjalną jest wiarygodny? Czy procedura zajrzenia do klatki nie wywoła innej reakcji u myszy badanej i jej grupy? Jeśli tak to też wcale nie znaczy to o różnicach dotyczących wybranych miar zachowania (takich jak bieganie, żerowanie), ale o różnicy w tej konkretnej reakcji. Dlaczego eksperyment będzie trwał tylko 20 dni? Czy jest to wystarczający czas aby zauważyć zmiany w behawiorze osobników? Czy autorki wzięły pod uwagę, że ewentualne zmiany w zachowaniu myszy mogą nastąpić dopiero po jakimś czasie, a więc pierwsze obserwacje mogą nie wykazać żadnych zmian, a przez to ich uwzględnienie w analizie statystycznej może osłabić wnioskowanie? Czy zatem nie warto wziąć pod uwagę w analizie czasu od momentu utworzenia grup do wystąpienia pierwszych wyraźnych zmian w zachowaniu? Dlaczego zachowanie nie będzie badane u myszy przed wprowadzeniem ich do warunków eksperymentalnych?

W analizie statystycznej nie wzięto pod uwagę, że w klatce przebywa jeden osobnik badany i 3 z którymi jest porównywany. To sprawia, że liczba rekordów dla osobników towarzyszących jest znacznie większa – czy te 3 osobniki będą jakoś uśredniane albo czy obserwacja zachowania będzie wykonana dla jednego losowo wybranego osobnika z tej grupy? Czy autorki wzięły pod uwagę, że zmienność zachowań może być bardzo duża w obrębie grupy osobników towarzyszących?

Z innych uwag - warto na początku tekstu wyjaśnić znaczenie nazw szczepów (np. szczep XYZ to myszy ospałe). Nazwy szczepów pojawiają się w tekście zanim zostają wyjaśnione, co może wprowadzać lekkie zamieszanie u czytelnika. Ponadto mało kto zapamięta, że nazwa złożona z kilku liter i numerów odnosi się np. do myszy ospałych. Może lepiej, dla większej klarowności tekstu od razu wprowadzić określenia zamiennie. Podobnie warto wyjaśnić skrót CRF. Streszczenie projektu zawiera wszystkie najważniejsze informacje nt projektu, jest jednak nieco zbyt długie. Miejscami tekst zawiera powtórzenia, które można usunąć, skracając jego objętość. W tekście stwierdzono, że stres krótkotrwały ma korzystny wpływ na funkcjonowanie organizmu. Czy na pewno? Czy krótkotrwały, ale bardzo silny wpływ określonego stresora, zwłaszcza jeśli nie jest to stresor psychologiczny, nie może trwale uszkodzić organizmu?

Kosztorys jest mało precyzyjny. Podane są fundusze za całość rzeczy lub usługi, które mają zostać opłacone, jednak nie daje to żadnej informacji o cenach jednostkowych (np. ceny myszy – wg kosztorysu to aż 29 tysięcy złotych, jaka jest cena pojedynczego osobnika? Czy jeśli te szczepy są rzeczywiście aż tak drogie to nie lepiej kupić pary, które zostaną rozmnożone, zamiast

docelowej grupy eksperymentalnej?). Nie wiadomo co kryje się pod sprzętem do pobierania i analiz krwi i to samo tyczy się innych elementów budżetu. Czytelnik może mieć wrażenie, że podane kwoty są zaplanowane ze sporym zapasem, co może budzić pewne wątpliwości co do zasadności tych kosztów biorąc pod uwagę niepewne założenia projektu.

Podsumowując – podejście do zagadnienia stresu jest ciekawe. Większość dotychczasowych badań na kręgowcach skupia się na innych źródłach stresu, niemniej jednak w niniejszym projekcie założenia są dość słabo ugruntowane, a układ badawczy wymaga dopracowania. Ponadto badanie tanie nie są, więc tym bardziej byłbym ostrożny z przyznaniem dla nich finansowania. Ponad 100 tysięcy na półroczny eksperyment to ryzykowne przedsięwzięcie.

Stanisław Bury

Recenzja projektu „Dorastanie w otoczeniu osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny”

Pomysł zbadania wpływu środowiska społecznego na poziom stresu i zachowanie młodocianych zwierząt żyjących w grupach społecznych wydaje mi się bardzo ciekawy, aczkolwiek sposób sformułowania problemu i metodologia budzą moje wątpliwości.

W uzasadnieniu brakuje mi podkreślenia skutków proponowanych badań na inne prace prowadzone na myszach. Ewentualna konieczność uwzględniania środowiska społecznego w klatce byłaby ważną bezpośrednią konsekwencją projektu.

Nie jest dla mnie jasne dlaczego w doświadczeniach zaplanowano mierzenie sukcesu rozrodczego. Autorki przewidują, że sytuacje społeczne mogą wpływać na poziom stresu zwierząt, a z kolei stres może wtórnie wpłynąć na liczbę i jakość potomstwa. Jednak wpływ stresu na rozrodczość u myszy jest dobrze znany i opisany w wielu pracach. Nie sądzę więc, by badanie tego drugiego zjawiska wniosło coś istotnie nowego do obecnej wiedzy.

W kwestiach bardziej metodycznych przewiduję, że pierwszego dnia przebywania w nowej klatce u myszy może dominować stres wywołany zmianą otoczenia, obecnością obcych zwierząt oraz oddzieleniem od matki. Z tego powodu trudno traktować zachowanie zwierzęcia na tym etapie jako normalne i wyjściowe dla późniejszych porównań. Być może lepiej byłoby po raz pierwszy obserwować behavior myszy, gdy jeszcze przebywa ona w klatce z matką i rodzeństwem.

Pomiar poziomu hormonów stresu pod koniec doświadczenia również może nie być dobrym pomysłem. Trudno powiedzieć, jak szybko młode myszy adaptują się do nowych warunków społecznych, ale całkiem prawdopodobne, że 20 dnia jest już za późno i badane zwierzęta są w pełni przyzwyczajone do nowych koleżanek. Zaproponowane doświadczenie nie jest też w stanie rozstrzygnąć, czy ewentualne różnice w poziomie hormonów pomiędzy grupami doświadczalnymi wynikałyby rzeczywiście ze stresu wywołanego zmianą środowiska społecznego. Być może przedstawicielki niektórych szczepów są „obiektywnie” bardziej uciążliwe dla współlokatorów, nawet jeśli zwierzęta już wcześniej się znają.

Na wykonanie projektu jest przeznaczony bardzo krótki czas. Stwarza to ryzyko, że jeśli cokolwiek pójdzie niezgodnie z planem, projektu nie uda się doprowadzić do końca. Jeśli nie ma zewnętrznych ograniczeń, lepiej byłoby zarezerwować więcej czasu.

Jeśli chodzi o sam opis projektu, to dobrze byłoby trochę wygładzić jego język. Dotyczy to zwłaszcza streszczenia, które przydałoby się uporządkować oraz uczynić bardziej zwięzłym i spójnym. Również tytuł mógłby być sformułowany w sposób bardziej atrakcyjny. Podoba mi się jasny sposób sformułowania przewidywań badawczych. Jednak zbijają z tropu przedstawione dalej hipotezy (w formie pytań), bo jest ich tyle samo, co przewidywań, ale nie zawsze są ich odpowiednikami.

Podsumowując, projekt byłby obiecujący, lecz wymaga lepszego przemyślenia i uporządkowania opisu.

Marta Czarnocka-Cieciura

Ocena merytoryczna:

Projekt napisany jest przejrzysto i spójnie. Jednak zauważam pewne błędy. Stres krótkotrwały może być czynnikiem motywującym, jednak wiele stresów o tym charakterze może przejawiać bardzo negatywne skutki, zakończone nawet śmiercią. Odmienne wzorce zachowań to nie całkiem naturalne środowisko. Myszy żyjące w stadach również doświadczają odmiennych zachowań współtowarzyszy. Ciężko implikować to do ekstremalnych warunków przedstawionych w doświadczeniu. Z drugiej strony czynnik stresowy może nie być wystarczający i samice mogą nie przejawiać objawów stresu. Wtedy druga część eksperymentu nie będzie miała uzasadnienia.

Wybór osobników młodocianych wydaje się interesujący i uzasadniony. Stanowi mocną stronę projektu. Badania nad zachowaniami socjalnymi są interesujące dla specjalistów, a poprzez porównania do człowieka, i dla szerokiego grona odbiorców.

Metodyka:

Schemat doświadczenia wydaje się być prawidłowy. Jednakże nie rozumiem decyzji o wyborze myszy ze skłonnościami do otyłości, zwłaszcza że przedstawione są jako potulne i mało inwazyjne. Czy istnieją przesłanki do tego, że mysz będzie zestresowana w takim środowisku? Jeśli mysz zacznie pod wpływem współtowarzyszy pobierać więcej pokarmu to sama otyłość jako czynnik fizjologiczny wywoła u niej zwiększone wydzielanie kortyzolu i zmianę parametrów krwi. Według mnie trudno będzie wykazać bezpośredni skutek stresu behawioralnego, bo przesłoni go stres związany ze zmianą fizjologiczną.

Kosztorys:

Przeprowadzony prawidłowo. Może warto by zaplanować konferencję promującą badania.

Wykonalność:

Badania oparte są na bardzo ciekawym założeniu i przetestowanie hipotez, zwłaszcza o przejmowaniu wzorców socjalnych, wydaje się wartym wykonania.

Jowita Niedojadło

Recenzja projektu: „Dorastanie w otoczeniu osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny”

Projekt podejmuje pytanie o to, jak na poziom stresu młodocianych osobników myszy domowej wpływa obecność w grupie socjalnej osobników o odmiennym behawiorze. Temat jest o tyle ciekawy, że może on zainteresować nie tylko specjalistów wykorzystujących myszy w celach badawczych, ale również ogólne grono odbiorców, gdyż tematyka behawioru zwierząt jest bardzo popularnym zagadnieniem, szczególnie gdy możemy się spodziewać odniesień do zachowania ludzi. W projekcie wartościowe jest postawienie pytań nie tylko o krótkotrwały wpływ grupy socjalnej na stres osobniczy, ale także o efekt tego wpływu już na etapy dorosłego życia, jak sukces reprodukcyjny i jakość urodzonych młodych. Uważam, że badania są dobrze zaprojektowane i logicznie poprowadzone, a sam projekt czytelnie i poprawnie napisany.

Mam jednak kilka uwag do stwierdzeń i założeń projektu oraz układu eksperymentalnego.

W streszczeniu pada zdanie, że krótkotrwały stres pozytywnie wpływa na zwierzęta. Wydaje mi się, że krótkotrwały, ale bardzo intensywny stres mógłby spowodować efekt odwrotny. W części dotyczącej znaczenia projektu pojawiają się dane o wpływie stresu na osobniki dorastające, nie dodano jednak o jakie organizmy chodzi i jakiego typu był to stresor.

W założeniach metodycznych jedną z grup generujących stres są myszy ospałe ze skłonnością do otyłości. Zastanawiam się, czy faktycznie takie myszy mogą wpłynąć negatywnie na inne osobniki, i jeśli tak, to w jaki sposób. W przewidywaniach oddziaływanie myszy nadpobudliwych ma wywołać wyższy poziom stresu niż myszy ospałych, nie ma jednak przewidywań dotyczących przyczyn takiej zależności. Jednym z kolejnych przewidywań jest to, że samice pod wpływem stresu będą się upodabniać do samic o odmiennych zachowaniach. Wydaje się, że samice, jeśli będą pod wpływem stresu, mogą nie tyle upodabniać się do innych, co wykazywać oznaki zestresowania jak na przykład agresja wobec innych osobników czy długotrwałe poruszanie się wzdłuż tej samej trasy. Ciekawe jest, jak kształtują się grupy socjalne u myszy dziko żyjących: czy osobniki o różnych osobowościach żyją w jednej grupie czy raczej składają się one z osobników o podobnym temperamencie oraz jak wygląda behawior stresu u tego gatunku.

W eksperymentach będą wykorzystane trzy grupy badawcze, z czego jedna jest grupą kontrolną. Nie ma jednak w projekcie żadnych informacji, które mówią, jakie nawyki behawioralne przedstawiają samice z tej grupy i czy myszy były wybrane pod kątem podobieństwa osobowości czy jedynie braku cech z linii osobników z grup eksperymentalnych. W eksperymencie 1. krew jest pobierana jedynie po zakończeniu eksperymentu. Wydaje mi się, że wyniki uzyskane w ten sposób mogą nie być wiarygodne. Krew powinna zostać pobrana również przed połączeniem samic w grupy eksperymentalne. Dodatkowo, to w jaki sposób będą prowadzone obserwacje zachowań myszy, nie jest doprecyzowane. Nie wiadomo, jaki będzie czas pojedynczej obserwacji i w jakich dokładnie porach będą się one odbywać. Inną metodą, której zastosowanie można rozważyć, jest wykorzystanie kamer. Zarówno w eksperymencie 1. jak i 2. analizowane są wartości kilku hormonów, ale także niektóre parametry krwi. Brak jest przewidywań, w jaki sposób stres miałby wpływać na te parametry oraz jaka będzie spodziewana zależność pomiędzy jakością młodych myszy a parametrami.

Nie do końca zrozumiałam planowane analizy statystyczne. Ta część projektu musi zostać opracowana bardziej klarownie.

Kosztorys projektu wydaje mi się zawyżony w stosunku do zaplanowanych eksperymentów. Badania mają odbyć się w ciągu jednego roku, co więcej mogą się one prawdopodobnie odbyć w ciągu kilku miesięcy. W kwocie dotyczącej wyposażenia pojawiają się koszty związane ze

sprzętem do pobrania i analizy krwi. Z tekstu zrozumiałam, że do analiz wykorzystany będzie analizator już obecny w jednym z wydziałów UJ. Zakup myszy również jest bardzo kosztowną inwestycją w projekcie trwającym rok. Może udałoby się wykorzystać i przeprowadzić eksperyment na myszach hodowanych w Instytucie Zoologii UJ?

Podsumowując, uważam projekt za bardzo dobrze napisany, po dopracowaniu metod badawczych i schematu eksperymentów oraz po zmniejszeniu kosztów, projekt ma duże szanse na zdobycie dofinansowania.

Agata Rozik

Recenzja projektu „Dorastanie w otoczeniu osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny” autorstwa pań Anny Giermek, Pauliny Kosztyły i Małgorzaty Lipowskiej.

Projekt dotyczy niezwykle ciekawego zagadnienia wpływu otoczenia socjalnego na zachowanie osobnika i związane z tym stres oraz zmiany w sukcesie reprodukcyjnym. Badanym organizmem będzie typowy model w biologii – mysz laboratoryjna. Autorki projektu proponują przetestowanie hipotezy, że przebywanie zwierzęcia w towarzystwie osobników o innych zwyczajach powoduje próbę dostosowania swojego zachowania do otoczenia, a w konsekwencji zwiększenie stresu któremu poddane jest zwierzę i obniżenie sukcesu rozrodczego w dorosłym życiu.

Zarówno cel naukowy jak i znaczenie projektu są opisane zwięźle ale treściwie. Zwróciłbym tylko uwagę że hipotezy nie mogą wynikać z poszczególnych eksperymentów (jak to jest napisane we wniosku) ale że poszczególne hipotezy będą testowane w opisanych eksperymentach.

Koncepcja i plan badań są dosyć lakoniczne – oczekiwałbym większej rozbudowy tej części, nawet kosztem poprzednich – tu właściwie umieściłbym przewidywania co do wyników, a także wymienione w akapitach lub punktach etapy badań.

Metodyka jest opisana szczegółowo i zrozumiale. Do większości zastosowanych metod nie mam zastrzeżeń, ale uwagę przykuwa metoda badania zachowania zwierząt – przez dziesięciokrotne zagładnicie do klatki dwa razy w ciągu doby. Moim zdaniem jest to bardzo słaby punkt metodyki – kto nam zagwarantuje że akurat te obserwacje będą reprezentatywne dla tego co się dzieje w klatkach przez całą dobę? Jaka jest pewność że pojawienie się człowieka w okolicy klatki nie wpłynie na zachowanie zwierząt? Moim zdaniem jedyną drogą do możliwie wiarygodnego zbadania zachowania jest nagrywanie zwierząt 24 godziny na dobę przez jakiś czas, i na podstawie materiału wideo obserwowanie różnic w behawiorze. Oczywiście zwiększa to koszty i jest czasochłonne, ale ostatecznie pozwala uniknąć ww. zarzutów. Ostatecznie, do przeglądania materiałów można zaciągnąć studentów w ramach pisania prac dyplomowych ☺.

Mam jeszcze sugestię co do opisu metodyki – część recenzentów może nie wiedzieć/nie pamiętać jaki poziom hormonów/leukocytów/hemoglobiny/i innych powinien być obserwowany u zwierząt zestresowanych lub o słabej kondycji w stosunku do osobników wyluzowanych i silnych ☺. Warto przy opisie metodyki napisać że przewidujecie np. wolniejsze tempo wzrostu u potomstwa zestresowanych osobników, świadczące o ich niższym dostosowaniu.

Jeśli chodzi o charakter wniosku, to niewątpliwie jest on naukowy oraz spełnia kryteria badań podstawowych, jednocześnie oferując możliwość wykorzystania wyników w działaniach aplikacyjnych i edukacyjnych – zwłaszcza że może mieć odniesienie nawet wobec społeczeństw tworzonych przez ludzi. Spełnia też pozostałe wymagania i jest wykonany rzetelnie. Projekt jest dobry, choć można się przyczepić do liczebności próby, jednak zwiększenie jej znacząco podniosłoby koszty. Jest to projekt stosunkowo nowatorski, częściowo dlatego że wprowadza nową grupę wiekową myszy do badań efektów stresu na zwierzęta, ale głównie dlatego że zajmuje się dotychczas chyba nierozwiązanym eksperymentalnie zagadnieniem wpływu otoczenia socjalnego na próby dostosowania się do „towarzystwa” i stres z nim związany, a także długofalowe jego konsekwencje – nie znając szerzej tematyki badawczej wolałbym być ostrożny w ocenach, ale wg mnie projekt mógłby być perełką wśród badań nad etologią i wpływem stresu ☺. Możliwość wykonania jest niewątpliwie wysoka. Kosztorys jest trochę wysoki jak na projekt trwający poniżej pół roku, częściowo z powodu dosyć wysokich wynagrodzeń. Widzę też dużą dysproporcję pomiędzy kosztem zakupu zwierząt, a kosztem ich utrzymania – czy omawiane szczepy są aż tak kosztowne? Jeśli tak to może da się ograniczyć koszt przez samodzielne rozmnożenie myszy z mniejszej liczby osobników?

Mocne strony:

- interesująca tematyka
- możliwość wykonania
- publikowalność wyników i charakter naukowy
- dobrze zaplanowane badania
- przypuszczalna wyjątkowość projektu

Słabe strony:

- wątpliwości co do metodyki etologicznej części projektu
- częściowo opis koncepcji i planu badań, a także szczegółów metodyki

Bartłomiej Zając

Recenzja projektu „Dorastanie w otoczeniu osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny” A. Giermek, P. Kosztyła i M. Lipowska

Autorki zamierzają sprawdzić czy środowisko doświadczane w czasie dorastania może modyfikować zachowania zwierząt i czy wpływa na poziom stresu. Projekt jest napisany trochę chaotycznie, ale mniej więcej można się zorientować co ma być zrobione i jak. Zdecydowanie brakuje mi genezy problemu. Skąd w ogóle pomysł, żeby badać wpływ dorastania w grupie odmiennych behawioralnie osobników, dlaczego to ważne by te badania przeprowadzić i skąd pomysł na te konkretne myszy laboratoryjne a nie inne?

W rozdziale Cel naukowy, struktura prezentacji jest co najmniej dziwna. Przewidywania tu przedstawione to raczej zbiór luźnych pomysłów niż logiczny ciąg myślowy wynikający z hipotezy badawczej, która może być przyjęta bądź obalona w zależności co trzeba będzie zrobić

z przewidywaniami. Potem nagle pojawiają się jakieś hipotezy bardziej specyficzne i czytelnik dowiaduje się o jakichś tajemniczych (bo nic nie jest wyjaśnione) eksperymentach. Wszystko tu się miesza, bo elementy tych hipotez stanowiły już przewidywania. Można się pogubić, a ogólne wrażenie jakie pozostaje takie, że nie tylko czytelnik jest pogubiony, ale można podejrzewać, że autorki też!

Metodyka:

W sensie formalnym nie mamy tu chyba dwóch osobnych eksperymentów. To jest ten sam eksperyment ze zmianą środowiska dorastania tylko testy dotyczą innych zmiennych. Wprowadza to w błąd czytelnika. Opis tego jak będą rozlokowane osobniki jest trochę chaotyczny. Brakuje tu najważniejszej informacji: jaka będzie wielkość próby, czyli ile będzie klatek K, A i O. Jakie konkretnie cechy behawioralne będą badane podczas zagładania do klatek i jak długo będzie trwała pojedyncza obserwacja? Procentowy udział np. biegania to chyba nie najlepsza miara tego czy myszy stają się hiperaktywne. Należałoby pomyśleć o bardziej wyrafinowanych testach behawioralnych. W jakim celu autorki planują badać morfologię krwi? Są jakieś przewidywania w stosunku do tego? Nie ma ich w każdym razie w celu badań. Mam jeszcze wątpliwości czy zbadanie stresu po 20 dniach coś da. Stresogennych warunków należy spodziewać się na początku po włożeniu zwierząt w nowe środowisko, potem może nastąpić habituacja i myszy mogą nie wykazywać oznak stresu.

Nie są dla mnie jasne zaprezentowane modele Anova. Lepiej były ich nie prezentować niż robić to tak enigmatycznie, bo daje to wrażenie, że same autorki nie bardzo wiedzą co zrobią z uzyskanymi danymi. Co to znaczy „jakość młodych” i w jakim celu ma się kontrolować masę ciała matki przy analizie tej jakości?

Kosztorys:

Koszt projektu jest dość wysoki jak na 5 miesięcy pracy. Niektóre pozycje wprawiają w osłupienie, np. koszt 30tys zł na zakup zwierząt. Kosztorys powinien być zdecydowanie lepiej przemyślany i przede wszystkim recenzent oczekiwałby jakiegoś uzasadnienia tych kosztów.

Mariusz Cichoń

Projekt: Anna Giermek/Paulina Koszyła/ Małgorzata Lipowska

Dorastanie w otoczeniu osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny.

W projekcie Autorki podejmują próbę odpowiedzi na pytanie czy dorastanie w towarzystwie osobników charakteryzujących się odmiennym behawiorem może być czynnikiem stresującym. Parametry jakie podejmują się analizować to zachowanie oraz sukces rozrodczy.

Model badawczy jest niejasny.

Na stronie trzeciej części „Znaczenie projektu” podana jest mysz domowa, natomiast w opisie metodyki badawczej mysz laboratoryjna (*Mus musculus*). Ta ostania jest linią hodowlaną myszy domowej. Z opisu szczepów używanych w opisie wnioskuję, że jest to mysz laboratoryjna.

Badaną płcią są samice, jako te które ponoszą wyższe koszty rozrodu, co ma tutaj jasne uzasadnienie.

Projekt ma charakter naukowy i spełnia kryterium badań podstawowych.

Przygotowany został rzetelnie, aczkolwiek znajduję w nim pewne niedociągnięcia.

- 1) Zarówno tytuł projektu jak i wyjaśnienie zawarte w streszczeniu (4-y akapit: „Celem projektu[...]” grupa zwierząt w której przebywa samica w okresie dojrzewania ma wpływ na doświadczany przez nią stres, jej behawior itd.”) sugerują, że Autorki nie do końca rozumieją, lub też niejasno precyzują, co tutaj jest stresem. Tak sformułowane zdania sugerują, że nie przebywanie z osobnikami o innym profilu zachowania jest stresem, ale że samice przebywające z osobnikami o innym zachowaniu będą dopiero poddawane stresowi i grupa może wpłynąć na doświadczany stres czyli na reakcję na ten stres. Wymaga to doprecyzowania w tej części zwłaszcza, że główna hipoteza postawiona jest już właściwie.
- 2) W podjętych przewidywaniach Autorki zakładają, że nadpobudliwość osobników jest większym stresem niż ich ospałość. Myślę, że przy założeniu, że odmienne zachowanie współtowarzyszek jest stresem nie możemy przyjmować takiego założenia. Zarówno nietypowa ospałość jak i nadpobudliwość może być równorzędnym stresem.
- 3) Eksperyment został podzielony na dwie części. I tak o ile Eksperyment 2 nie budzi większych zastrzeżeń o tyle Eksperyment 1 jest wysoce niejasny. Może wynika to z bardziej mało precyzyjnego opisu metodyki badań w tej części projektu:
 - brak opisu zachowań „nietypowych” dla szczepów aktywnych i ospałych, które widoczne u badanych osobników można by określić jako przejęte od nich. Na czym ta ospałość czy nadpobudliwość ma polegać. Czy jest to procent czasu spędzony na danej czynności, czy też widoczne są inne rodzaje zachowań
 - na ile „przejęcie” danego zachowania można uznać już za stres, a na ile jedynie „naśladownictwo”
 - nie jest jasna procedura obserwacyjna. Pierwszego i ostatniego dnia będzie ważenie, mierzenie pod względem szerokości głowy i zachowania w klatce (jak to rozumieć ?). A jak często przeprowadzana będzie obserwacja behawioru: czy dziesięciokrotnie, dwukrotnie (noc i dzień) ale codziennie, czy też tylko pierwszego i ostatniego dnia? Co to znaczy dziesięciokrotnie dwukrotnie w ciągu doby. Jakie będą odstępy czasowe podczas tych dziesięciokrotnych obserwacji? jak zostanie wybrana pora w ciągu dnia i nocy. Myszki laboratoryjne wykazują aktywność ruchową i spoczynkową zarówno w nocy jak i w dzień. Jak więc Autorki zamierzają uniknąć zdublowania podobnego typu zachowania w ciągu doby.
 - wiele zastrzeżeń budzi sama obserwacja. Wiadomo, że każde zbliżenie obserwatora wzbudza zainteresowanie zwierzęcia lub wręcz niepokój. Tak więc „zajrzenie” do klatki przez badacza w bardzo wysokim procencie zmieni zachowanie samic przerywając jej np. sen, mycie się, karmienie. Czy nie lepszym rozwiązaniem byłoby ustawienie kamer, tak aby uniknąć ingerencji obserwatora oraz mieć możliwość kilkakrotnej analizy zachowań. Można by też wydłużyć czas obserwacji zachowania
 - Analiza chemiczna krwi i określenie poziomu hormonów oraz białych ciałek krwi jest jak najbardziej zasadne i może przynieść cenne informacje. Należy jednak pamiętać, że myszki laboratoryjne cechuje ruja spontaniczna i powtarzający się co 4-5 dni cykl płciowy.
 - Pobieranie przyżyciowo krwi od myszki laboratoryjnej w celu wykonania sporej ilości analiz jest stosunkowo trudne. Autorki powinny wyjaśnić jak będzie przeprowadzana ta procedura.
- 4) Eksperyment 2. Mysz laboratoryjna osiąga dojrzałość płciową w wieku 2-3 miesięcy. Owszem są informacje, że pojawiają się osobniki zdolne do rozrodu w wieku nieco ponad 40 dni, ale nie dotyczy to całej populacji i wszystkich szczepów. Tak więc kojarzenie

w wieku 40 dni może zmienić wyniki szczególnie dotyczące tempa rozrodu. Różnice mogą być wynikiem niedojrzałości samic a nie wynikiem stresu. Proponuję dłuższy czas obserwacji i kojarzenie osobników starszych u których zostanie stwierdzona pierwsza ruja. U gatunków charakteryzujących się rują spontaniczną nie jest to trudne.

Kosztorys wydaje się być adekwatny chociaż koszt zakupu zwierząt jest nieco zawyżony. Pomimo powyższych niedociągnięć projekt wydaje się być ciekawy i po korekcie (szczególnie części metodycznej!) może przynieść konkretne wyniki dotyczące wpływu stresu socjalnego, polegającego na kontakcie z osobnikami o „zaburzonym” behawiorze, na procesy fizjologiczne i rozród myszy laboratoryjnej. Posiada pewne elementy nowatorskie, a wyniki tego eksperymentu mogą zostać opublikowane w czasopiśmie specjalistycznych i dać podstawy do dalszych badań nad stresem .

Joanna Kapusta

Dorastanie w towarzystwie osobników o odmiennych nawykach behawioralnych a stres i sukces reprodukcyjny

*Anna Giermek / Paulina Koszyła / Małgorzata Lipowska
Uniwersytet Jagielloński, Instytut Nauk o Środowisku*

Streszczenie projektu

W środowisku występują liczne czynniki fizyczno-chemiczne i psychologiczne, które mogą wywołać stres o różnorodnej sile. Chociaż poddanie osobnika krótkotrwałemu stresowi może poprawić wydolność jego organizmu i taka sytuacja może mieć dla niego korzystne skutki, stres chroniczny sprawia, że zdrowie organizmu zostaje nadwerężone i pomimo początkowych korzyści skutkuje to niekorzystnymi zmianami.

Przebywanie w otoczeniu, które nie jest naturalne jest jednym z najsilniejszych bodźców wywołujących stres. W projekcie chcemy skupić się na problemie dorastania i dojrzewania w otoczeniu osobników wykazujących odmienne wzorce zachowań. Młode samice myszy, w dniu odstawienia od matki, znajdują się w towarzystwie zwierząt diametralnie różniącym się od nich zachowaniem. Część samic zamieszka z osobnikami nadpobudliwymi ruchowo, część będzie dorastała w otoczeniu myszy, które są ospałe, mało ruchliwe, większość czasu spędzają na jedzeniu i mają skłonność do nadwagi oraz depresji, a pozostałe samice będące grupą kontrolną będą dzielić klatkę z myszami podobnymi do siebie pod względem zachowania. Dodatkową grupę odniesienia stanowić będą myszy umieszczone w klatce pojedynczo, gdyż odosobnienie w wypadku tak socjalnych zwierząt stanowi silny i wielokrotnie opisywany w literaturze czynnik stresowy.

Chcemy sprawdzić w jaki sposób młode samiczki reagują na odmiennie od siebie zachowujące się towarzystwo i czy starają się dopasować do nich swoje nawyki behawioralne. Głównym celem projektu jest sprawdzenie jak mocno doświadczanie towarzystwa o odmiennym zachowaniu wpływa na podniesienie się poziomu stresu oraz czy skutkuje to obniżeniem późniejszego sukcesu reprodukcyjnego.

Cel naukowy projektu

(jaki problem naukowy wnioskodawca podejmuje się rozwiązać, hipotezy badawcze)

Celem projektu jest odpowiedź na pytanie w jakim stopniu zwierzęta z którymi przebywa samica w okresie dojrzewania mają wpływ na doświadczany przez nią stres, jej behavior i fizjologię, a w konsekwencji na sukces reprodukcyjny i jakość potomstwa. Postulujemy, że samice dorastające w towarzystwie rówieśników o odmiennych od nich zachowaniach są narażone na stres, wynikający z niedopasowania do otoczenia, a ponadto mogą próbować powielać zaobserwowane wzorce. Spodziewamy się, że taki rodzaj stresu w okresie dojrzewania może mieć konsekwencje w dorosłym życiu, powodując między innymi zmniejszony sukces reprodukcyjny i spadek jakości potomstwa.

Hipotezy badawcze i przewidywania:

- e) Dorastanie w otoczeniu rówieśników o odmiennych nawykach behawioralnych wpływa na poziom stresu u samic. Przewidujemy, że odbiegające zachowaniem towarzystwo podwyższy poziom hormonów stresu (kortyzolu, kortykosteronu i kortykoliberyny (CRF)), a także obniżony poziom estrogenu i spadek liczby krwinek związany z długotrwałym stresem.
- f) Osobniki przebywające w towarzystwie zwierząt o odmiennych nawykach behawioralnych starają się do nich dopasować zmieniając swoje dotychczasowe zachowania. Przewidujemy,

że przez trzydzieści dni podczas których zwierzęta będą dzieliły ze sobą klatkę różnice w ich zachowaniu zmniejszą się w wyniku wzajemnego naśladownictwa.

- g) Spodziewamy się, że dorastanie w towarzystwie nadpobudliwego zwierzęcia będzie wywoływać wyższy poziom stresu niż obecność osobnika ospałego, ze skłonnością do otyłości.
- h) Stres polegający na przebywaniu w towarzystwie osobników o „zaburzonym” behawiorze w okresie dojrzewania wpływa na przyszły na rozród myszy laboratoryjnej. Spodziewamy się, że długotrwały stres wywołany zachowującym się odmiennie zwierzęciem w klatce obniży przyszły sukces rozrodczy samic oraz jakość ich potomstwa.

Znaczenie projektu

(dotychczasowy stan wiedzy, uzasadnienie podjęcia problemu badawczego, uzasadnienie nowatorskiego charakteru badań, znaczenie wyników projektu dla rozwoju danej dziedziny i dyscypliny naukowej oraz rozwoju cywilizacyjnego)

Większość organizmów, w tym ludzie, jest narażona na działanie stresu na różnych etapach swojego życia. Wielu badaczy stara się zrozumieć i przewidzieć efekty, jakie stres wywiera na osobniki (Brooks-Gunn i wsp., 1989). Interesującym i rozpracowywanym na wielu gatunkach zagadnieniem jest także odpowiedź na pytanie po jakim czasie od ekspozycji na stres można wciąż obserwować jego efekty i negatywne konsekwencje (Pryce i wsp., 2002). W tym obszarze prowadzone są intensywne badania, skupiają się one jednak w większości na osobnikach dorosłych lub oseskach (Pryce i wsp., 2002), zazwyczaj lekceważąc osobniki młodociane. Tymczasem dorastające zwierzęta nie mają doświadczenia w samodzielnym życiu ani wypracowanych mechanizmów niwelujących negatywne skutki stresu, są więc bardzo wrażliwe na wpływ otoczenia. W istocie, niektóre prace sugerują, że stres w okresie dorastania może trwale wpłynąć na zachowanie osobników dorosłych (Avital i wsp., 2005; Buwalda i wsp., 2011).

Jednym z analizowanych rodzajów stresu jest stres socjalny, który jest ważnym czynnikiem szczególnie w przypadku tak socjalnego zwierzęcia jak mysz. Najczęściej stosowanymi w badaniach źródłami stresu są izolacja i przegęszczenie (Burrone i wsp., 2014), lecz nawet bez wprowadzania tak ekstremalnych warunków socjalnych możliwe jest badanie skutków bardziej subtelnych źródeł stresu takich jak poczucie niedopasowania do zwierząt stanowiących otoczenie osobnika. W projekcie chcemy skupić się na problemie stresu wywołwanego istnieniem wyraźniej różnicy w zachowaniu między dwoma osobnikami żyjącymi razem w klatce. W odróżnieniu od innych przeprowadzonych badań, chcemy skupić się na osobnikach młodocianych, które są odstawione od matki i przechodzą przez okres dojrzewania. Zarówno konieczność przebywania w jednej klatce ze zwierzęciem wykazującym odmienny wzorzec zachowania, jak i próba zmniejszenia różnicy w behawiorze przez naśladowanie zachowań innego zwierzęcia może być czynnikiem silnie stresogennym dla młodocianego organizmu.

Stres powoduje ekspresję szeregu hormonów z nim związanych, przy czym podwyższony poziom kortyzolu we krwi może wskazywać na występowanie stresu chronicznego lub depresję. Kortykosteron natomiast jest podstawowym gliko-kortykosteroidem wydzielanym przez korę nadnerczy myszy i szczurów, a jego pomiary są przydatnym wskaźnikiem ogólnej i neuroendokrynnej odpowiedzi na stres. Wydzielanie CRF wiąże się z aktywacją osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej, która pośredniczy w wywołaniu fizjologicznej odpowiedzi na stres, a wzrost jej stężenia świadczy również o zahamowaniu zachowań poznawczych w nowym środowisku, zwiększeniu agresji, spadku apetytu oraz obniżeniu aktywności seksualnej. Z drugiej strony w wyniku stresu, zwłaszcza długotrwałego, pogorszeniu mogą ulec inne parametry organizmu jak wydolność układu odpornościowego, parametry krwi czy rozrodczość. Szczególnie w przypadku młodego, wciąż jeszcze rozwijającego się organizmu

stres może skutkować znaczącymi zmianami w zachowaniu i fizjologii wpływając na obniżenie sukcesu reprodukcyjnego (Burrioni i wsp., 2014). Do badań wybrano samice, ponieważ to one ponoszą wyższe niż samce koszty produkcji i wychowywania potomstwa, z racji czego siła efektu stresu na ich zdolność do rozrodu jest wyższa niż w przypadku samców.

Jako, że wiele podstawowych mechanizmów, w tym działanie stresu, jest powtarzalnych w różnych grupach kręgowców, liczymy na to, że wyniki naszych badań będą na równi z innymi badaniami w tym temacie mogły mieć ogólne zastosowanie i być interpretowane w kontekście różnych gatunków, w tym ludzi (Mariano i Harton, 2005). Wyniki dotyczące związku między grupą socjalną a fizjologiczną odpowiedzią organizmu mogą mieć też implikacje w obszarze nauk biomedycznych (Cohen i wsp., 2007).

Koncepcja i plan badań

(ogólny plan badań, szczegółowe cele badawcze, wyniki badań wstępnych)

Młode samice należące do trzech szczepów myszy diametralnie różniących się zachowaniem, w dniu odstawienia od matki zostaną umieszczone w klatkach w towarzystwie niespokrewnionych z nimi zwierząt tej samej płci i wieku. Do eksperymentu zostaną wykorzystane myszy z trzech linii: 1) standardowej 2) wykazującej się hiperaktywnością 3) z tendencją do otyłości. Zostaną pogrupowane w pary, tak, aby wykorzystane zostały wszystkie możliwe kombinacje (Tab. 1).. Ponadto, część samic zostanie umieszczona w klatkach indywidualnych, w celu wywołania u nich chronicznego stresu związanego z izolacją. Osobniki samotne będą stanowiły kontrolę pozytywną przejawiającą najwyższy poziom stresu.

		Pierwsza mysz z pary			
		otyła	standardowa	aktywna	brak
Druga mysz z pary	otyła	5	10	10	10
	standardowa	X	5	10	10
	aktywna	X	X	5	10

Tabela 1. Liczba klatek poszczególnego typu par samic w trakcie trwania eksperymentu, n=75.

Następnym krokiem będzie zbadanie czy i w jakim stopniu zwierzęta dostosują się do zachowania osobnika z którym znalazły się w klatce i stresu związanego z różnicą między behawiorem obu zwierząt. Długotrwały stres może mieć długofalowe skutki negatywnie wpływające na fizjologię i sukces reprodukcyjny organizmu, co zostanie zbadane poprzez pomiar poziomu hormonów we krwi i rozmnożenie samic dorastających w różnym towarzystwie oraz określenie jakości ich potomstwa.

Celami szczegółowymi kolejnych części projektu jest udzielenie odpowiedzi na zadane poniżej pytania:

Eksperyment 1:

W pierwszym etapie badań sprawdzimy w jakim stopniu dorastanie w towarzystwie osobników o odmiennych nawykach behawioralnych jest czynnikiem stresogennym dla samic.

- Czy młode samice dorastające w grupie rówieśników wykazujących odmienne wzorce zachowania będą przejmowały ten wzorec?
- Czy towarzystwo odmiennie zachowującego się zwierzęcia wywoła u dorastających samic stres (podniesie poziom kortyzolu, kortykosteronu i kortykoliberyny), obniży poziom hormonów płciowych i w konsekwencji także parametry morfologiczne ich krwi?

Eksperyment 2:

- Czy dorastanie w środowisku stresogennym związanym z przebywaniem w towarzystwie zwierząt wykazujących odmienne wzorce zachowań obniża sukces reprodukcyjny?
- Czy jakość potomstwa samic, które dojrzewały w warunkach stresu socjalnego będzie niższa od potomstwa samic niestresowanych?

Metodyka badań

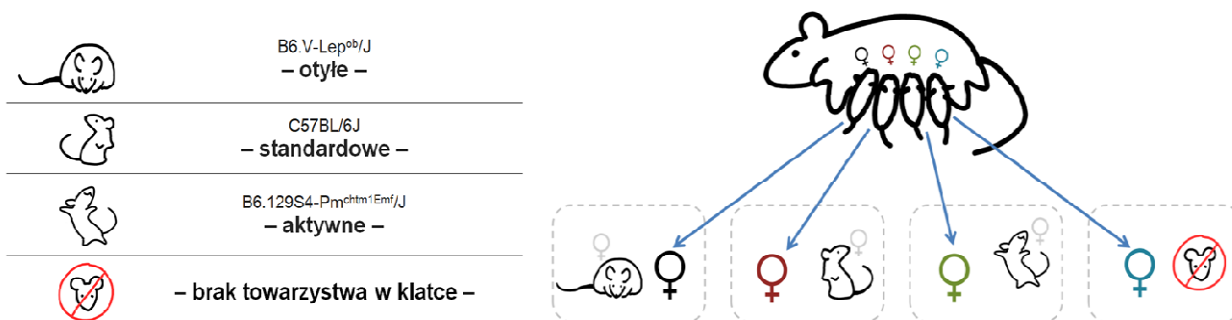
(sposób realizacji badań, metody, techniki i narzędzia badawcze, metody analizy i opracowania wyników, urządzenia i aparatura wykorzystywane w badaniach)

Badania zostaną przeprowadzone na myszy laboratoryjnej (*Mus musculus*) z wykorzystaniem zwierząt należących do trzech różnych szczepów:

- C57BL/6J – standardowe – powszechnie wykorzystywany szczep laboratoryjny z którego wyprowadzono pozostałe dwie linie myszy uwzględnione w eksperymencie;
- B6.129S4-Pm^{chtml1Emf}/J – aktywne – myszy z nokautem genowym powodującym hiperaktywność w klatce, hipofagię i w konsekwencji szczupłą budowę;
- B6.V-Lep^{ob}/J (ob/ob) – otyłe – myszy z nokautem genowym wywołującym tendencję do ospałości i hiperfagii, co prowadzi do rozwoju otyłości.

Hodowla będzie prowadzona w warunkach standardowych, w wynajętym pomieszczeniu zwierzętarni należącej do Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Szczepy myszy z nokautami genowymi nie są dostępne w Polsce i będzie konieczne ich sprowadzenie; dla zredukowania kosztów postaramy się o zakup kilkunastu ciężarnych samic z każdej linii i wykorzystanie zwierząt z urodzonych w naszym laboratorium miotów. Do badania zostaną wybrane młode samice odstawiane od matki w tym samym czasie, w jednakowym wieku - 20 dni. Po odstawieniu zwierzęta trafią do standardowych klatek hodowlanych, po 2 niespokrewnione zwierzęta tej samej płci na klatkę i będą przebywać w niezmienionych parach przez następnych 30 dni.

Grupy zostaną sformowane w następujący sposób: z dziesięciu miotów myszy każdego ze szczepów zostaną wybrane po cztery samice (siostry). Czwórki sióstr z jednego miotu zostaną rozdzielone tak, by poszczególne samice trafiły do klatek ze zwierzętami z trzech różnych linii, a jedna pozostała będzie w klatce sama (Rycina 1). Powstanie w ten sposób piętnaście par zwierząt z tej samej linii, trzydzieści par mieszanych zwierząt z różnych linii i trzydzieści klatek z pojedynczymi zwierzętami (Tabela 1). Każda z samic przed umieszczeniem w nowej klatce zostanie wyraźnie oznakowana przez wpięcie kolorowego koleczyka w ucho.



Rycina 1. Po odstawieniu od matki nastąpi rozdzielanie miotu do osobnych klatek w taki sposób, że każda z trzech sióstr będzie w parze z jedną samicą należącą do innej linii (dane w tabeli powyżej), a jedna mysz zostanie przeniesiona do klatki indywidualnej.

Eksperyment 1:

Pierwszego i ostatniego (30) dnia przebywania razem wszystkie zwierzęta w klatce zostaną zważone i zmierzone pod względem szerokości głowy (w celu oceny rozmiarów ciała niezależnej od ewentualnego otłuszczenia). Ponadto każdego dnia wspólnego pobytu zostanie przeprowadzona obserwacja behawioru, w warunkach możliwie neutralnych dla zwierząt - poprzez przejście obserwatora wzdłuż rzędu klatek i spojrzenie do ich wnętrza bez konieczności otwierania jej czy niepokojenia zwierząt w inny sposób (Parrish Waters i wsp., 2013). Test będzie przeprowadzany czterokrotnie w ciągu doby w jednakowych odstępach czasu między godziną 8 rano a 20 wieczorem tj.: 8.00, 12.00, 16.00 i 20.00. W czasie jednej tury pomiarów obserwator wykona dziesięć rund wzdłuż klatek, poświęcając około 10 sekund na zanotowanie zaobserwowanych zachowań (sen, jedzenie, aktywność, pielęgnacja) każdego ze zwierząt, zachowując 5 minut przerwy między kolejnymi rundami obserwacji.

Porównanie masy zwierząt (z uwzględnieniem poprawki na rozmiar czaszki) i procentowego udziału odpoczynku, jedzenia, aktywności i pielęgnacji między zwierzętami z tej samej klatki ma na celu określenie, czy nastąpiło ujednoczenie schematów zachowania lub apetytu (przekładającego się na zbliżoną masę ciała współbytujących osobników).

Po upływie trzydziestu dni zwierzęta zostaną rozdzielone i po wcześniejszym znieczuleniu od każdego zostanie pobrana krew z zatoki podoczodołowej. Na bazie pobranych próbek zostanie wykonany szereg testów: pomiar poziomu hormonów (kortyzolu, kortykosteronu, kortykoliberyny (CRF), estrogenu) (Bale i Vale, 2004; Maxwell, 1993) i liczby białych krwinek (Maxwell, 1993). Badane hormony pozwolą nam określić poziom stresu zwierzęcia, a estrogen dodatkowo umożliwi stwierdzenie, czy odbiegające od optymalnych warunki socjalne negatywnie wpłynęły na poziom kluczowych czynników związanych z rozrodem. Stężenie hormonów zostanie określone z użyciem testu ELISA, a do zbadania parametrów morfologii krwi zostanie wykorzystany analizator hematologiczny znajdujący się w wyposażeniu Zakładu Biotechnologii Medycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Eksperyment 2:

Pięćdziesiątego dnia życia wszystkie samice zostaną połączone w pary z niespokrewnionymi z nimi samcami w zbliżonym wieku pochodzącymi z tych samych co one linii i umieszczone w klatkach rozrodczych. Utworzonych zostanie w ten sposób 90 par złożonych z samic dorastających w towarzystwie osobników o różnych wzorcach behawioralnych i samców oraz 30 par złożonych z samic dorastających w odosobnieniu i samców. Samce, wcześniej nie wykorzystywane w eksperymencie, będą pochodzić z możliwie jednorodnego środowiska i zostaną przydzielone losowo do samic.

Po urodzeniu się miotów z tak powstałych par zostanie odnotowany wiek samicy w dniu porodu, liczba młodych i ich masa urodzeniowa. Dalsza obserwacja pozwoli również określić przeżywalność potomstwa przez pierwsze 20 dni życia. Masa ciała młodych będzie mierzona codziennie do momentu odstawienia od matki, w celu prześledzenia ich tempa wzrostu. W 20 dniu życia młode zostaną uśpione i zostanie od nich pobrana krew w celu zbadania jej morfologii (liczba białych i czerwonych krwinek, ilość hemoglobiny we krwi) i poziomu hormonów stresu (kortykosteronu, kortyzolu i CRF).

Analizy statystyczne:

W obrębie każdej klatki pomiary masy ciała i zachowania samic (odsetek obserwacji zwierzęcia oddającego się danej czynności) zostaną przeanalizowane testem ANCOVA z uwzględnieniem czynników takich jak szczerp każdej z myszy w klatce, numer klatki, pora dnia (w przypadku testu behawioralnego), pokrewieństwo i liczba dni od umieszczenia we wspólnej klatce. Zwierzęta mieszkające pojedynczo, choć poddane tym samym pomiarom, nie zostaną uwzględnione w tej analizie, ponieważ ze względu na brak towarzystwa nie można dokonać takich porównań.

Analiza danych z testów wykonanych na próbkach krwi pod kątem różnic między samicami dorastającymi w różnym towarzystwie zostanie sprawdzona testem ANCOVA, jako predyktory wykorzystując pokrewieństwo, numer klatki i rodzaj towarzystwa (ta sama linia, inna linia, brak towarzysza), a masę zwierzęcia jako zmiennej ciągłej.

Dla sprawdzenia, czy poziom stresu zwierząt wychowujących się w klatkach z osobnikami o odmiennym behawiorze był podniesiony, zastosowana zostanie analiza kontrastów porównująca je ze zwierzętami posiadającymi towarzyszy pochodzących z tej samej linii. Analiza ta zostanie przeprowadzona osobno dla zwierząt z każdej linii. By ocenić siłę badanego stresu zwierzęta z klatek mieszanych zostaną następnie skontrastowane z kontrolą pozytywną, którą w tym przypadku stanowią zwierzęta trzymane pojedynczo.

Test ANCOVA zostanie wykorzystany do analizy cech potomstwa samic eksperymentalnych, przy czym wyniki pomiarów masy urodzeniowej, szybkości wzrostu i analiz krwi młodych zostaną uśrednione w obrębie miotu, a masa ciała samca zostanie uwzględniona jako dodatkowa zmienna ciągła.

Literatura

Avital A, Richter-Levin G (2005) Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioural consequences of exposure to stress in the adult rat, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 8, 163-173

Axelrod, J., Reisine, T.D (1984) Stress hormones: Their interaction and regulation, *Science*, 224, 452-459

Bale TL, Vale WW (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44, 525-557.

Brooks-Gunn J, Warren MP (1989) Biological and social contributions to negative affect in young adolescent girls *Child Dev.*, 60, 40-55

Burroni, N, Loetti, MV, Busch, M (2014). Reproductive success in *Mus musculus* (Rodentia) exposed to conspecific's odors and overcrowding in laboratory conditions. *Mastozoologia neotropical*, 21(1), 115-120.

Buwalda B, Kole M, Veenema AH, Huining M, Boer de SF, Kort SM, Koolhaas JM (2005) Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(1), 83-97.

Buwalda B, Geerdink M, Vidal J, Koolhaas J.M (2011) Social behavior and social stress in adolescence: A focus on animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(8), 1713–1721

Cohen S, Janicki-Deverts D, Miller GE (2007). Psychological stress and disease. *Jama*, 298(14), 1685-1687.

Maxwell MH (1993) Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poultry Science Journal*, 49(1), 34-43.

Mariano, KA, Harton, HC (2005). Similarities in aggression, inattention/hyperactivity, depression, and anxiety in middle childhood friendships. *Journal of Social and Clinical Psychology*, 24(4), 471-496.

Parrish Waters R., Pringle R.B., Forster G.L., Renner K.J., Malisch J.L., Garland T., Swallow J.G. (2013) Selection for increased voluntary wheel-running affects behavior and brain monoamines in mice, *Brain Research*, 1508, 9-22.

Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Feldon J (2002) Early Life Stress: Long-Term Physiological Impact in Rodents and Primates. *Physiology*, 17(4), 150-155.

Kosztorys

Przewidywany czas trwania eksperymentu to jeden rok, z czego cztery miesiące pochłona wynajęcie zwierzętarni i przygotowanie zwierząt, a pozostały czas przeznaczony jest na skompletowanie sprzętu, przygotowanie eksperymentu, a także obróbkę i upowszechnienie danych na międzynarodowej konferencji.

	Fundusze (zł)
1. Koszty bezpośrednie	124 710
1.1 Wynagrodzenia	27 000
1.2 Wyposażenie	0
1.3 Inne koszty bezpośrednie	97 710
2. Koszty pośrednie	24 942
Całość kosztów	149 652

Uzasadnienie kosztów:

Wynagrodzenie: 3 osoby x 1500 zł x 6 miesięcy = 27 000 zł

Zakup zwierząt: 25 050 zł

Utrzymanie zwierząt: 1 560 zł

Wynajem zwierzętarni na czas trwania eksperymentu: 36 000 zł

Sprzęt laboratoryjny: 4500 zł

Odczynniki do morfologii krwi: 3 000 zł

Testy ELISA (po trzy płytki 96-dółkowe na każdy z badanych hormonów stresu i dwie podobne płytki na estrogen - w sumie 11 płytek): 17 600 zł

Wyjazd na konferencję ISBE: 2 osoby x 5 000 zł = 10 000 zł

3. Dlaczego ptaki polykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków.

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

Dlaczego ptaki polykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków.

Bartłomiej Zając, Stanisław Bury
Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński

Abstrakt

Specjalizacje pokarmowe w kierunku roślinożerności opierają się głównie na zmianach fizjologicznych i anatomicznych układu pokarmowego, natomiast rzadkim zjawiskiem wydaje się być taka specjalizacja oparta na zmianach behawioralnych. Jednym z przykładów takiej specjalizacji może być zjawisko polykania kamieni przez ptaki, a szczególnie przez przedstawicieli rzędu kuraków (Galliformes). Wśród funkcji przypisywanych tym obiektom wymieniane są głównie ułatwienie trawienia pokarmu przez rozcieranie go (u gatunków roślinożernych) oraz suplementacja mineralna. Jak do tej pory, nie podejmowano się próby wyjaśnienia tego zagadnienia na drodze eksperymentalnej. Celem niniejszych badań jest przetestowanie powyższych hipotez na modelowym gatunku ptaka – przepiórcie japońskiej (*Coturnix japonica*). Zwierzęta zostaną poddane eksperymentom żywieniowym które dadzą odpowiedź na pytania: czy obecność gastrolitów zmniejsza koszty trawienia i zwiększają jego wydajność, oraz czy pobieranie gastrolitów jest zależne od zapotrzebowania na minerały. Potwierdzenie hipotezy o wspomaganiu trawienia przez polykanie kamieni może sugerować istnienie specjalizacji pokarmowej o podłożu behawioralnym.

Cel naukowy projektu

Specjalizacja pokarmowa w kierunku roślinożerności wiąże się zazwyczaj ze znacznymi zmianami fizjologicznymi i anatomicznymi. Natomiast słabiej poznanym zjawiskiem jest specjalizacja pokarmowa polegająca głównie na zmianach behawioralnych (O'Donnell i in. 2012, Lapiedra i in. 2013). Obserwowanemu u ptaków zjawisku polykania kamieni (po połknięciu zwanych gastrolitami) przypisuje się różne funkcje – wśród nich najważniejszymi wydają się być: wspomaganie trawienia przez rozcieranie twardego pokarmu (szczególnie u gatunków roślinożernych), suplementację organizmu minerałami, utrzymywanie balansu elektrolitów i właściwego pH, detoksykację i samoleczenie oraz manipulacja wypornością ciała (u ptaków wodnych) (Wings 2007, Robinson i in. 2008, Panichev i in. 2013). W przypadku kuraków najbardziej prawdopodobnymi wydają się być hipotezy o wspomaganiu trawienia i suplementacji mineralnej, w szczególności w kontekście ich specjalizacji pokarmowej w kierunku roślin. Badania wskazują że żołądki ptaków karmionych bardziej włóknistym (a więc cięższym do strawienia) pokarmem zawierają większą liczbę gastrolitów o średnio większej masie niż żołądki ptaków karmionych pokarmem łatwiejszym do strawienia, oraz że udział gastrolitów u dzikich kuraków zwiększa się w okresie zimowym, kiedy dostępny jest tylko najtwardszy pokarm roślinny, co mogłoby potwierdzać teorie o związku gastrolitów z trawieniem (Norms i in. 1975, Williamson i in. 2014). Jednak, dotychczas nie zostały podjęte próby eksperymentalnego potwierdzenia lub obalenia hipotezy o pozytywnym wpływie gastrolitów na trawienie materiału roślinnego u kuraków.

Celem projektu jest przetestowanie czterech hipotez dotyczących funkcji fizjologicznej gastrolitów występujących u kuraków:

- 1) obecność gastrolitów w żołądku kuraków zmniejsza koszty energetyczne procesu trawienia pokarmu i czas jego trwania,
- 2) wpływ obecności gastrolitów na trawienie jest większy w wypadku pokarmu roślinnego niż zwierzęcego,
- 3) ptaki o zmniejszonym udziale minerałów w pokarmie pobierają więcej gastrolitów w stosunku do ptaków o diecie suplementowanej,
- 4) gastrolity w których skład wchodzi minerały odgrywające rolę w procesach fizjologicznych będą chętniej pobierane przez ptaki.

Znaczenie projektu

Powszechnie znanym zjawiskiem związanym ze specjalizacją pokarmową w kierunku roślinożerności są zmiany w fizjologii (wytwarzanie enzymów) oraz zmiany anatomiczne (rozbudowa układu pokarmowego, szczególnie żołądka lub jelit; modyfikacje twarzoczaszki i jej umięśnienia); tymczasem o ile kuraki (szczególnie gatunki ściśle roślinożerne) wyróżniają się spośród ptaków wydłużonym jelitem cienkim i rozrośniętym wyrostkiem robaczkowym, to jednak zmiany te nie są tak daleko posunięte jak u np. przeżuwaczy. Jeszcze bardziej rzucającą się w oczy różnicą jest twarzoczaszka, którą tworzy typowy dla ptaków dziób pozbawiony zębów oraz możliwości ścierania czy dzielenia pokarmu na mniejsze kawałki (Szarski 1976). Z tego powodu od dawna sugeruje się że gastrolity mogą spełniać funkcję żaren, co wydaje się być wspierane przez silne umięśnienie ścian żołądka tych zwierząt (Szarski 1976, Fritz i in. 2011). Mimo to, jak do tej pory brak danych eksperymentalnych, jednoznacznie potwierdzających pozytywny wpływ gastrolitów na trawienie pokarmu roślinnego u kuraków. W wypadku gdyby udało się potwierdzić tą teorię, sugerowałoby to istnienie specjalizacji pokarmowej opartej w równie wysokim lub wyższym stopniu na zmianach behawioralnych (połykaniu kamieni) co na zmianach w fizjologii i anatomii u kuraków. Otworzyłoby to drogą do dalszych badań nad tym niezwykle przypadkiem selekcji naturalnej.

Nasz projekt badawczy jest pierwszym, w którym eksperymentalnie zostaną potwierdzone bądź obalone dwie najważniejsze hipotezy dotyczące funkcji gastrolitów u kuraków. Potwierdzenie pozytywnego wpływu gastrolitów na trawienie oraz suplementację mineralną sugeruje potrzebę dalszych badań ewolucji specjalizacji pokarmowej kuraków, natomiast obalenie ich zmniejszy liczbę możliwych do przypisania gastrolitom funkcji i wpłynie na wiedzę zawartą zarówno w publikacjach naukowych, jak i podręcznikach dotyczących biologii i fizjologii ptaków.

Koncepcja i plan badań

Pierwszym etapem badań będzie zakup 200 zapłodnionych jaj przepiórki japońskiej (160 osobników potrzebnych do eksperymentu oraz 40 zapasowych, na wypadek potrzeby manipulacji stosunkiem płci lub zdychania części ptaków). Jaja będą inkubowane w sterylnych inkubatorach do wyklucia się ptaków. Zostaną również zakupione klatki (w liczbie 200) w których będą przetrzymywane zwierzęta (każde osobno). Wszystkie osobniki będą przetrzymywane bez dostępu do jakichkolwiek kamieni i będą karmione jednolitym, łatwym do strawienia rodzajem pokarmu do osiągnięcia masy typowej dla dojrzałych osobników (ok. 120 g). Następnie, przez miesiąc przed rozpoczęciem eksperymentów, będzie stosowana dieta oparta na mieszanym pokarmie użytym w eksperymencie, w celu wyeliminowania wpływu nowego pokarmu na wyniki. Tuż przed każdym eksperymentem zostanie zastosowana 24 godzinna głodówka, w celu opróżnienia układu pokarmowego ptaków z pożywienia oraz kału. Zarówno hodowla, jak eksperymenty zostaną przeprowadzone w Instytucie Nauk o Środowisku.

Pierwszym z eksperymentów będzie sprawdzenie czy obecność gastrolitów w żołądku wpływa na koszty metaboliczne i czas procesu pobierania i trawienia pokarmu (Specific Dynamic Action - SDA) oraz na wydajność trawienia pokarmu mierzoną współczynnikiem strawialności. Przewidujemy że osobniki mające dostęp do gastrolitów będą wykazywać niższy poziom konsumpcji tlenu podczas SDA i krótszy czas jego trwania, natomiast współczynnik strawialności pokarmu u tych osobników będzie większy.

Drugi eksperyment ma za zadanie sprawdzić czy występują różnice we wpływie gastrolitów na współczynnik strawialności pomiędzy pokarmem roślinnym i zwierzęcym. Przewidujemy że wpływ gastrolitów na współczynnik strawialności będzie większy w przypadku pokarmu roślinnego niż zwierzęcego.

Trzeci eksperyment sprawdzi czy osobniki zróżnicowane pod względem suplementacji mineralnej będą wykazywały różne zapotrzebowanie na gastrolity, oraz czy gastrolity w których skład wchodzi węglan wapnia będą częściej pobierane przez ptaki niż gastrolity nie będące źródłem tego związku. Przewidujemy że zgodnie z hipotezą o suplementacyjnej funkcji gastrolitów, ptaki pozbawione minerałów w diecie będą pobierać więcej kamieni z CaCO₃.

Metodyka badań

Przepiórka japońska (*Coturnix japonica*) jest ptakiem z rodziny kuraków (Galliformes). Gatunek ten odznacza się niskimi kosztami i łatwością utrzymywania w niewoli, jest także organizmem modelowym powszechnie stosowanym w badaniach naukowych, w tym badaniach dotyczących fizjologii (Hawkins i Morton 2001, Ben-Hamo i in. 2010). Pozyskanie oraz hodowla ptaków będzie prowadzona według opisu przedstawionego w rozdziale „Koncepcja i plan badań”.

Pierwszy eksperyment będzie opierał się na pomiarach dwóch parametrów SDA – wysokości piku metabolizmu oraz czasu trwania zwiększonego metabolizmu podczas trawienia w stosunku metabolizmu podstawowego oraz na współczynniku strawialności pokarmu mierzonego jako stosunek masy pokarmu strawionego do pokarmu niestrawionego (McCue 2006, Ben-Hamo i in. 2010, Bojarska i Selva 2013).

W połowie głodówki stosowanej przed eksperymentem ptak zostanie umieszczony w komorze termoneutralnej. U dwudziestu osobników w komorze wyłożone zostaną gastrolity w postaci przesianego żwirku o masie poszczególnych ziaren 0,5 g. Grupę kontrolną będzie stanowiła grupa dwudziestu ptaków które zostaną umieszczone w komorze bez gastrolitów. Przez całą noc na bieżąco będzie prowadzony pomiar podstawowego tempa metabolizmu przy użyciu respirometru open-flow. Następnie, po zakończeniu głodówki, obydwa ptaki otrzymają porcję pokarmu składającego się z owadów, suchych nasion i części zielonych roślin, a więc pokarm mieszany. Masa porcji wyniesie 5 g. Pokarm zostanie pozostawiony w komorze aż do całkowitego zjedzenia przez ptaka. Podczas posiłku i trawienia cały czas będzie mierzone tempo metabolizmu. Dla każdego osobnika zostanie zapisana wysokość piku wzrostu metabolizmu oraz czas od początkowego do końcowego momentu utrzymywania się tempa metabolizmu ponad zarejestrowany poziom podstawowy. Następnie osobnik zostanie pozostawiony w komorze do czasu całkowitej defekacji. Jego odchody zostaną zebrane i zważone. W celu uniknięcia wpływu ewentualnych wydalonych gastrolitów na zwiększenie masy odchodów, po zważeniu zostaną one rozpuszczone w wodzie i przelane przez drobne sitko. Przy stwierdzeniu obecności gastrolitów, zostaną one zważone, a ich masa zostanie odjęta od masy odchodów.

W celu porównania kosztów metabolicznych trawienia między grupą kontrolną i grupą z gastrolitami zostanie obliczona różnica między pikiem zmierzonego wzrostu tempa metabolizmu a podstawowym tempem metabolizmu zmierzonym przed podaniem pokarmu. Do porównania tego parametru między dwoma grupami zostanie zastosowany test różnic między

średnimi. Przewidujemy, że niższa średnia wysokość pików w grupie z gastrolitami w porównaniu do kontroli potwierdzi pozytywny wpływ gastrolitów na obniżenie kosztów energetycznych trawienia pokarmu.

W celu porównania czasu trawienia między grupą kontrolną a eksperymentalną, zostanie zastosowany test różnic między średnimi. Przewidujemy, że niższy średni czas podniesionego tempa metabolizmu również potwierdzi pozytywny wpływ gastrolitów na obniżenie kosztów energetycznych trawienia.

W celu porównania wydajności trawienia w obu grupach, zostanie obliczony współczynnik strawialności. Obliczony zostanie według następującego wzoru:

$$(\text{masa pokarmu pobranego} - \text{masa odchodów}) / \text{masa odchodów}$$

W przypadku stwierdzenia występowania gastrolitów w odchodach osobników grupy eksperymentalnej, ich masa zostanie odjęta od masy odchodów.

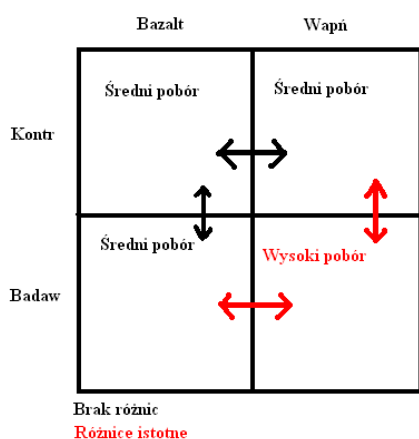
Wysokość współczynnika strawialności zostanie porównana pomiędzy grupą eksperymentalną a kontrolną przy użyciu testu różnic między średnimi. Przewidujemy, że wyższa średnia wartość tego współczynnika w grupie eksperymentalnej potwierdzi pozytywny wpływ gastrolitów na wydajność trawienia pokarmu.

Drugi eksperyment będzie opierał się na porównaniu wielkości efektu wpływu gastrolitów na współczynnik strawialności w zależności od podanego pokarmu (roślinnego i zwierzęcego). W tym celu zostaną użyte cztery grupy ptaków po 20 osobników. Dla każdego rodzaju pokarmu zostanie wyznaczona grupa kontrolna i grupa eksperymentalna. Cała metodyka będzie identyczna jak w eksperymencie pierwszym, pomijając przenoszenie do komory termoneutralnej oraz różnice w podawanym pokarmie - obydwie grupy eksperymentalne otrzymają gastrolity; wszystkie grupy otrzymają pokarm, jednak jedna para kontrola-gastrolity otrzyma porcję składającą się jedynie z owadów, a druga para - z nasion i części zielonych roślin. Współczynniki strawialności pokarmu u wszystkich grup zostaną obliczone według procedury z eksperymentu pierwszego. Następnie zostanie obliczona różnica między współczynnikiem strawialności grupy eksperymentalnej i kontroli w obydwu parach. Różnice te są wielkością efektu wpływu gastrolitów na współczynnik strawialności. Wielkość tego efektu zostanie porównana między ptakami karmionymi owadami a ptakami karmionymi pokarmem roślinnym przy pomocy testu różnic między średnimi. Przewidujemy, że wyższa wartość średniej dla grup karmionych nasionami i częściami zielonymi roślin potwierdzi większy pozytywny wpływ gastrolitów na wydajność trawienia pokarmu roślinnego w porównaniu do zwierzęcego.

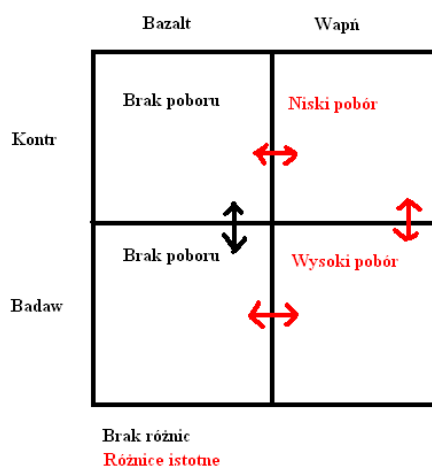
Trzeci eksperyment służy jednoczesnemu przetestowaniu hipotez 3 i 4. Ptaki zostaną podzielone na dwie grupy po 20 osobników - eksperymentalną i kontrolną. Przed rozpoczęciem eksperymentu, przez miesiąc grupa kontrolna będzie karmiona pokarmem z suplementacją wapniową, podczas gdy grupa eksperymentalna będzie karmiona pokarmem ubogim w wapń. W odróżnieniu od poprzednich eksperymentów, podczas eksperymentu wszystkie grupy otrzymają gastrolity. Zostaną zastosowane dwa rodzaje gastrolitów - zbudowane ze skały zawierającej węglan wapnia (kalcyt lub marmur) oraz zbudowany z nierozpuszczalnej skały, która nie może służyć jako suplement (bazalt). Wszystkie gastrolity będą miały maksymalnie zbliżoną masę (0,5 g) i wielkość - zostanie to uzyskane przez przesiewanie materiału. Masa obydwu typów gastrolitów w klatce każdego osobnika będzie taka sama (po 20 g). Po umieszczeniu gastrolitów w klatce, zostaną one pozostawione na 48 godzin. Po tym czasie zostaną wyjęte; następnie zostanie zmierzona ich masa i obliczony ubytek w stosunku do początkowej masy pozostawionej porcji. Ubytek masy będzie miarą wykorzystania gastrolitów w zależności od grupy ptaków i rodzaju gastrolitu. Istotność różnic pomiędzy tymi grupami zostanie sprawdzona przy pomocy dwuczynnikowej analizy wariancji, gdzie czynnikami są rodzaj

gastrolitu (wapniowy i bazaltowy) oraz grupa ptaków (kontrolna i o obniżonej suplementacji). Przewidywania co do wyników zależą od wyników dwóch wcześniejszych eksperymentów.

W przypadku potwierdzenia się hipotez 1 i 2 oczekujemy rezultatów wskazanych na następującej matrycy:



W przypadku niepotwierdzenia się hipotez 1 i 2, oczekujemy następujących wyników



W przypadku potwierdzenia hipotez 1 i 2, ale niepotwierdzenia hipotez 3 i 4, oczekujemy braku różnic w poborze gastrolitów między grupami ptaków i rodzajami gastrolitów.

Literatura

- Beaune D., Le Bohec C., Lucas F., Gauthier-Clerc M., Le Maho Y. 2009. Stomach stones in king penguin chicks. *Polar Biol* 32:593–597
- Ben-Hamo M., Pinshow B., McCue M. D., McWilliams S. R., Bauchinger U. 2010. Fasting triggers hypothermia, and ambient temperature modulates its depth in Japanese quail *Coturnix japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 156: 84–91.
- Bojarska K., Selva N. 2013. Correction factors for important brown bear foods in Europe. *Ursus* 24: 13–15
- Fritz J., Hummel J., Kienzle E., Wings O., Streich W. J., Clauss M. 2011. Gizzard vs. teeth, it's a tie: food-processing efficiency in herbivorous birds and mammals and implications for dinosaur feeding strategies. *Paleobiology* 37: 577-586.
- Hawkins P.(ed.), Morton D. B.(chair) 2001. Laboratory birds: refinements in husbandry and procedures. Fifth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* 35.
- Lapiedra O., Sol D., Carranza S., Beaulieu J. M. 2013. Behavioural changes and the adaptive diversification of pigeons and doves. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 280
- McCue M. D. 2006. Specific dynamic action: A century of investigation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 144: 381–394.
- Norms E., Norris C., Steen J. B. 1975. Regulation and grinding ability of grit in the gizzard of norwegian willow ptarmigan (*Lagopus lagopus*). *Poultry Science* 54: 1839-1843

- O'Donnell S., Logan C. J., Clayton N. S. 2012. Specializations of birds that attend army ant raids: An ecological approach to cognitive and behavioral studies. *Behavioural Processes* 91: 267–274.
- Panichev A. M., Golokhvast K. S., Gulkov A. N., Chekryzhov I. Yu. 2013. Geophagy in animals and geology of kudurs (mineral licks): a review of Russian publications. *Environ Geochem Health* 35: 133-152.
- Robinson S. A., Forbes M. R., Hebert C. E. 2008. Is the ingestion of small stones by double-crested cormorants a self-medication behavior? *The Condor* 110: 782–785.
- Szarski H. 1976. *Anatomia porównawcza kręgowców*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa.
- Williamson S. A., Jones S. K. C., Munn A. J. 2014. Is gastrointestinal plasticity in king quail (*Coturnix chinensis*) elicited by diet-fibre or diet-energy dilution? *The Journal of Experimental Biology* 217, 1839-1842.
- Wings O. 2007. A review of gastrolith function with implications for fossil vertebrates and a revised classification. *Acta Palaeontologica Polonica* 52: 1–16.

Kosztorys

Rodzaj kosztów	Środki na poszczególne lata (zł)		Total
	2016	2017	
1. Koszty bezpośrednie:	50800	48000	98800
Wynagrodzenia	24000	24000	48000
Sprzęt	10000	-	10000
Inne	16800	20000	36800
2. Koszty pośrednie	10160	9600	19760
Pelen koszt (1+2)	60960	57600	118560

Uzasadnienie kosztorysu:

Wynagrodzenia:

1000 zł/miesiąc dla dwóch osób przez dwa lata – $1000 \text{ zł} \times 2 \times 24 = 48\,000 \text{ zł}$

Sprzęt:

Klatki na przepiórki – szacowany koszt jednej klatki – 50 zł: $50 \text{ zł} \times 200 = 10\,000 \text{ zł}$

Inne:

Zakup przepiórek – 9 zł/osobnik: $9 \text{ zł} \times 200 \text{ osobników} = 1800 \text{ zł}$

Wyjazdy na konferencje – 10 000 zł

Publikacja wyników badań – 5 000 zł

Pokarm dla przepiórek, gastrolity, utrzymanie klatek – 10 000 zł

Przeprowadzenie pomiarów SDA – 10 000 zł

RECENZJE

Recenzja projektu Stanisława Burego i Bartłomieja Zająca pt. „Dlaczego ptaki polykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków.”

Ocena merytoryczna

Projekt zawiera wszystkie niezbędne pod względem formalnym części. Planowane badania dotyczą powszechnie znanego i ciekawego tematu jakim jest rola występowania gastrolitów u kuraków. Projekt został napisany w sposób konsekwentny i jasny, a streszczenie ma odpowiednią formę i zawiera krótki wstęp, przedstawienie opisywanej w literaturze roli gastrolitów, cele badań oraz przewidywania i ogólny zarys eksperymentu. Użycie przepiórki japońskiej do badań jest zasadne i zostało wyjaśnione.

W rozdziale dotyczącym metodyki napisano, że „u dwudziestu osobników w komorze wyłożone zostaną gastrolity w postaci przesianego żwirku o masie poszczególnych ziaren 0,5 g” – sugerowałabym poprawę na „do 0,5 g” ponieważ kamienie nie będą miały równej masy i omal niemożliwym byłoby doprowadzenie do sytuacji w której by tak było. Może łatwiej zamiast masy byłoby użyć maksymalnej średnicy lub długości dłuższego boku z uwagi na fakt, że sito nie rozdziela materiału na podstawie masy lecz właśnie wielkości przesiewanych obiektów, a dodatkowo masa kamieni jednakowego typu jest zależna od ich wielkości. Warto się zastanowić czy u przepiórki po jedzeniu pokarmu o masie tylko 5 g będą mogły uformować się odchody i czy ptaki będą w stanie je wydalić.

Cele projektu są jasno wypunktowane, autorzy podają również przewidywania oraz wyjaśniają, które powszechnie opisywane w literaturze funkcje gastrolitów wydają się im najbardziej prawdopodobne. Każda ze stawianych hipotez jest testowalna i mierzalna.

Znaczenie projektu

Znaczenie badań jest w projekcie mocno sprecyzowane i odpowiednio uargumentowane. Przetestowanie stawianych przez autorów hipotez jest możliwe i pozwoli na wyjaśnienie faktycznej roli gastrolitów, zwiększy wiedzę o fizjologii ptaków, a może nawet znaleźć szersze znaczenie w dziedzinie biologii ewolucyjnej i być dobrym początkiem do dalszych badań nad występowaniem specjalizacji pokarmowej o podłożu behawioralnym.

Wyniki badań mogą znacząco wpłynąć na obecną wiedzę na temat gastrolitów, która bazuje głównie na przypuszczeniach. Na podstawie projektu może powstać kilka publikacji naukowych, które mogą zostać opublikowane w dobrych czasopismach, których adresatami jest szersze grono naukowców, a nie tylko hodowcy, ornitolodzy i/lub fizjolodzy.

Ocena możliwości wykonania

Projekt został zaplanowany rozsądnie i jest możliwy do wykonania w zaplanowanym czasie. Kolejne eksperymenty jasno wynikają z poprzednich i tworzą spójną całość, która pozwoli na przekształcenie wyników we wnioski i udzielenie odpowiedzi na zadawane przez autorów pytania.

Testy zostały starannie dobrane, a ich wybór został częściowo uargumentowany przez autorów projektu.

Ocena kosztorysu

Nie ma zastrzeżeń co do kosztorysu. Koszt projektu nie przekracza 120 000 zł, wynagrodzenie stanowi 1000 zł na osobę miesięcznie, a koszt zakupu i utrzymania ptaków

wynosi około 25 000 zł. W kosztorysie uwzględniono koszty wydania publikacji oraz udziału w konferencjach, dzięki czemu będzie możliwe pokazanie wyników badań szerszej grupie. Podanie propozycji konkretnych konferencji na które autorzy planują pojechać zwiększyłoby moje poczucie, że wiedzą do której dziedziny najbardziej pasują planowane przez nich badania i do kogo są one skierowane oraz pozwoliłoby na uargumentowanie wysokości kwoty zaplanowanej na ten cel.

Anna Giermek

Recenzja projektu pt: Dlaczego ptaki polykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków.

Ocena merytoryczna projektu

Uważam, że zaproponowany projekt badawczy porusza ciekawy problem nie tylko z punktu widzenia specjalistów w danej dziedzinie. Polykanie kamieni przez ptaki jest faktem powszechnie znanym i obserwowanym, można więc przyjąć, że zagadnienie to mieści się w obszarze tzw. wiedzy ogólnej.

Autorzy dokonali dokładnego przeglądu dotychczasowej literatury oraz w logiczny sposób uzasadnili potrzebę uzupełnienia wiedzy w zakresie możliwych funkcji pełnionych przez gastrolity. Przedstawione hipotezy badawcze dotyczą problemu z dwóch różnych stron – funkcji „mechanicznej” bądź „chemicznej” gastrolitów – a ich potwierdzenie lub obalenie znacząco przybliży nas do poznania funkcjonowania układu trawiennego u ptaków. W świetle powyższego przytoczone przez autorów zdanie dotyczące potrzeby dalszych badań w przypadku potwierdzenia wpływu gastrolitów na trawienie u kuraków (str. 2, w. 65) jest w mojej opinii nieco nad wyrost. Zaletą eksperymentów wydaje się być właśnie domknięcie pewnego zagadnienia w przypadku potwierdzenia funkcji kamieni w ptasiej diecie.

Całość części eksperymentalnej opisana została w sposób zrozumiały a zastosowane metody są adekwatne do stawianych pytań. Poniżej zwrócę uwagę na kilka kwestii które mogą wymagać doprecyzowania.

Z opisu metodyki wynika, iż eksperymenty dotyczące tępa metabolizmu i strawialności pokarmu przeprowadzone będą jednorazowo na ptakach z krótkotrwałym dostępem do gastrolitów. Rodzi się zatem pytanie czy ilość gastrolitów przyswojonych przez przeziórki będzie wystarczająca do wykazania różnic w stosunku do grup kontrolnych? Być może warto byłoby powtórzyć eksperyment u starszych ptaków z długotrwałym dostępem do gastrolitów? W warunkach naturalnych możemy mieć bowiem do czynienia ze skumulowanym i długotrwałym efektem oddziaływania połkniętych kamieni. Autorzy nie podają w jasny sposób czy w drugim eksperymencie ptaki również będą mieć jednorazowy i krótkotrwały dostęp do gastrolitów, jeśli tak, to powyższa uwaga tyczy się również tego badania. Zastosowane w opisie metodyki stwierdzenie „*Cała metodyka będzie identyczna jak w eksperymencie pierwszym, pomijając przenoszenie do komory termoneutralnej oraz różnice w podawanym pokarmie*” (str. 4, w.148) jest mało precyzyjne i zbyt potoczne ja na opis projektu. Ponadto stwierdzenie w opisie trzeciego eksperymentu „*ptaki zostaną podzielone na dwie grupy po 20 osobników*” (str. 4.

w. 160) jest mylące gdyż sugeruje, że autorzy wezmą do tego eksperymentu wszystkie ptaki które posiadają (a więc również te które jadły już wcześniej gastrolity) i podzielą je na dwie grupy. Jedynie liczba użytych osobników daje do myślenia. W ostatniej części wniosku autorzy przytaczają schematy dotyczące możliwych wyników w ostatnim eksperymencie z podziałem na dwa scenariusze zależne od wcześniejszych wyników gdzie: hipotezy 1 i 2 są dodatnie, bądź ujemne. Czy autorzy nie biorą pod uwagę scenariusza w którym hipoteza 1 będzie dodatnia, a hipoteza 2 ujemna?

Ocena kosztorysu

Koszty realizacji projektu rozpisane zostały w sposób zrozumiały i przejrzysty. Całkowita kwota realizacji projektu, jak również poszczególnych składowych wydaje się być adekwatna zarówno jeśli chodzi o rangę projektu jak również faktyczne koszty realizacji zadania.

Ocena możliwości wykonania

Techniczne możliwości wykonania eksperymentu nie budzą większych wątpliwości. Zwróciłabym jednak uwagę na sposób pozyskania osobników do badań. Zakup zapłodnionych jaj (wynikający jak myślę ze zbytnej przezorności autorów wniosku) wydaje się być obaczony większym ryzykiem niż zakup młodych piskląt. W przypadku pozyskiwania gatunku z hodowli zamkniętej ryzyko przyjęcia gastrolitów przez pisklęta praktycznie nie występuje.

Elżbieta Jędrzejczak

Dlaczego ptaki połykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków.

Przedstawiony projekt dotyczy wyjaśnienia bardzo ciekawego zagadnienia jakim jest funkcja gastrolitów w fizjologii kuraków. Zdziwiające jest, iż pomimo powszechności zjawiska połykania kamieni przez kuraki brakuje eksperymentalnych badań, które wyjaśniały by jego znaczenie w fizjologii tych ptaków. Wybór tego tematu projektu uważam więc za niezwykle trafny i obiecujący pod kątem poszerzenia wiedzy w dziedzinie specjalizacji pokarmowych opartych na zmianach behawioralnych.

Mocne strony projektu

W części przedstawiającej cel naukowy projektu, bardzo dobrze przedstawiono zasadność podjęcia tego typu badań oraz postawiono celne, logiczne hipotezy. Przegląd literatury przedstawiony w części omawiającej znaczenie projektu dobrze ukazuje ogromne luki w obecnej wiedzy na ten temat. Zakładając, że recenzenci niekoniecznie muszą być specjalistami z tej dziedziny, myślę że warto było by poszerzyć tę część o obecny stan wiedzy na temat gastrolitów u innych gatunków kuraków.

Praktyczny aspekt badań, bardzo klarownie przedstawiony w Koncepcji, Planie i Metodyce, wygląda na dobrze przemyślany i możliwy do realizacji. Wybór przepiórki japońskiej na organizm modelowy wydaje się bardzo słuszny biorąc pod uwagę jej dostępność, łatwą hodowlę, i powszechne wykorzystanie w różnego typu badaniach. Planowane eksperymenty w prosty i elegancki sposób pozwolą jednoznacznie odpowiedzieć na pytania postawione w Celu naukowym projektu. Zaproponowane w projekcie badania mają nowatorski charakter i z pewnością zaowocują publikacjami w renomowanym czasopiśmie.

Słabe strony projektu

Jedyną słabą stroną projektu jaką dostrzegam jest jego warstwa językowa. Autorzy nie ustrzegli się przed pewnymi niezręcznościami językowymi (wiersz 68, sugerowałabym 'zweryfikuje' zamiast 'wpłynie') czy gramatycznymi (wiersz 55). W opisie pierwszego eksperymentu zadeklarowane jest użycie 40 osobników (po 20 na każdą grupę), tymczasem w wierszu 115 pojawia się stwierdzenie „obydwa ptaki”, które warto było by zmienić na „ptaki z obydwu grup”. Pojawiają się również literówki (wiersz 150, 164), powtórzenia (wiersz 165), błędy fleksyjne (wiersz 15, 63, 167) oraz interpunkcyjne (przyganiał kocioł garnkowi ☺) w tym dość frywolne stosowanie średnika (wiersz 51). Biorąc jednak pod uwagę czas i okoliczności w jakich pisano projekt popelnienie tego typu błędów wydaje się w pełni zrozumiałe, nie mniej jednak do ostatecznej wersji projektu dobrze byłoby wprowadzić poprawki.

Ocena kosztorysu

Przedstawiony kosztorys jest realistyczny, uwzględnia wszystkie najistotniejsze wydatki a łączna kwota, wydaje się niewygórowana jak na tego typu projekt.

Ocena ogólna

Podsumowując, przedstawiony projekt oceniam bardzo wysoko i gdyby leżało to w mojej gestii z pewnością udzieliłabym środków na jego realizację.

Katarzyna Janas

Recenzja projektu: „Dlaczego ptaki polykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków”

Przedstawiony projekt dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia, jakim jest polykanie kamieni przez ptaki, które dotychczas nie znalazło jednoznacznego naukowego uzasadnienia. Zaproponowane przez autorów badania mogą dostarczyć nowej wiedzy o podstawach i fizjologicznym znaczeniu tego zjawiska.

Cel projektu został jasno i precyzyjnie określony. Autorzy przedstawili dotychczasowy stan wiedzy uzasadniając planowane przez siebie badania brakiem doświadczalnego potwierdzenia funkcji gastrolitów podawanych wielokrotnie w literaturze. Zasygnalizowano lukę w dotychczasowej wiedzy i szczegółowy plan eksperymentu oraz znaczenie możliwych do uzyskania wyników. Dobrze uargumentowano wybór przepiórki jako modelu prowadzonych badań. Projekt spełnia wymagania formalne pod względem formy i części składowych.

Arbitralny wybór masy gastrolitów (0,5g) nie został wyjaśniony. W moim przekonaniu należałoby kierować się danymi literaturowymi na temat wielkości najczęściej znajdujących gastrolitów u przepiórki japońskiej. Jeżeli brak takich danych do rozważenia poddaje także utworzenie grupy eksperymentalnej którym podawane byłyby mniejsze gastrolity, bądź przeprowadzenie badań pilotażowych dotyczących preferencji w wyborze kamieni pod względem wielkości.

W eksperymencie pierwszym przewiduje się pozostawienie ptaków w klatce do momentu całkowitej defekacji. Może lepszym rozwiązaniem byłoby podanie ramy czasowej, gdyż nie jestem przekonana czy łatwo będzie określić, czy nastąpiła już całkowita defekacja.

W eksperymencie trzecim należy zwrócić szczególną uwagę na to, aby w ciągu 48 godzin od podania gastrolitów ptaki nie przemieściły ich przypadkowo poza klatkę.

Projekt prezentuje nowatorskie podejście do znanego zagadnienia, głównie poprzez zastosowane metody pomiarowe. Analizując kosztorys i zaplecze badawcze potrzebne do przeprowadzenia opisanych w projekcie badań - nie wzbudzają obaw w kwestii realizacji. Planowane koszty w stosunku do przedmiotu i zakresu badań są uzasadnione.

Atutem projektu jest wykorzystanie metod umożliwiających w doświadczalny sposób zweryfikowanie dotychczasowego stanu wiedzy na temat powszechnie występującego u ptaków zjawiska połknięcia kamieni. Metodyka prowadzonych badań została szczegółowo przemyślana. W badaniach wykorzystane zostaną nowoczesne metody badań, które umożliwią precyzyjne pomiary i wielowymiarowe rozpatrzenie problemu badawczego.

Autorzy analizują swoje przewidywania uwzględniając różne możliwe scenariusze wydarzeń.

Po zakończeniu wyniki projektu mogą dać nam nowe spojrzenie na dobrze znane zjawisko, a publikowane wyniki mogą być interesujące dla większego grona odbiorców, gdyż oprócz bezpośredniego badania kuraków poruszają też szerszy temat specjalizacji pokarmowej.

Słabe strony wniosku: Należy liczyć się z możliwością jedynie potwierdzenia dotychczasowej wiedzy literaturowej.

Autorzy nie ustrzegli się przed pewnymi niedociągnięciami edytorskimi. Użyte w wierszu 54 stwierdzenie „rzucają się w oczy” jest nieco zbyt potocznym sformułowaniem i sugerowałabym zastąpienie go np. słowem „zauważalny, wyraźny”. Z pozoru błahym, lecz bardzo zauważalnym błędem jest postawienie kropki po tytule projektu i nie stosowanie kursywy w zapisie łacińskich nazw gatunkowych (wers 100).

Paulina Koszyła

Celem projektu jest zbadanie wpływu gastrolitów na fizjologię trawienia kuraków.

Autorzy chcą testować dwie hipotezy, przewidujące że rolą gastrolitów jest poprawa wydajności trawienia albo zdobywanie potrzebnych mikroelementów. W tym celu planują przeprowadzić trzy eksperymenty laboratoryjne. Projekt jest ogólnie napisany w jasny i przejrzysty sposób, autorzy dobrze opisują badany problem i stawiają jasne przewidywania. Mam jednak kilka uwag do zaplanowanych doświadczeń.

Eksperymenty 1-2 sprawdzają wpływ gastrolitów na koszty i wydajność trawienia. Według mnie bardzo kontrowersyjnym pomysłem jest użycie ptaków nie mających wcześniej dostępu do gastrolitów (na pewno podczas pierwszych etapów życia, l. 75-76, a zapewne także w ciągu miesiąca przed właściwymi eksperymentami, l. 77-79). W efekcie, autorzy zbadają wpływ obecności gastrolitów w przewodzie pokarmowym zaadaptowanym do trawienia bez udziału gastrolitów. Przewód pokarmowy jest bardzo plastyczny, i długotrwały brak gastrolitów może spowodować poważne zmiany w jego wielkości, tempie przepływu treści jelitowej, itp.

(z własnych obserwacji wiem że rodzaj pokarmu może w krótkim czasie zmienić masę jelit o 100%). Przeprowadzenie eksperymentów na takich osobnikach w najlepszym razie zmniejsza szanse na wykrycie istotnego wpływu gastrolitów, nie wiem także czy jest ono słuszne z metodologicznego punktu widzenia (zbadanie wpływu nagłego pojawienia się gastrolitów w takim przewodzie pokarmowym nie odpowie na pytanie jaki jest wpływ gastrolitów na wydajność trawienia u dziko żyjących ptaków). Sugerowałbym przeprowadzenie tych badań na przepiórkach które przez miesiąc hodowano na tym samym pokarmie z dostępem lub bez dostępu do gastrolitów (analogicznie do miesięcznej aklimacji do różnych rodzajów diety przed eksperymentem 3; l. 162-163).

Wydaje mi się że możliwe jest także połączenie eksperymentów 1 i 2. W praktyce oznacza to tylko dodanie pomiaru tempa metabolizmu do eksperymentu 2 (czyli pomiar dla 80 ptaków zamiast 40), ale ogranicza inne koszty (np. brak 40 ptaków zaplanowanych do eksperymentu 1, co przy okazji zapewnia łatwiejszą zgodę komisji etycznej), a daje znacznie lepsze wyniki. Autorzy uzyskają w ten sposób komplet danych o wpływie obecności gastrolitów zarówno na koszty energetyczne, jak i wydajność trawienia, dla obu rodzajów pokarmu (zwierzęcy i roślinny). Umożliwi to lepszą ocenę roli gastrolitów (np. można sobie wyobrazić że gastrolity zawsze zwiększają koszty trawienia ponieważ ich obecność prowokuje intensywną pracę mięśni ścian przewodu pokarmowego, a w zamian poprawiają wydajność trawienia pokarmu roślinnego ale nie zwierzęcego). Ponadto obecnie w eksperymencie 1 ptaki otrzymują mieszaninę kilku rodzajów pokarmu – nie można wykluczyć że osobniki mające lub nie dostęp do gastrolitów będą różniły się kolejnością zjadania różnych rodzajów pokarmu, co jest poza kontrolą autorów a może wpłynąć na wyniki. W eksperymencie 2 dokładnie wiadomo co zjadają badane ptaki.

O ile dobrze rozumiem, w eksperymencie 2 autorzy planują stworzyć pary ‘kontrola-gastrolity’ w obrębie każdego rodzaju pokarmu, dla każdej z nich zbadać różnicę w strawności, i potem porównać te różnice dla obu rodzajów pokarmu. Czy nie wystarczy po prostu dwuczynnikowa ANOVA? (obecność gastrolitów i rodzaj pokarmu jako czynniki główne plus ew. efekt interakcji między nimi).

Ekspertyment 3 bada rolę gastrolitów jako źródła wapnia, czyli testuje hipotezy 3 i 4. Obecne brzmienie tych hipotez jest trochę niejasne – hipoteza 3 może sugerować że ptaki o zmniejszonym udziale minerałów w diecie powinny zwiększyć pobieranie dowolnych gastrolitów (także bazaltowych; czy o to chodziło?), a hipoteza 4 sugeruje że wszystkie ptaki mogą preferować gastrolity z węglanem wapnia. W eksperymencie 3 każdy osobnik dostanie do wyboru dwa rodzaje gastrolitów. Utworzy to w oczywisty sposób pary wiązane (konsumpcja obu typów gastrolitów przez tego samego osobnika), ale autorzy planują użyć zwykłą ANOVĘ dwuczynnikową (l. 173). Wykresy pokazujące oczekiwane wyniki są pomysłowe, ale w kilku miejscach oczekiwane wyniki są dość kontrowersyjne i w prawdziwym grancie niepotrzebnie dałyby recenzentowi okazję do ‘czepiania się’. Jeśli hipotezy 1-2 zostaną potwierdzone, to w lewym dolnym rogu lewego wykresu spodziewałbym się raczej ‘niskiego poboru’ gastrolitów bazaltowych w grupie z niedoborem wapnia (zwiększona konsumpcja gastrolitów z węglanem wapnia może zmniejszyć zapotrzebowanie na gastrolity bazaltowe). Z kolei na prawym wykresie, dlaczego ptaki kontrolne w sytuacji kiedy nie potrzebują gastrolitów do trawienia i nie odczuwają braku wapnia mają jednak zjeść selektywnie trochę gastrolitów z węglanem wapnia a unikać bazaltowych? Może wystarczy porównać całkowitą konsumpcję gastrolitów w grupie eksperymentalnej i kontrolnej (test hipotezy 3) i proporcję jaką w tej konsumpcji stanowiły gastrolity z węglanem wapnia (test hipotezy 4). Wystarczą wtedy dwa proste testy t bez wchodzenia w skomplikowane przewidywania.

Zdanie w wierszach 54-56 jest z początku trochę niejasne (chodzi zapewne o to że twarzoczaszka ptaków nie pokazuje żadnych adaptacji do odżywiania się pokarmem roślinnym a przeżuwaczy pokazuje) a nawet nieco śmieszne ('twarzoczaszkę tworzy typowy dla ptaków dziób').

Ogólnie projekt daje realne szanse na publikację.

Paweł Brzęk

Recenzja projektu „Dlaczego ptaki połykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków”

Aczkolwiek ustalenie dlaczego ptaki połykają kamienie nie jest w biologii zagadnieniem pierwszoplanowym a hipotezy wyjaśniające te zjawisko są od dawna znane, to jednak biorąc pod uwagę brak dotychczas dobrych danych eksperymentalnych usprawiedliwia zajęcie się tym tematem. Nawet najlepsze pisma ornitologiczne lub drobiarskie skłonne są opublikować wyniki takich eksperymentów o ile w międzyczasie już ktoś takich eksperymentów nie zrobił. A najciekawsze byłoby stwierdzenie, że żadna z proponowanych hipotez (rozdrabnianie pokarmu roślinnego i dostarczanie minerałów) nie tłumaczy tego zjawiska.

Ja nie widzę powodu, aby zjawisko połykanie kamieni uznać za rzadką behawioralną specjalizację (str. 1 wiersz 7), każdy gatunek ma jakiś behawioralny sposób pobierania pokarmu. Podobnie trudno mi to uznać, za niezwykle przypadek selekcji naturalnej (wiersz 64). Nie rozumiem zdania w wierszach od 65 do 69. Dlaczego eksperymentalne potwierdzenie opisywanych tu hipotez ma nas skłonić do badań nad specjalizacją pokarmową kuraków. Specjaliści od drobiarstwa wszystko o kurakach wiedzą i dlatego należy je jeszcze bardziej badać jeśli potwierdzą się te hipotezy a zostawić bez badań, gdy potwierdzenia nie będzie. Podobnie nie rozumiem dlaczego odrzucenie tych hipotez zmniejszy liczbę przypisanych im funkcji. Po prostu nie będziemy znali żadnych ich funkcji i będziemy mieli prawdziwy kłopot aby wyjaśnić dlaczego kuraki połykają kamienie. I to wreszcie będzie ciekawy problem.

Mówiąc w opisie metod o pokarmie zwierzęcym i owadach warto sobie uświadomić, że o ile larwy owadów mogą być łatwo trawione, to *imagines* w chitynowym pancerzu mogą być niewiele lepsze o roślin.

Ogólnie moim zdaniem projekt jest dobry i ciekawy. Wynikających z niego poważnych konsekwencji dla biologii ogólnej i dla drobiarstwa nie należy się spodziewać, ale może on pewnie dobrze znane zjawisko ostatecznie wyjaśnić. Jako recenzent NCN wnioskowałbym o grant, ale jako recenzent ERC uznałby, że sprawa nie jest dostatecznie ważna.

Adam Łomnicki

Dlaczego ptaki połykają kamienie? Znaczenie gastrolitów w fizjologii kuraków

Bartłomiej Zając, Stanisław Bury

Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński

Abstrakt

Specjalizacje pokarmowe w kierunku roślinożerności opierają się głównie na zmianach fizjologicznych i anatomicznych układu pokarmowego, natomiast rzadkim zjawiskiem wydaje się być specjalizacja w której zmiany behawioralne zastępują zmiany morfologiczno-fizjologiczne. Jednym z przykładów takiej specjalizacji może być zjawisko połykania kamieni przez ptaki, a szczególnie przez przedstawicieli rzędu kuraków (Galliformes). Wśród funkcji przypisywanych gastrolitom wymieniane są głównie ułatwienie trawienia pokarmu przez rozcieranie go (u gatunków roślinożernych) oraz suplementacja mineralna. Jak do tej pory, nie podejmowano próby wyjaśnienia tego zagadnienia na drodze eksperymentalnej. Celem projektu jest przetestowanie powyższych hipotez na modelowym gatunku ptaka – przepiórcie japońskiej (*Coturnix japonica*). Zwierzęta zostaną poddane eksperymentom żywieniowym które dadzą odpowiedź na pytania: czy obecność gastrolitów zmniejsza koszty trawienia i zwiększają jego wydajność, oraz czy pobieranie gastrolitów jest zależne od zapotrzebowania na minerały. Potwierdzenie hipotezy o wspomaganiu trawienia przez połykanie kamieni może sugerować istnienie specjalizacji pokarmowej o podłożu behawioralnym.

Cel naukowy projektu

Specjalizacja pokarmowa w kierunku roślinożerności wiąże się zazwyczaj ze znacznymi zmianami fizjologicznymi i anatomicznymi. Natomiast słabiej poznanym zjawiskiem jest specjalizacja pokarmowa polegająca głównie na zmianach behawioralnych (O'Donnell i in. 2012, Lapidra i in. 2013). Obserwowanemu u ptaków zjawisku połykania kamieni (po połknięciu zwanych gastrolitami) przypisuje się różne funkcje – wśród nich najważniejszymi wydają się być: wspomaganie trawienia przez rozcieranie twardego pokarmu (szczególnie u gatunków roślinożernych), suplementacja organizmu minerałami, utrzymywanie balansu elektrolitów i właściwego pH, detoksykacja i samoleczenie oraz manipulacja wypornością ciała (u ptaków wodnych) (Wings 2007, Robinson i in. 2008, Panichev i in. 2013). W przypadku kuraków najbardziej prawdopodobnymi wydają się być hipotezy o wspomaganiu trawienia i suplementacji mineralnej, w szczególności w kontekście ich specjalizacji pokarmowej w kierunku pokarmu roślinnego. Badania wskazują, że żołądki ptaków karmionych bardziej włóknistym (a więc trudniejszym do strawienia) pokarmem zawierają większą liczbę gastrolitów o średnio większej masie niż żołądki ptaków karmionych pokarmem łatwiejszym do strawienia, oraz że udział gastrolitów u dzikich kuraków zwiększa się w okresie zimowym, kiedy dostępny jest tylko najtwardszy pokarm roślinny, co mogłoby potwierdzać hipotezy o związku gastrolitów z trawieniem (Norms i in. 1975, Williamson i in. 2014). Jednak dotychczas nie zweryfikowano eksperymentalnie hipotezy o pozytywnym wpływie gastrolitów na trawienie materiału roślinnego u kuraków.

Celem projektu jest przetestowanie czterech hipotez dotyczących funkcji fizjologicznej gastrolitów występujących u kuraków:

1) obecność gastrolitów w żołądku kuraków zmniejsza koszty energetyczne procesu trawienia pokarmu i czas jego trwania,

- 2) wpływ obecności gastrolitów na trawienie jest większy w wypadku pokarmu roślinnego niż zwierzęcego,
- 3) ptaki o zmniejszonym udziale minerałów w pokarmie pobierają więcej gastrolitów w stosunku do ptaków o diecie suplementowanej,
- 4) gastrolity w których skład wchodziły minerały odgrywające rolę w procesach fizjologicznych będą chętniej pobierane przez ptaki.

Znaczenie projektu

Powszechnie znanym zjawiskiem związanym ze specjalizacją pokarmową w kierunku roślinożerności są zmiany w fizjologii (wytwarzanie enzymów) oraz zmiany anatomiczne (rozbudowa układu pokarmowego, szczególnie żołądka lub jelit; modyfikacje twarzoczaszki i jej umięśnienia); tymczasem o ile kuraki (szczególnie gatunki ściśle roślinożerne) wyróżniają się spośród ptaków wydłużonym jelitem cienkim i rozrośniętym wyrostkiem robaczkowym, to jednak zmiany te nie są tak daleko posunięte jak u np. przeżuwaczy. Jeszcze bardziej wyraźną różnicą jest twarzoczaszka, w której dziób pozbawiony jest zębów oraz możliwości ścierania czy dzielenia pokarmu na mniejsze kawałki (Szarski 1976). Z tego powodu od dawna sugeruje się że gastrolity mogą spełniać funkcję żaren, co wydaje się być wspierane przez silne umięśnienie ścian żołądka tych zwierząt (Szarski 1976, Fritz i in. 2011). Mimo to, jak do tej pory brak danych eksperymentalnych, jednoznacznie potwierdzających pozytywny wpływ gastrolitów na trawienie pokarmu roślinnego u kuraków. W wypadku gdyby udało się potwierdzić tę hipotezę, sugerowałoby to istnienie specjalizacji pokarmowej opartej w równie wysokim lub wyższym stopniu na zmianach behawioralnych (połykaniu kamieni) co na zmianach w fizjologii i anatomii u kuraków.

Nasz projekt badawczy jest pierwszym, w którym eksperymentalnie zostaną zweryfikowane dwie najważniejsze hipotezy dotyczące funkcji gastrolitów u kuraków. Potwierdzenie pozytywnego wpływu gastrolitów na trawienie oraz suplementację mineralną sugerowałoby potrzebę dalszych badań ewolucji specjalizacji pokarmowej kuraków, natomiast obalenie ich zmniejszy liczbę możliwych do przypisania gastrolitom funkcji i wpłynie na wiedzę zawartą zarówno w publikacjach naukowych, jak i podręcznikach dotyczących biologii i fizjologii ptaków.

Koncepcja i plan badań

Do pierwszego eksperymentu zostanie zakupionych 80 piskląt, natomiast do drugiego 40 piskląt przepiórki japońskiej. Zostaną również zakupione klatki w których będą przetrzymywane zwierzęta (każde osobno). Wszystkie osobniki będą przetrzymywane bez dostępu do jakichkolwiek kamieni i będą karmione jednolitym, łatwym do strawienia rodzajem pokarmu do czasu osiągnięcia masy typowej dla dojrzałych osobników (ok. 120 g). Następnie, przez miesiąc przed rozpoczęciem eksperymentów, będzie stosowana dieta oparta na naprzemiennie podawanym pokarmie użytym w eksperymencie. Jednocześnie ptaki, które zostaną docelowo przyporządkowane do grup eksperymentalnych będą otrzymywać kamienie do połykania, aby zaadoptować ich przewód pokarmowy do obecności gastrolitów. Tuż przed każdym eksperymentem zostanie zastosowana 24 godzinna głodówka, w celu opróżnienia układu pokarmowego ptaków z pożywienia oraz kału. Eksperymenty zostaną poprzedzone badaniami pilotażowymi mającymi na celu ustalenie optymalnej wielkości gastrolitów. Zarówno hodowla, jak i eksperymenty zostaną przeprowadzone w Instytucie Nauk o Środowisku.

W pierwszym z eksperymentów sprawdzimy czy obecność gastrolitów w żołądku wpływa na koszty metaboliczne i czas procesu pobierania i trawienia pokarmu (Specific Dynamic Action - SDA) oraz na wydajność trawienia dwóch różnych rodzajów pokarmu mierzoną współczynnikiem strawialności. Przewidujemy że osobniki mające dostęp do gastrolitów będą

wykazywać niższy poziom konsumpcji tlenu podczas SDA i krótszy czas jego trwania, natomiast współczynnik strawialności pokarmu u tych osobników będzie większy. Przewidujemy także, że wpływ gastrolitów na współczynnik strawialności będzie silniejszy w przypadku pokarmu roślinnego niż zwierzęcego.

Drugi eksperyment sprawdzi czy osobniki zróżnicowane pod względem suplementacji mineralnej będą wykazywały różne zapotrzebowanie na gastrolity, oraz czy gastrolity w których skład wchodzi węglan wapnia będą częściej pobierane przez ptaki niż gastrolity nie będące źródłem tego związku. Przewidujemy że zgodnie z hipotezą o suplementacyjnej funkcji gastrolitów, ptaki pozbawione minerałów w diecie będą pobierać więcej kamieni z CaCO_3 .

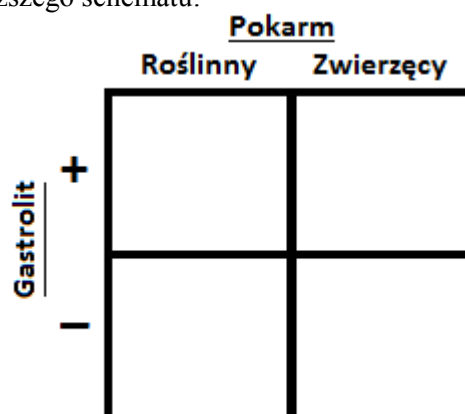
Metodyka badań

Przepiórka japońska (*Coturnix japonica*) jest ptakiem z rodziny kuraków (Galliformes). Gatunek ten odznacza się niskimi kosztami i łatwością utrzymywania w niewoli, jest także organizmem modelowym powszechnie stosowanym w badaniach naukowych, w tym badaniach dotyczących fizjologii (Hawkins i Morton 2001, Ben-Hamo i in. 2010). Pozyskanie oraz hodowla ptaków będzie prowadzona według opisu przedstawionego w rozdziale „Koncepcja i plan badań”. Rozmiary gastrolitów użytych w obu eksperymentach zostaną zoptymalizowane w oparciu o badania pilotażowe. W ramach tych badań ptakom będą udostępniane gastrolity różnych rozmiarów (każdy rozmiar w tej samej liczbie), tak aby wybrać wielkość najchętniej wybieraną przez ptaki. W drugim etapie będziemy podawać ptakom po kolei gastrolity różnych rozmiarów, aby sprawdzić czy mogą być wydalane przez zwierzęta. Na tej podstawie wybierzemy wielkość gastrolitów zbliżoną do tej najbardziej preferowanej przez przeziórki i minimalnej wielkości, jaka zapobiega wydalaniu. Nie znaleźliśmy przesłanek literaturowych wskazujących na wydalanie gastrolitów wraz z kałem, uznajemy to jednak za potencjalny problem, który należy wyeliminować.

Eksperyment I

Eksperyment ten będzie opierał się na pomiarach dwóch parametrów SDA – wysokości piku metabolizmu oraz czasu trwania podwyższonego poziomu metabolizmu podczas trawienia w stosunku do metabolizmu podstawowego oraz na współczynniku strawialności pokarmu, mierzonego jako stosunek masy pokarmu strawionego do pokarmu niestrawionego (McCue 2006, Ben-Hamo i in. 2010, Bojarska i Selva 2013). Ptaki wykorzystane w eksperymencie będą przez miesiąc przyzwyczajane do dwóch rodzajów pokarmu (roślinnego i zwierzęcego) podawanego naprzemiennie. Celem zabiegu jest uniknięcie adaptacji przewodu pokarmowego osobników do konkretnego rodzaju pokarmu, natomiast podawanie naprzemiennie ma zapobiec wybiórczemu pobieraniu pokarmu, które mogłoby mieć miejsce w sytuacji podania obu rodzajów pożywienia jednocześnie. Przed eksperymentem zwierzęta zostaną poddane 24-godzinne głódowce. W połowie okresu głodzenia ptak zostanie umieszczony w komorze połączonej z analizatorem tlenu, w temperaturze z zakresu strefy termoneutralnej.

Ptaki (n=80) zostaną podzielone na 4 grupy wg poniższego schematu:



Przez całą noc na bieżąco będzie prowadzony pomiar podstawowego tempa metabolizmu przy użyciu respirometru typu open-flow. Następnie, po zakończeniu głodówki, ptaki obu grup otrzymają porcję pokarmu zwierzęcego składającego się z owadów, lub roślinnego złożonego z suchych nasion i części zielonych roślin. Masa porcji wyniesie 5 g. Pokarm zostanie pozostawiony w komorze aż do całkowitego zjedzenia przez ptaka. Podczas posiłku i trawienia cały czas będzie mierzone tempo konsumpcji tlenu. Dla każdego osobnika zostanie zapisana wysokość piku wzrostu metabolizmu oraz czas od początkowego do końcowego momentu utrzymywania się tempa metabolizmu ponad zarejestrowany poziom podstawowy. Następnie osobnik zostanie pozostawiony w komorze do czasu całkowitej defekacji. Jego odchody zostaną zebrane i zważone.

Współczynnik strawialności obliczony zostanie według następującego wzoru:

$$(masa\ pokarmu\ pobranego - masa\ odchodów) / masa\ odchodów$$

Dane zostaną przeanalizowane przy pomocy ogólnego modelu liniowego (GLM) z dwoma czynnikami głównymi (gastrolit +/-, rodzaj pokarmu) oraz masą osobnika jako kowariatą. Jako zmienna zależna zostanie wykorzystana różnica pomiędzy podstawowym tempem metabolizmu a pikiem SDA, czas trwania, a także wartość współczynnika strawialności. Dzięki takiemu układowi eksperymentalnemu będzie możliwe określenie nie tylko wpływu samych czynników głównych, ale także ich interakcji.

Przewidujemy, że obecność gastrolitów w pokarmie obniży koszty trawienia, co będzie szczególnie wyraźne w przypadku pokarmu roślinnego.

Eksperyment II

W tym eksperymencie przetestowane zostaną hipotezy 3 i 4. Ptaki zostaną podzielone na dwie grupy po 20 osobników – eksperymentalną i kontrolną. Przed rozpoczęciem eksperymentu, przez miesiąc grupa kontrolna będzie karmiona pokarmem z suplementacją wapniową, podczas gdy grupa eksperymentalna będzie karmiona pokarmem ubogim w wapń. W odróżnieniu od poprzednich eksperymentów, podczas eksperymentu obie grupy otrzymają gastrolity. Zostaną zastosowane dwa rodzaje gastrolitów – zbudowane ze skały zawierającej węglan wapnia (kalcyt lub marmur) oraz zbudowany z nierozpuszczalnej skały, która nie może służyć jako suplement (bazalt). Wszystkie gastrolity będą miały zbliżoną wielkość. Łączna masa obydwu typów gastrolitów w klatce każdego osobnika będzie taka sama (po 20 g). Po umieszczeniu gastrolitów w klatce, zostaną one pozostawione na 48 godzin. Po tym czasie zostaną wyjęte; następnie zostanie zmierzona ich masa i obliczony ubytek w stosunku do początkowej masy pozostawionej porcji. W analizach wykorzystana zostanie całkowita masa pobranych gastrolitów, a także proporcja pobranych gastrolitów wapiennych. Obie wartości (całkowita masa pobranych gastrolitów oraz proporcja pobranych gastrolitów wapiennych) zostaną niezależnie przetestowane przy pomocy testu t. Przewidujemy, że ptaki bez suplementacji pokarmu wapniem będą pobierać gastrolity wapienne w większej proporcji.

Literatura

1. Beaune D., Le Bohec C., Lucas F., Gauthier-Clerc M., Le Maho Y. 2009. Stomach stones in king penguin chicks. *Polar Biol* 32:593–597
2. Ben-Hamo M., Pinshow B., McCue M. D., McWilliams S. R., Bauchinger U. 2010. Fasting triggers hypothermia, and ambient temperature modulates its depth in Japanese quail *Coturnix japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 156: 84–91.
3. Bojarska K., Selva N. 2013. Correction factors for important brown bear foods in Europe. *Ursus* 24: 13–15

4. Fritz J., Hummel J., Kienzle E., Wings O., Streich W. J., Clauss M. 2011. Gizzard vs. teeth, it's a tie: food-processing efficiency in herbivorous birds and mammals and implications for dinosaur feeding strategies. *Paleobiology* 37: 577-586.
5. Hawkins P.(ed.), Morton D. B.(chair) 2001. Laboratory birds: refinements in husbandry and procedures. Fifth report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals* 35.
6. Lapedra O., Sol D., Carranza S., Beaulieu J. M. 2013. Behavioural changes and the adaptive diversification of pigeons and doves. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 280
7. McCue M. D. 2006. Specific dynamic action: A century of investigation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 144: 381–394.
8. Norms E., Norris C., Steen J. B. 1975. Regulation and grinding ability of grit in the gizzard of
9. norwegian willow ptarmigan (*Lagopus lagopus*). *Poultry Science* 54: 1839-1843
10. O'Donnell S., Logan C. J., Clayton N. S. 2012. Specializations of birds that attend army ant raids: An ecological approach to cognitive and behavioral studies. *Behavioural Processes* 91: 267–274.
11. Panichev A. M., Golokhvast K. S., Gulkov A. N., Chekryzhov I. Yu. 2013. Geophagy in animals and geology of kudurs (mineral licks): a review of Russian publications. *Environ Geochem Health* 35: 133-152.
12. Robinson S. A., Forbes M. R., Hebert C. E. 2008. Is the ingestion of small stones by double-crested cormorants a self-medication behavior? *The Condor* 110: 782–785.
13. Szarski H. 1976. *Anatomia porównawcza kręgowców*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe. Warszawa.
14. Williamson S. A., Jones S. K. C., Munn A. J. 2014. Is gastrointestinal plasticity in king quail (*Coturnix chinensis*) elicited by diet-fibre or diet-energy dilution? *The Journal of Experimental Biology* 217, 1839-1842.
15. Wings O. 2007. A review of gastrolith function with implications for fossil vertebrates and a revised classification. *Acta Palaeontologica Polonica* 52: 1–16.

Kosztorys

Rodzaj kosztów	Środki na poszczególne lata (zł)		Total
	2016	2017	
1. Koszty bezpośrednie:	50800	44000	94800
Wynagrodzenia	24000	24000	48000
Sprzęt	10000	-	10000
Inne	16800	20000	36800
2. Koszty pośrednie	8160	8800	16960
Pelen koszt (1+2)	58960	52800	111760

Uzasadnienie kosztorysu:

Wynagrodzenia:

1000 zł/miesiąc dla dwóch osób przez dwa lata – $1000 \text{ zł} \times 2 \times 24 = 48\,000 \text{ zł}$
(utrzymanie zwierząt w trakcie i po eksperymencie również będzie prowadzone przez osoby prowadzące te badania, w celu uniknięcia kosztów zatrudnienia dodatkowej osoby)

Sprzęt:

Klatki na przepiórki – szacowany koszt jednej klatki – 50 zł: $50 \text{ zł} \times 200 = 10\,000 \text{ zł}$

Inne:

Zakup przepiórek – 9 zł/osobnik: $9 \text{ zł} \times 200 \text{ osobników} = 1800 \text{ zł}$

Wyjazdy na 2 konferencje dla 2 osób – 10 000 zł

Publikacja wyników badań w systemie Open Acces oraz korekta językowa– 5 000 zł

Pokarm dla przepiórek, gastrolity, konserwacja i czyszczenie klatek – 10 000 zł

Przeprowadzenie pomiarów SDA – 10 000 zł

4. Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki.

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki.

Elżbieta Jędrzejczak, Katarzyna Janas

Streszczenie projektu

Zanieczyszczenie powietrza na terenach zurbanizowanym stanowi poważny problem, z którym boryka się wiele aglomeracji, jednak pomimo powszechnej opinii na temat szkodliwego wpływu tego zjawiska na organizmy żywe, zaskakująca jest niewielka ilość badań, które sprawdzały by tę zależność. Ptaki jako organizmy o unikalnej budowie i fizjologii układu oddechowego są szczególnie narażone na przyjmowanie większych dawek zanieczyszczeń.

Oprócz bezpośrednich toksykologicznych efektów takich jak uszkodzenie nabłonka układu oddechowego, spodziewamy się że chroniczna ekspozycja na zanieczyszczenia może upośledzać również funkcjonowanie układu immunologicznego. Dotychczasowe, nieliczne badania na ten temat nie wykazały osłabienia odpowiedzi immunologicznej ptaków, jednak przeprowadzane były w warunkach laboratoryjnych, i nie odzwierciedlały rzeczywistego poziomu narażenia ptaków na zanieczyszczenia. W naszych badaniach organizmem modelowym będą sikory bogatki z dzikich populacji, występujących na terenach miejskich, dzięki czemu unikniemy problemu z ekstrapolacją danych laboratoryjnych na naturalne populacje. W planowanym eksperymencie porównamy parametry świadczące o wydolności układu odpornościowego m. in. siłę odpowiedzi immunologicznej (PHA) i ilość białych ciałek krwi, pomiędzy ptakami odłowionymi w miastach o wysokim i niskim stężeniu zanieczyszczeń powietrza, oraz w Puszczy Białowieskiej.

W obliczu braku rozwiązań mogących w najbliższym czasie znacząco poprawić jakość powietrza w miastach, wiedza o tym jak zanieczyszczenia wpływają na układ odpornościowy ptaków a tym samym pośrednio na ich dostosowanie, ma kluczowe znaczenie w kontekście ochrony bioróżnorodności awifauny miejskiej.

Cel naukowy projektu

Zanieczyszczenie powietrza na terenie aglomeracji miejskich stanowi niezwykle istotny i trudny do rozwiązania problem o ciężkich do oszacowania długoterminowych konsekwencjach. Chociaż powszechna jest wiedza o szkodliwym wpływie tego zjawiska na zdrowie organizmów żywych, opiera się ona w większości na publikacjach dotyczących człowieka. Niezwykle skąpe są natomiast dane dotyczące innych organizmów, występujących w przestrzeni miejskiej, w tym jednej z najliczniejszych grup kręgowców jaką są ptaki. Ze względu na specyficzną budowę i fizjologię układu oddechowego, będącą przystosowaniem do latania, ptaki są w szczególności sposob narażone na zanieczyszczenia atmosferyczne. Nie posiadają również niektórych mechanizmów oczyszczania dróg oddechowych obecnych u ssaków (brak efektywnego usuwania pyłu osadzonego w śluzie z dróg oddechowych, worki powietrzne pozbawione ochrony makrofagów) w związku z tym nie można porównywać między sobą wyników uzyskanych w badaniach tych grup zwierząt (Brown, 1997). W dotychczasowych eksperymentach prowadzonych na ptakach udowodniono szkodliwy wpływ zanieczyszczeń na układ oddechowy,

nie udało się natomiast wykazać szerszego oddziaływania na funkcjonowanie całego organizmu lub innych układów. W tym kontekście szczególnie ciekawe wydaje się zbadanie układu odpornościowego, którego funkcjonowanie jest kluczowe zarówno do przeżycia jak i osiągnięcia sukcesu reprodukcyjnego przez zwierzęta.

Głównym problemem badawczym w naszym projekcie jest wpływ zanieczyszczeń atmosferycznych na wydolność układu odpornościowego u sikory bogatki, testowanym w oparciu o następujące hipotezy:

- 1) odpowiedź immunologiczna PHA jest niższa u ptaków narażonych na zanieczyszczenia
- 2) odpowiedź antybakteryjna osocza jest mniejsza u ptaków narażonych na zanieczyszczenia
- 3) ilość białych ciałek krwi jest mniejsza u ptaków narażonych na zanieczyszczenia.

Dodatkowo sprawdzimy czy ptaki zamieszkujące obszary o większym stężeniu zanieczyszczeń cechują się gorszą kondycją oraz czy długotrwale zwiększone zanieczyszczenie powietrza może być przyczyną przewlekłego stresu.

Znaczenie projektu

Nieliczne przeprowadzone do tej pory badania temat wpływu zanieczyszczeń na fizjologię ptaków nie przyniosły jednoznacznych odpowiedzi. Llacuna i in. (1993) wykazali zmiany w funkcjonowaniu i morfologii nabłonka tchawicy u dziko żyjących wróblowatych. Badania te pokazały jednak wyłącznie lokalne toksyczne oddziaływanie zanieczyszczeń na struktury najbardziej narażone na szkodliwe czynniki. Interesujące jest pytanie czy oprócz bezpośrednich uszkodzeń spowodowanych toksycznym efektem zanieczyszczeń obserwuje się również długotrwale upośledzenie funkcjonowania układu odpornościowego. Próbę odpowiedzi na to pytanie podjęli Cruz-Martinez i in. (2015) nie udało im się jednak wykazać istotnej zmiany w wielkości odpowiedzi immunologicznej u przepiórek i pustulek wystawionych na podwyższone stężenia m. in. tlenków azotu, siarki, benzenu i toluenu. Przyczyną mógł być fakt, że eksperyment przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych, w których ptaki eksponowano na zanieczyszczenia tylko przez 1,5 godziny dziennie.

W planowanym przez nas eksperymencie wykorzystamy dzikie populacje sikory bogatki dzięki czemu unikniemy problemów z ekstrapolacją wyników badań laboratoryjnych na warunki naturalne. Badane przez nas ptaki będą pochodziły z populacji naturalnych a więc takich, które długoterminowo narażone są na rzeczywiste stężenia zanieczyszczeń. Będą to pierwsze tego typu badania mogące dostarczyć danych na temat faktycznego wpływu zanieczyszczeń miejskiego powietrza na wydolność układu odpornościowego.

Badanie wydolności układu odpornościowego jest istotne ponieważ ma ona kluczowe znaczenie dla kondycji ptaka i może przyczynić się do obniżonej przeżywalności i zmniejszonej rozrodczości. W obliczu braku rozwiązań mogących w najbliższym czasie znacząco poprawić jakość powietrza w miastach, wiedza o tym jak zanieczyszczenia wpływają na układ odpornościowy ptaków będzie mieć praktyczne znaczenie w kontekście ochrony bioróżnorodności awifauny miejskiej.

Koncepcja i plan badań

Oddziaływanie zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu immunologicznego testowane będzie na trzech grupach ptaków:

Grupa 1. Ptaki z aglomeracji o zanieczyszczeniu powietrza przekraczającym ustawowe normy przez większość dni w roku - Kraków, Katowice

Grupa 2. Ptaki z aglomeracje o nieprzekroczonych normach zanieczyszczeń przez większość dni w roku – Gdańsk, Poznań

Grupa 3. Ptaki z naturalnych terenów leśne o częściowo zachowanym pierwotnym charakterze – Puszcza Białowieska.

Badania prowadzone będą przez trzy kolejne lata, w miesiącach zimowych, które cechują się najwyższymi stężeniami zanieczyszczeń. W każdej z pięciu lokalizacji, wykonywane będzie dwukrotne odławianie ptaków. Podczas pierwszego odłowu ptaki zostaną zaobrączkowane i zmierzone, pobrana będzie krew do badań laboratoryjnych, oraz zaaplikowane PHA. Po 24 godzinach dokonamy ponownego odłowu, podczas którego u osobników powtórnie złapanych sprawdzona zostanie odpowiedź immunologiczna na czynnik PHA.

Główna hipoteza badawcza zakładająca obniżenie wydolności układu immunologicznego w związku z długotrwałą ekspozycją osobników na zanieczyszczenia powietrza, testowana będzie poprzez odpowiedzi na następujące pytania: Czy u ptaków narażonych na długotrwałe wysokie stężenia zanieczyszczeń atmosferycznych, zmniejszeniu ulega: 1) odpowiedź immunologiczna PHA? 2) odpowiedź antybakteryjna osocza? 3) ilość białych ciałek krwi? Zarówno ilość białych ciałek krwi, wielkość odpowiedzi antybakteryjnej osocza oraz odpowiedzi immunologicznej PHA są bezpośrednio związane z wydolnością systemu immunologicznego u zwierząt. Odpowiedzi na powyższe pytania dadzą więc podstawy do określenia czy obecne są różnice w wielkości odpowiedzi immunologicznej u ptaków pochodzących z rejonów o różnym stężeniu zanieczyszczeń.

Ponadto chcemy sprawdzić czy ptaki z terenów zanieczyszczonych cechują się ogólnie gorszą kondycją oraz czy wykazują objawy chronicznego stresu. W tym celu odpowiemy na pytania 4) Czy wielkość ciała u ptaków narażonych na zanieczyszczenia jest mniejsza? 5) Czy poziom hematokrytu jest niższy u ptaków narażonych na zanieczyszczenia? 6) Czy poziom kortykosteronu jest większy u ptaków narażonych na zanieczyszczenia?

Metodyka Badań

Gatunek modelowy

Modelowym gatunkiem w badaniach będzie sikora bogatka (*Parus major*), która dzięki szerokiemu zasięgowi, dużym liczebnościom oraz bardzo dobrze poznanej biologii jest często wykorzystywanym gatunkiem w badaniach zanieczyszczeń środowiska (Costa i in. 2014)

Część terenowa badań

Aglomeracje do badań wybrano na podstawie danych z raportu o zanieczyszczeniu powietrza w Polsce w 2013, sporządzonego przez GIOŚ. Wśród miast wojewódzkich wytypowano po dwa o najniższym i najwyższym wskaźniku zanieczyszczeń. Dla skontrastowania wyników z obydwu grup miejskich jako ostatnią lokalizację wyznaczono Puszcę Białowieską.

W każdej lokalizacji odłowu ptaków wykonane zostaną w pobliżu doglądanych przez całą zimę karmników. W okresie zimowym ptaki gromadzą się w pobliżu źródeł łatwego pożywienia co zwiększa prawdopodobieństwo ponownego odłowu. W aglomeracjach wybrano miejsca zlokalizowane możliwie najbliżej centrum.

Badania planowane są na trzy kolejne lata i każdego roku przeprowadzane będą w styczniu.

Podczas pierwszego odłowu, w każdej z lokalizacji schwytych zostanie 60 osobników. Od każdego złapanego osobnika w pierwszych dwóch minutach od schwytania (w celu zminimalizowania efektu krótkotrwałego stresu) pobrana zostanie próbka krwi (2 kapilary – ok.

140 µl krwi). Następnie zmierzone zostaną długość skoku i skrzydła, określona zostanie płeć osobnika, wykonana będzie iniekcja czynnikiem PHA (zgodnie z Smits i in. 1999) oraz nałożona będzie obrączka z numerem identyfikacyjnym. Po upływie 24 godzin przeprowadzone zostaną ponowne odłowów w celu zbadania wielkości odpowiedzi immunologicznej na podanie PHA. Aby uzyskać wystarczającą wielkość próby zakładamy co najmniej 50% frekwencję ponownych odłowów. Odłowionym ponownie sikorom zmierzona zostanie wielkość opuchlizny powstałej na skutek odpowiedzi na PHA.

Analizy laboratoryjne.

W celu określenia liczby białych ciałek krwi (WBC) wykonane zostaną rozmazy według metody podanej w Costa i in. (2014). Jako miarę WBC oszacowana zostanie liczba leukocytów na 10 000 erytrocytów. Poziom hematokrytu zmierzony zostanie poprzez odwirowanie kapilary w wirówce przez 10 minut w 10 tys r.p.m. i następnie pomierzenie wysokości słupa erytrocytów (jak w Ots i in. w 1998 r.). Odwirowane osocze wykorzystane zostanie w teście odpowiedzi antybakteryjnej. Na szalkach z podłożem agarowym naniesione zostanie po 5 µl surowicy (próby kontrolne bez surowicy) sikor zaszczipionej bakterią *Escherichia coli*(ATCC, szczep 8739) i inkubowane według metody podanej w Tieleman i in. (2005). Po upływie 12 godzin policzone zostaną wyrosłe kolonie. Poziom kortykosteronu w osoczu zmierzony zostanie przy pomocy dostępnych komercyjnie testów ELISA (ENZOLifeSciences, ADI, 900-097, Farmingdale, NY, USA) według metody podanej w Wada i in. 2007.

Dane o zanieczyszczeniu

Wszystkie informacje o stężeniach najważniejszych gazowych oraz pyłowych zanieczyszczeń, na terenie badań, pochodzą będą z raportów Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska. W analizach uwzględnione zostaną zanieczyszczenia pyłem PM 10 i PM 2,5 oraz zanieczyszczenie tlenkami siarki, azotu, węgla i benzenem.

Analiza statystyczna

Zgromadzone dane zostaną sprawdzone pod kątem normalności rozkładu i jednorodności wariancji. Przy braku przeciwwskazań formalnych przeprowadzona zostanie analiza wariancji z uwzględnieniem roku pomiarów oraz płci osobników.

Literatura:

Brown R.E., Brain J.D., Wang N. 1997. The avian respiratory system: a unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. *Environ. Health Perspect.*, 105, p. 188.

Costa R.A., Eeva T., Eira C., Vaqueiro J., Medina P., Vingada J.V. 2014. Great tits breeding performance and mercury contamination from the paper and pulp industry in the west coast of Portugal. *Chemistry and Ecology* 11, 30(3):206-215.

Cruz-Martinez L., Smits Judit E.G., Fernie Kim. 2015. Stress response, biotransformation effort, and immunotoxicity in captive birds exposed to inhaled benzene, toluene, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 112, p. 223–230.

Llacuna S., Gorriza A., Durfort M., Nadal J. 1993. Effects of air pollution on passerine birds and small mammals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, p. 59–66.

Tieleman BI, Williams JB, Ricklefs RE, Klasing KC. 2005. Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, p. 1715–1720.

Smits J., Bortolotti G.R., Tella J.L.. 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.*, 13, p. 567–572.

Wada. H., Hahn T.P., Breuner C.W. 2007. Development of stress reactivity in white crowned sparrow nestlings: total corticosterone response increases with age, while free corticosterone response remains low. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 405–413.

Koszty:

Treść	Planowane koszty w roku (zł)			łącznie
	2016	2017	2018	
1. Koszty bezpośrednie, w tym:	73 500	27 300	35 300	136 100
a) Wynagrodzenia wykonawców projektu	24 000	24 000	24 000	72 000
b) Sprzęt i odczynniki	46 000	0	0	46 000
c) Inne koszty bezpośrednie	3 500	3 300	11 300	18 100
2. Koszty pośrednie 20%	5 500	5 460	7 060	18 020
Łączne koszty (1+2)	79 000	32 760	42 360	154 120

Uzasadnienie kosztów:

Wynagrodzenia wykonawców projektu: 72 000 zł (2*12 miesięcy*3 lata* 1000 zł)

Sprzęt i odczynniki:

- Odczynniki laboratoryjne: 45 000 zł (m. in. PHA, ELISA, szalki z podłożem agarowym, szczep ATCC)
- Sprzęt : 1 000 zł (np. suwmiarka, obrączki, kapilary, igły, strzykawki)

Inne koszty bezpośrednie:

- Koszty badań terenowych: 10 100 zł, w tym :
 - koszty paliwa: 4 400 zł
 - diety wyjazdowe: 2 700 zł
 - zakwaterowanie: 3 000 zł
- Wyjazd na zagraniczną konferencję: 8 000 zł (4 000 zł * 2)

RECENZJE

Recenzja projektu pt. „Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki”

Projekt dotyczy wpływu zanieczyszczeń na wydolność układu immunologicznego u sikor, a przynajmniej tak można sądzić po jego tytule. Zagadnienie jest ważne z punktu widzenia postępujących zmian w ekosystemach, które są kluczowym zagadnieniem w biologii konserwatorskiej. Mimo niewątpliwego znaczenia tych zagadnień plan projektu nie do końca pozwala odpowiedzieć na postawione w nim pytania.

Dużo wątpliwości budzi kwestia prowadzenia badań na ptakach odłowionych w naturze w siedliskach zurbanizowanych i naturalnych. Uwaga auterek, że wiele badań eksperymentalnych nie ma przełożenia na rzeczywistość jest jak najbardziej na miejscu, ale z drugiej strony badania, które są przedstawione we wniosku nie stwierdzają tego co mają stwierdzić, czyli wpływu zanieczyszczeń. Zamiast tego opisują różnice pomiędzy dwoma typami siedlisk, które różnią się pomiędzy sobą między innymi stopniem zanieczyszczenia, ale nie tylko. Należy wziąć pod uwagę, że różny jest także poziom drapieżnictwa, dostępności pokarmu, konkurencji i całej gamy innych czynników. Wg mnie nie umniejsza to wartości tych badań, tym bardziej, że autorki podkreślają, że są to pierwsze tego typu badania, ale zmienić należy podejście do wyciągania wniosków, tak żeby było adekwatne do wyników jakie zostaną zebrane.

Badania będą prowadzone w różnych typach miast, które mają odpowiadać różnemu poziomowi zanieczyszczeń. A co z innymi różnicami? Być może miasta te różnią się pomiędzy sobą nie tylko zanieczyszczeniami pyłami i tlenkami, ale też poziomem hałasu czy zanieczyszczenia światłem, dostępnością pokarmu i szeregiem innych czynników. Jest to problem bardzo podobny do tego, który został wspomniany wcześniej. Być może lepiej byłoby w każdym mieście wytypować i zbadać parametry odpowiedzi immunologicznej w gradiencie urbanizacyjnym, który w większości przypadków odzwierciedla poziom zanieczyszczeń, a dodatkowo zrobienie tego w kilku miastach pozwoliłoby określić powtarzalność zależności?

Projekt jest kosztowny, ale przy tak dużym wkładzie pracy terenowej i laboratoryjnej wydaje się to uzasadnione. Niemniej jednak należy uszczegółowić kosztorys tak aby czytelnik miał lepsze wyobrażenie o faktycznych kosztach przypisanych do poszczególnych elementów projektu. Pomysł uważam za wartościowy i potrzebny, ale mam poważne wątpliwości dotyczące wnioskowania i metodyki poboru prób, które koniecznie należy zmodyfikować aby realizacja projektu miała sens. Dużą zaletą projektu jest to, że nie jest przekombinowany, widać dobrą znajomość metod laboratoryjnych u auterek projektu.

Stanisław Bury

Recenzja projektu „Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki”

Bardzo podoba mi się temat tego projektu. Zanieczyszczenie powietrza jest ważną kwestią, a ptaki z powodu szczególnej budowy układu oddechowego i dużej „medialności” są wdzięcznym obiektem badawczym. Jednak wydaje mi się, że kilka kwestii mogło by być lepiej opracowanych.

Po pierwsze, w sekcji dotyczącej uzasadnienia badań, stwierdzenie, że nie ma rozwiązań mogących poprawić jakość powietrza jest zbyt pesymistyczne i poddaje w wątpliwość celowość

badan. Skoro nie da się smogu zwalczyć, to po co umartwiać się gromadząc wiedzę o jego konsekwencjach? Tymczasem potencjalne rozwiązania istnieją (np. ograniczenie używania węgla w domowych piecach), brak tylko woli społecznej i politycznej potrzebnej do ich wprowadzenia. Wyniki badań na sikorach – powszechnie znanych i lubianych ptakach – mogą posłużyć zwiększaniu świadomości społecznej na temat problemu smogu i ułatwić wprowadzenie zmian na rzecz poprawy jakości powietrza. Po drugie, można by poruszyć wątek ochrony ptaków. Być może poprzez dokarmianie sikor w zanieczyszczonych miastach bardziej im szkodzimy, zanęcając do obszarów silnie zanieczyszczonych, a to może być dla nich pułapką ekologiczną. Poza tym, aby opublikować wyniki w dobrym międzynarodowym czasopiśmie, przydałoby się zwrócić uwagę na szerszy kontekst problemu – zanieczyszczenia powietrza są problemem nie tylko w Polsce.

Odnosnie metodyki mam kilka wątpliwości. Po pierwsze: ptaki są zwierzętami wyjątkowo mobilnymi. Zwłaszcza poza sezonem lęgowym mogą przemieszczać się na duże odległości, więc np. osobniki złapane w centrum Krakowa nie koniecznie musiały przebywać tam całą zimę. Żeby wykazać, że rzeczywiście były poddane długotrwałemu oddziaływaniu zanieczyszczeń trzeba by przytoczyć wcześniejsze badania pokazujące, że bogatki zimą nie oddalają się od ulubionego karmnika, przeprowadzić eksperyment pilotażowy lub jako jeden z etapów doświadczenia obrączkować ptaki późną jesienią i w styczniu brać do eksperymentu tylko „stacjonarne”, oznakowane osobniki.

Po drugie, nie można ad hoc zakładać co najmniej 50% frekwencji ponownych odłowów po 24 godzinach – nie wiemy, jaka to będzie naprawdę liczba. Może się okazać, że będzie ich znacznie mniej – ptaki mogą przez pewien czas unikać miejsca schwymania, szczególnie w mieście, gdzie mają pod dostatkiem alternatywnych karmników w bezpośrednim sąsiedztwie. Po drugie osobniki odłowione powtórnie mogą być nielosową próbką schwytnych za pierwszym razem. Gdyby się okazało, że np. ptaki osłabione rzadziej dają się złapać ponownie (bo np. częściej giną w wyniku stresu), wówczas wśród powtórnie schwytnych ptaków dominowałyby osobniki o dobrej kondycji i nie wykrylibyśmy różnicy między miastami, nawet, gdyby rzeczywiście w miastach bardziej zanieczyszczonych było więcej ptaków o złej kondycji.

Po trzecie nie rozumiem potrzeby tworzenia podwójnej grupy kontrolnej. Różnice między ptakami z Puszczy Białowieskiej i z miast mogą wynikać z bardzo wielu dodatkowych czynników, których zbadanie nie jest przedmiotem tego projektu. Poza tym najbliższa puszczy stacja pomiaru jakości powietrza znajduje się dopiero w Białymstoku, więc trudno będzie uzyskać dokładne informacje na temat poziomu zanieczyszczeń w puszczy, co może utrudnić porównania (dane z <http://www.wios.bialystok.pl/index.php?go=air>).

Po czwarte – długość skoku ptaka ustala się w czasie wzrostu piskląt, natomiast długość skrzydła – w czasie ostatniego pierzenia, zwykle jesienią. Tak więc oba te parametry raczej nie oddają warunków, w jakich ptak przebywa na zimowisku. Uwzględnienie morfometrii wymagałoby dodatkowych wyjaśnień. Może mają to być to parametry kontrolne sprawdzające, czy inne różnice pomiędzy miejscami odłowów nie mają większego wpływu na kondycję zwierząt? Aby wykorzystać te informacje do oceny wieloletniego wpływu zanieczyszczeń na ptaki trzeba by wiedzieć, czy zwierzęta rzeczywiście przebywały przez tak długi czas na terenie, gdzie je schwymano.

Na koniec bardziej techniczna uwaga dotycząca cytowań. W spisie literatury zabrakło przytoczonej pracy Ots i in. 1998 oraz wspomnianych raportów Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska. Te raporty, jako źródło danych o zanieczyszczeniach, powinny też być zacytowane przy uzasadnieniu wyboru miast, w których będą chwytnane ptaki.

Podsumowując, projekt porusza ciekawą i ważną tematykę, jednak problemy metodyczne mogą utrudnić uzyskanie i interpretację wyników.

Marta Czarnocka-Cieciura

Ocena merytoryczna projektu

Przesłany projekt jest wewnętrznie spójny, a wszystkie etapy zostały przejrzysto zaplanowane. Zagadnienie jest nowatorskie i należy do dziedziny nauk podstawowych. Projekt nie ma bardzo dużego wpływu na rozwój dyscypliny naukowej, ale jego charakter jest naukowy, a uzyskane wyniki mogą być opublikowane w szeregu czasopism naukowych.

Wpływ zanieczyszczenia na środowisko jest wiecznie żywym tematem. Badano już to zagadnienie pod bardzo różnym kątem i na wielu różnych organizmach. Omawiany projekt porusza aspekt miejskiego smogu, którego obecność w polskich miastach stała się w ostatnim czasie przedmiotem żywych dyskusji. Ten aspekt podkreśla istotność zaplanowanych badań. Obiekt badań, którym są ptaki jest przekonująco uzasadniony, a metody oceny zdrowia ptaków powszechnie stosowane. Dobrym pomysłem jest wykorzystanie karmnika jako miejsca w którym gromadzą się ptaki zimą. Prawidłowe jest też wzięcie pod uwagę okresu największego zapylenia w miastach związanego z paleniem w piecach. Można rozważyć badanie pod koniec okresu grzewczego kiedy okres ekspozycji na zanieczyszczenia był długi, a średnie temperatury bardziej korzystne dla zwierząt. Nie jestem pewien czy trudne zimowe warunki połączone ze stresem i pobraniem krwi nie osłabią znacząco ptaków.

Ocena kosztorysu

Kosztorys projektu został sporządzony starannie i przejrzysto. Całość sprawia przekonujące wrażenie, a kwota całkowita nie jest zawyżona.

Ocena możliwości wykonania

Badania zaplanowane w projekcie wydają się być wykonalne w założony przez autorki sposób. Metodyka została sporządzona skrupulatnie. Próba ptaków, która by była pobrana w terenie jest wystarczająca. Czas projektu został rozłożony na trzy lata ze względu prawdopodobnie na konieczność trzykrotnego powtórzenia pomiarów w różnych miejscach. Autorki zaplanowały, że 50% ptaków uda się złapać ponownie co może się okazać trudne do zrealizowania. Brakuje oceny ryzyka.

Mocne strony wniosku

- Nowatorski projekt dotyczący tematu będącego ostatnio w centrum zainteresowań społecznych
- Udany wybór obiektu doświadczalnego, jakim są miejskie ptaki
- Dobre rozplanowanie i opisanie projektu

Słabe strony wniosku

- Optymizm założeń
- Możliwość narażenia ptaków na śmierć w trudnym dla nich okresie

Jakub Dębowski

Recenzja projektu „Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki”

Praca porusza bardzo aktualny problem zanieczyszczenia polskich miast i negatywnego wpływu jaki wywiera ono na zdrowie jego mieszkańców. Jednocześnie coraz więcej gatunków zwierząt bytujących do tej pory w lasach przenosi się do miast, narażając się na kontakt z zanieczyszczeniami. Ochrona tych gatunków powinna więc mieć na względzie, że środowisko miejskie może osłabiać zdrowie żyjących w nim osobników. Zagadnienie czy i w jaki sposób zanieczyszczenia powietrza oddziałują na ptaki rzeczywiście jest warte zbadania.

Pewnym przeciwwskazaniem do przyznania grantu może być fakt, że według informacji zawartych w tekście podobne badania były już przeprowadzane w warunkach laboratoryjnych. Moim zdaniem przewagą badania ptaków wolno żyjących w mieście nad przytoczonymi badaniami laboratoryjnymi jest możliwość sprawdzenia skutków długotrwałej ekspozycji na zanieczyszczenia. Ptaki żyjące w mieście są wystawione na ich działanie praktycznie przez całe swoje życie, co może o wiele silniej wpływać na ich zdrowie niż krótkotrwałe poddanie działaniu zanieczyszczonego powietrza. Z drugiej strony mogła się w nich rozwinąć tolerancja na ten czynnik, co również byłoby warte zbadania.

W warunkach naturalnych stężenie zanieczyszczeń może się zmieniać w ciągu roku, osiągając najwyższe wartości w zimie. Zrozumiałym jest, że badania mają zostać przeprowadzone w okresie największej ekspozycji na zanieczyszczenie. Można by się jednak zastanowić nad zbadaniem długofalowych efektów życia w takich warunkach, które mogłyby skutkować obniżoną odpornością również w okresach osłabienia intensywności czynnika stresowego, i powtórzyć badania w lecie. Nie jest również wytłumaczone, dlaczego wybrano tylko jedną lokalizację o czystym powietrzu podczas gdy wytypowano po dwa miasta przydzielone do dwóch różnych poziomów zanieczyszczenia. Wyrównanie ilości prób, a nawet zwiększenie liczby lokalizacji do trzech przypadających na każdy poziom zanieczyszczenia zwiększyłoby wiarygodność statystyki. Poszczególne lokalizacje najprawdopodobniej różnią się proporcją rodzajów i wielkości zanieczyszczeń, co może wywierać różnorodny wpływ na zdrowie ptaków. Jest to nie do uniknięcia, ale może prowadzić do zwiększenia różnic obserwowanych między miejscami pobierania próbek.

Sposób odłowu ptaków nie budzi zastrzeżeń, lecz warto byłoby zadbać by odbywał się on w możliwie zacisznym miejscu, z dala od głównych ulic, by zmniejszyć ryzyko ingerencji innych czynników stresogennych w zdrowie ptaków. Dodatkowo trzeba pamiętać, że fakt pobrania krwi nie jest dla ptaków neutralny, mogą potrzebować kilku dni lub nawet tygodnia na odbudowanie puli krwinek, co może zaburzyć pomiar odpowiedzi immunologicznej przeprowadzanej jednocześnie na tym samym osobniku.

Część literaturowa projektu wydaje się być rzetelnie przygotowana, co dotyczy zarówno teoretycznych podstaw projektu opartych na wynikach wcześniejszych badań, jak i zorientowania w metodach badawczych stosowanych w tego typu testach. Niemniej jednak odnoszę wrażenie, że autorzy projektu nie dość jasno przedstawiają zgromadzoną wiedzę czytelnikowi ich aplikacji. Szczególnie trudno zorientować się w istocie planowanych testów – nie zostało nigdzie wspomniane czym jest PHA i jaki efekt wywołuje jego podanie, ani na czym polega test odpowiedzi antybakteryjnej. W którym momencie sikory mają być szczepione bakteriami? Proponuję też obliczenie ilości białych krwinek w odniesieniu do objętości krwi zamiast liczby erytrocytów, skoro jednym ze spodziewanych efektów jest zmiana liczby czerwonych krwinek możliwa do zaobserwowania przez spadek hematokrytu.

Mocną stroną projektu jest dobrze sprecyzowany problem i wielość testów sprawdzających parametry ciała i układu odpornościowego zwierząt przy możliwie małej ingerencji w ich zdrowie.

Słabość projektu polega na nie dość precyzyjnym przedstawieniu metod, niektóre aspekty samego układu eksperymentalnego również wymagają ponownego przemyślenia. Mimo to myślę, że po odpowiednim doszlifowaniu projekt może znacznie zyskać na atrakcyjności.

Małgorzata Lipowska

Recenzja projektu „Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki” autorstwa pani Elżbiety Jędrzejczak i pani Katarzyny Janas

Omawiany projekt dotyczy bardzo aktualnego i prawdopodobnie rosnącego problemu jakim jest wpływ zanieczyszczenia powietrza na żywe organizmy, pozostające pod jego wpływem. W tym wypadku są to ptaki, które jak zaznaczają autorki projektu, powinny być szczególnie wrażliwe na ten czynnik. Autorki zwracają uwagę na słaby stopień poznania zagadnienia na drodze badań i na fakt że przeprowadzone badania nie zdołały dowieść tego wpływu, jednocześnie wskazując na uchybienia w stosowanej metodyce. Głównym problemem badawczym w projekcie jest wpływ zanieczyszczeń atmosferycznych na odpowiedź immunologiczną oraz dodatkowo, czy ptaki eksponowane na zanieczyszczenia cechują się gorszą kondycją i wyższym poziomem przewlekłego stresu.

Jeśli chodzi o część wprowadzającą i opis znaczenia projektu, mam zastrzeżenie co do przedstawienia zagadnienia – o ile sam opis jest zrozumiały i zwięzły, to jednak uważam że do podanych stwierdzeń powinno podać się więcej cytacji, by zainteresowana osoba czytająca tekst mogła samodzielnie sięgnąć do literatury. Poza tym nie ma się do czego przyczepić ☺

Jeśli chodzi o koncepcję i metodykę badań, mam trzy metodyczne uwagi.

Po pierwsze, skoro do eksperymentu brane są po dwa miasta z różnych regionów Polski, to również obszary kontrolne powinny być dwa, żeby zmniejszyć prawdopodobieństwo że część z wyników będzie efektem jakiegoś innego czynnika występującego tylko w Puszczy Białowieskiej (np. stresu związanego z większą presją drapieżniczą – Krakowie i Poznaniu zapewne nie ma sóweczki ☺).

Po drugie, sama lokalizacja grupy kontrolnej budzi wątpliwości – o ile w dużych miastach, mimo położenia w regionach o różnym klimacie, możemy spodziewać się podobnych warunków, to wybór na obszar porównawczy kompleksu leśnego położonego na NE Polski może mieć wpływ na wyniki. I należy tu podkreślić że wybrano albo miasta położone na obszarach o niemal najwyższych średnich temperaturach w Polsce (Kraków, Katowice, Poznań – wszystkie o temperaturze rocznej ponad 8 – 8.5°C) albo miasto o wprawdzie chłodniejszym klimacie, ale w stosunku do większości obszaru Polski dużo łagodniejszej zimie (Gdańsk). Natomiast Puszcza Białowieska jest położona w jednym z zimniejszych obszarów Polski (poza górami). Ostrzejszy klimat również może być stresorem. Moim zdaniem powinny być wybrane dwa duże kompleksy leśne położone z dala od miast, ale w regionach o podobnym klimacie. Intuicyjnie do wyboru mamy np. Lasy Lublinieckie, Puszcę Notecką, Bory Tucholskie, Puszcę Sandomierską.

Po trzecie, sam rozmiar może nie być dobrym predykatorem kondycji, i to do tego związanej akurat z wpływem zanieczyszczeń. Równie dobrze poszczególne populacje mogą być większe bądź mniejsze z powodu doboru na przeciskanie się przez mniejsze szpary w siedliskach antropogenicznych, ze względu na niską podaż pokarmu (i wtedy w miastach mogą być większe☺) albo czynniki klimatyczne. Wiemy że zawartość tłuszczu w ciele jest u ptaków bardzo zmienna i nie nadaje się do pomiarów kondycji. Może więc lepiej byłoby znaleźć jakiś inny sposób na zbadanie kondycji złapanych osobników? Jakiś test sprawnościowy typu jak długo osobnik jest w stanie wyrwać się z dłoni podczas złapania? Może intensywność ubarwienia albo stan piór może być tu wskaźnikiem? Ostatecznie można z tej kondycji zrezygnować, mając na uwadze że i tak jedną z jej miar będzie odpowiedź immunologiczna.

Opis metodyki badań terenowych i laboratoryjnych jest zwięzły ale zrozumiały, z jednym zastrzeżeniem. Jako biolog trochę bardziej terenowy, nie mam dużej wiedzy na temat

immunologii, i wyobrażam sobie że wielu innych recenzentów też mogłoby podzielać moje spostrzeżenie. Dlatego uważam że dobrym rozwiązaniem byłoby podanie krótkiego opisu każdego badanego parametru i w jakich wartościach dla każdej z populacji potwierdza on daną hipotezę.

Jeśli chodzi o charakter wniosku, to niewątpliwie jest on naukowy oraz spełnia kryteria badań podstawowych, jednocześnie oferując możliwość wykorzystania wyników w działaniach aplikacyjnych i edukacyjnych. Spełnia też pozostałe wymagania i jest wykonany rzetelnie. Projekt jest bardzo dobry i niezależnie od otrzymanych wyników (bo jeśli nie potwierdzi hipotez, to znaczy że będziemy zdrowi w Krakowie ☺), rokuje na powstanie kilku publikacji w recenzowanych czasopismach o wysokim IF. Jest to projekt stosunkowo nowatorski, aczkolwiek nie będzie miał dużego wpływu na samą dyscyplinę naukową, a bardziej na zrozumienie pewnych zjawisk dotychczas znanych głównie z przewidywań. Możliwość wykonania jest niewątpliwie wysoka, i jedynym czynnikiem limitującym jest tu prawdopodobieństwo ponownego odłowienia odpowiedniej liczby ptaków, które jednak niskim kosztem można w razie potrzeby podwyższyć. Kosztorys jest poprawny, aczkolwiek przeznaczyłbym większe środki na wyjazdy terenowe, ze względu na dosyć dużą nieprzewidywalność odławiania się ptaków i możliwą potrzebę kilkukrotnego odwiedzenia stanowisk.

Mocne strony:

- interesująca tematyka
- możliwość wykonania
- publikowalność wyników i charakter naukowy
- rozsądny kosztorys
- dobrze zaplanowane badania

Słabe strony:

- niektóre uchybienia w metodyce
- opis celu, koncepcji i metodyki powinien być trochę bardziej przystępny dla osoby niewtajemniczonej

Bartłomiej Zając

Celem projektu jest zbadanie wpływu zanieczyszczeń powietrza na aktywność układu odpornościowego u sikory bogatki.

Jest to na pewno ważny problem, mający potencjalnie poważne zastosowanie praktyczne. Sam obiekt badań jest dobrze wybrany – bogatka jest bardzo pospolitym i dobrze zbadanym gatunkiem. Wreszcie zaplanowane metody nie wzbudzają większych zastrzeżeń (poza jedną kwestią, opisaną poniżej).

Badania zostaną przeprowadzone na pięciu dzikich populacjach bogatki, dzięki czemu – jak tłumaczy autorki – ‘unikniemy problemów z ekstrapolacją wyników badań laboratoryjnych na warunki naturalne’. Niestety, oznacza to pojawienie się innego, można powiedzieć ‘klasycznego’ problemu w badaniach terenowych. Warunki w jakich żyją wybrane populacje różnią się nie tylko poziomem zanieczyszczenia lecz także szeregiem innych czynników mogących wpływać na wydolność układu odpornościowego. Białowieża ma na pewno bardziej surowy klimat niż Poznań czy Gdańsk (bliskość morza!). Miejsca mogą różnić się także ilością i jakością pokarmu (choć to

do pewnego stopnia może być ‘wyrównane’ prowadzeniem odłowów koło karmników). Dla ptaków z miasta sama obecność ludzi koło karmnika będzie zapewne znacznie mniejszym stresem niż dla populacji z Białowieży. W dodatku sikory bogatki w Polsce są częściowo migrujące (Awifauna Polski, Tomiałojć i Stawarczyk 2003), i jest to częstsze na wschodzie kraju. Podczas gdy populacje z Poznania czy Katowic są zapewne osiadłe, nie wiadomo jakie ptaki zostaną zbadane w Puszczy Białowieskiej. Jest możliwe że dostępność pokarmu (np. w okresie wzrostu) lub obecność migrantów w Puszczy Białowieskiej będą miały znacznie większy wpływ na wielkość ciała niż poziom zanieczyszczeń.

Teoretycznie są trzy sposoby jakimi można minimalizować ten problem. Po pierwsze, ponieważ badania zostaną przeprowadzone w ciągu trzech lat, zapewne w różnych warunkach pogodowych, można starać się oszacować statystycznie wpływ np. temperatury (a więc pośrednio także np. dostępności pokarmu) na zmienność mierzonych parametrów. Po drugie, można wybrać populację zamieszkującą jakiś las w centralnej lub zachodniej Polsce zamiast Puszczy Białowieskiej. Będzie ona i tak bardziej ‘dzika’ niż ptaki z centrum dużego miasta, a będzie żyła w bardziej zbliżonych warunkach klimatycznych. Po trzecie, można dodać jakieś bezpośrednie badania poziomu zanieczyszczeń w organizmie ptaków (najlepiej przyżyciowe), co umożliwi bardziej precyzyjną ocenę poziomu zanieczyszczeń z jakimi stykają się poszczególne osobniki, i w efekcie może zwiększyć moc testów (testy na poziomie zmienności międzysobniczej a nie tylko zmienności między populacjami).

Mówiąc krótko, samo wykazanie że odpowiedź immunologiczna sikor w Białowieży jest inna niż w miastach nie może być ‘sprzedane’ jako dowód na wpływ zanieczyszczeń. Niestety, autorki ani razu nie odnoszą się do faktu istnienia wymienionych przeze mnie ‘confounding factors’ i w jaki sposób zamierzają je kontrolować. Obawiam się że może to poważnie utrudnić opublikowanie wyników takich badań, a w przypadku prawdziwego projektu mogłoby to spowodować jego odrzucenie.

Drugi istotny problem to badanie odpowiedzi na PHA. Wymaga to dwukrotnego odłowienia tego samego osobnika i autorki oczekują co odłowią po raz drugi co najmniej 50% ptaków. Niestety, zmiana grubości opuchlizny po podaniu PHA jest dość dynamiczna i zwykle jest mierzona po 24 godzinach od podania. Zbyt wczesny/za późny drugi odłów może sprawić że dane będą bezużyteczne. Do pewnego stopnia czas między pomiarami może być użyty jako kowarianta, ale na pewno nie jest to najlepsze rozwiązanie. Autorki powinny wprost napisać dlaczego uważają że taki pomiar jest możliwy (cytaty z badaniami PHA u dziko żyjących ptaków; własne dane dla prawdopodobieństwa ponownych odłowów itp.).

W tekście znajduje się trochę błędów czy niezręcznych sformułowań. ‘Brown, 1997’ na końcu strony 1 to ‘Brown i in.’. Nie wiadomo co to jest ‘powszechna opinia na temat szkodliwego wpływu tego zjawiska’ lub na czym polega ‘specyficzna budowa i fizjologia układu oddechowego’ ptaków. Bardziej poważnym problemem jest zdanie które ma tłumaczyć znaczenie projektu: ‘W obliczu braku rozwiązań mogących w najbliższym czasie znacząco poprawić jakość powietrza w miastach, wiedza o tym jak zanieczyszczenia wpływają na układ odpornościowy ptaków (...) ma kluczowe znaczenie w kontekście ochrony bioróżnorodności awifauny miejskiej’. Domyślam się że autorki mają nadzieję że wyniki ich badań znajdą zastosowanie w przygotowywaniu takich ‘rozwiązań’, ale w takim razie lepiej jest napisać wyraźnie coś w stylu ‘wyniki naszych badań przyczynią się do...’.

Paweł Brzęk

Recenzja projektu „Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki”

Ten projekt jest klasycznym przykładem takiego uprawiania nauki, które Polskę stawia w jednej z najniższych pozycji w Europie i powoduje, że nasz udział w grantach ERC jest minimalny. Otóż w innych krajach początkującym uczonym (studentom, doktorantom) pokazuje się jakie są najważniejsze nierozwiązane problemy (teoretyczne lub praktyczne) w ich dziedzinie, w nadziei, że młodym umysłom może się udać dokonać ważnego przełomu w tej dziedzinie. Wiadomo bowiem, że starym uczonym na pewno się nie uda. Tym młodym ludziom może się nie udać, ale ich obowiązkiem jest podjąć próbę. Nie należy zaczynać badań, wyniki których na pewno nie zostaną opublikowane ani w *Nature*, ani w *Science*, ani nawet w *Journal of Animal Ecology*.

A my w Polsce nie mówimy studentom jakie są ważne nierozwiązane problemy, tylko uczymy ich technik laboratoryjnych, aby lepiej realizowali nasze nie zawsze najlepsze pomysły. W ten sposób młodzi ludzie żyją w przekonaniu, że nauka polega li tylko na znajomości metod laboratoryjnych. Gdy się ich zmusi do zaprojektowania czegoś nowego, to biorą oparty na powszechnym przekonaniu pomysł – zróbmy coś dla ochrony środowiska. Nie wiedzą niestety po co taki projekt wykonywać i co ważnego ma z tego projektu wynikać.

Powiem prosto: nie wiadomo po co recenzowany tu projekt ma by wykonywany. Przecież młodzi ludzie mają tylko jedno życie, po co zajmować się rzeczami mało ważnymi i po co Skarb Państwa ma takie badania finansować. Ta zależność między odpornością sikorek na zanieczyszczenia a bioróżnorodnością jest ogromnie naciągana. Nie ma żadnych danych, że ta bioróżnorodność maleje wraz z zanieczyszczeniem miast, przeciwnie rośnie bo tam gdy jest zanieczyszczenie, jest duże zagęszczenie ludzi, którzy wyrzucają dużo śmieci przyciągających ptaki. A dostępność pokarmu i miejsc lęgowych wydaje się znacznie ważniejsza od zanieczyszczeń. A gdyby się okazało, że zanieczyszczenia powodują spadek odporności, to co z tego ważnego wynika dla ekologii ptaków, a co ważnego wynikło by gdyby odporność była równie dobra w Krakowie, Poznaniu i w Białowieży. Czy wyobrażacie sobie jakieś zmiany w podręcznikach ekologii i podręcznikach ochrony środowiska po przeprowadzeniu tych badań. Bo nawet jeśli zanieczyszczenia szkodzą sikorkom, to inne czynniki w dużych miastach mogą im pomagać.

To naprawdę jest bardzo mało ambitny projekt i nie sądzę, żeby ktoś chciał go finansować. A przecież pisząc taki projekt jesteście ograniczeni tylko wyobraźnią i należy zaproponować coś takiego co daje szansę na postęp w nauce. Szkoda młodego życia na robienie rzeczy mało ważnych, chyba że chcemy być tylko laborantami z gwarancją zatrudnienia do emerytury.

A z innych uwag to moim zdaniem opis finansowania jest zbyt pobieżny. Badania mają by prowadzone tylko w styczniu, a dwie osoby mają być finansowane przez 12 miesięcy i przez 3 lata. To trzeba przekonywująco wyjaśnić i opisać. Także opis statystyki jest zbyt skrócony i ogólnikowy. Nie wiadomo nawet ile osobników będzie badanych i czy to będą wszystkie odłowione przy karmikach, czy tylko te odłowione w poprzednich latach, czyli narażone na długotrwały spadek odporności. Nie jestem też przekonany, że ograniczenie się do ptaków wolno żyjących ma sens; w laboratorium można ustalić ile osobników zdechło w z powodu zanieczyszczenia, a w terenie możemy mieć do czynienia z ostrą selekcją i badaniem tylko tych osobników, które są wyjątkowo odporne. To trzeba przemyśleć i wyjaśnić. Jedna Puszcza Białowieska jako reprezentant terenów czystych nie wystarcza, bo to może być nie tylko czystość

powietrza, ale inne czynniki charakterystyczne tylko dla Białowieży. To jest niestety problem wszystkich badań terenowych, że aby ustalić wpływ jakiegoś czynnika trzeba go badać w kilku miejscach a na pewno nie w jednym.

Adam Łomnicki

Wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu odpornościowego sikory bogatki

Elżbieta Jędrzejczak, Katarzyna Janas

Streszczenie projektu

Zanieczyszczenie powietrza na terenach zurbanizowanych stanowi poważny problem, z którym boryka się wiele aglomeracji. Zagadnieniu temu poświęcono wiele badań, jednak większość z nich skupia się wyłącznie na wpływie zanieczyszczeń na zdrowie człowieka. Ptaki, jako organizmy o unikalnej budowie i fizjologii układu oddechowego, są w szczególny sposób narażone na przyjmowanie większych dawek zanieczyszczeń.

Oprócz bezpośrednich toksykologicznych efektów takich jak uszkodzenie nabłonka układu oddechowego, spodziewamy się że chroniczna ekspozycja na zanieczyszczenia może upośledzać również funkcjonowanie układu immunologicznego. Dotychczasowe, nieliczne badania na ten temat nie wykazały osłabienia odpowiedzi immunologicznej ptaków, jednak przeprowadzane były w warunkach laboratoryjnych i nie odzwierciedlały rzeczywistego poziomu narażenia ptaków na zanieczyszczenia. W naszych badaniach organizmem modelowym będą sikory bogatki z dzikich populacji, występujących na terenach miejskich, dzięki czemu unikniemy problemu z ekstrapolacją danych laboratoryjnych na populacje naturalne. W planowanym eksperymencie porównamy parametry świadczące o wydolności układu odpornościowego i kondycji ptaków z 16 miast wojewódzkich Polski, różniących się między sobą znacząco stopniem zanieczyszczenia powietrza.

W obliczu braku rozwiązań mogących w najbliższym czasie znacząco poprawić jakość powietrza w miastach, konieczne jest zdobycie wiedzy o tym jak zanieczyszczenia wpływają na funkcjonowanie układu odpornościowego ptaków a tym samym pośrednio na ich dostosowanie.

Cel naukowy projektu

Zanieczyszczenie powietrza na terenie aglomeracji miejskich stanowi niezwykle istotny i trudny do rozwiązania problem o ciężkich do oszacowania długoterminowych konsekwencjach. Skala zjawiska sprawiła, że bardzo wiele uwagi poświęcono wpływowi zanieczyszczeń atmosferycznych na zdrowie człowieka. Odpowiedzialność za środowisko przyrodnicze zobowiązuje nas jednak do tego by zrozumieć ich wpływ na pozostałe organizmy. Ptaki jako jedna z najliczniejszych grup kręgowców występujących w przestrzeni miejskiej, ze względu na unikalną budowę i fizjologię układu oddechowego, będącą przystosowaniem do latania, jest w szczególny sposób narażona na zanieczyszczenia atmosferyczne (Brown i in. 1997). U ptaków nie występują niektóre z mechanizmów oczyszczania dróg oddechowych obecnych u ssaków (brak efektywnego usuwania pyłu osadzonego w śluzie z dróg oddechowych, worki powietrzne pozbawione ochrony makrofagów) w związku z tym nie można odnosić do nich wyników uzyskanych w badaniach innych grup zwierząt (Brown i in. 1997). W dotychczasowych eksperymentach prowadzonych na ptakach udowodniono szkodliwy wpływ zanieczyszczeń na układ oddechowy, nie udało się natomiast wykazać szerszego oddziaływania na funkcjonowanie

całego organizmu lub innych układów (Llacuna i in. 1993, Cruz-Martinez i in. 2015). W tym kontekście szczególnie ciekawe wydaje się zbadanie układu odpornościowego, którego funkcjonowanie jest kluczowe zarówno do przeżycia jak i osiągnięcia sukcesu reprodukcyjnego przez zwierzęta.

Głównym problemem badawczym w naszym projekcie jest wpływ zanieczyszczeń atmosferycznych na wydolność układu odpornościowego u sikory bogatki, który testowany będzie w oparciu o następujące hipotezy:

Ptaki przebywające na terenach o w wyższym stężeniu zanieczyszczeń atmosferycznych będą wykazywały obniżoną:

- 1) odpowiedź antybakteryjna osocza,
- 2) ilość białych ciałek krwi,
- 3) intensywność zabarwienia piór,
- 4) poziom hematokrytu,

oraz podwyższony:

- 5) poziom zapasów żółci,
- 6) poziom kortykosteronu.

Znaczenie projektu

Nieliczne przeprowadzone do tej pory badania na temat wpływu zanieczyszczeń na fizjologię ptaków nie przyniosły jednoznacznych odpowiedzi. Llacuna i in. (1993) wykazali zmiany w funkcjonowaniu i morfologii nabłonka tchawicy u dziko żyjących wróblowatych. Badania te pokazały jednak wyłącznie lokalne toksyczne oddziaływanie zanieczyszczeń na struktury najbardziej narażone na szkodliwe czynniki. Interesujące jest pytanie czy oprócz bezpośrednich uszkodzeń spowodowanych toksycznym efektem zanieczyszczeń obserwuje się również długotrwałe upośledzenie funkcjonowania układu odpornościowego. Próbę odpowiedzi na to pytanie podjęli Cruz-Martinez i in. (2015) nie udało im się jednak wykazać istotnej zmiany w wielkości odpowiedzi immunologicznej u przepiórek i pustulek wystawionych na podwyższone stężenia m. in. tlenków azotu, siarki, benzenu i toluenu. Przyczyną mógł być fakt, że eksperyment przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych, w których ptaki eksponowano na zanieczyszczenia w ciągu 20 dni, tylko przez 1,5 godziny dziennie.

W planowanym przez nas eksperymencie wykorzystamy dzikie populacje sikory bogatki dzięki czemu unikniemy problemów z ekstrapolacją wyników badań laboratoryjnych na warunki naturalne. Badane przez nas ptaki będą pochodziły z naturalnych miejskich populacji a więc takich, które długoterminowo narażone są na rzeczywiste stężenia zanieczyszczeń. Będą to pierwsze tego typu badania mogące dostarczyć danych na temat faktycznego wpływu zanieczyszczeń miejskiego powietrza na wydolność układu odpornościowego.

Badanie wydolności układu odpornościowego jest istotne ponieważ ma ona kluczowe znaczenie dla kondycji ptaka i może przyczynić się do obniżonej przeżywalności i zmniejszonej rozrodczości. W obliczu braku rozwiązań mogących w najbliższym czasie znacząco poprawić jakość powietrza w miastach, wiedza o tym jak zanieczyszczenia wpływają na układ odpornościowy ptaków będzie mieć praktyczne znaczenie w zagadnieniach związanych z ich ochroną.

Koncepcja i plan badań

Oddziaływanie zanieczyszczeń powietrza na wydolność układu immunologicznego testowane będzie na sikorach bogatkach pochodzących z naturalnych populacji, z 16 miast wojewódzkich Polski. Poszczególne miasta znacząco różnią się od siebie poziomem zanieczyszczeń atmosferycznych co wynika z wielu czynników między innymi geograficznych, przemysłowych, politycznych i społecznych. Przykładowo, w lutym 2015 roku średnie stężenia pyłu zawieszonego PM10 w Gdańsku wyniosły $34 \mu\text{g}/\text{m}^3$, podczas gdy w Krakowie osiągnęły wartość $115 \mu\text{g}/\text{m}^3$, przekraczając tym samym znacząco dopuszczalną normę ($40 \mu\text{g}/\text{m}^3$) (Raporty z poszczególnych stacji WIOŚ, <http://powietrze.gios.gov.pl>). Badania prowadzone będą w styczniu i lutym, które cechują się najwyższymi stężeniami zanieczyszczeń (raport GIOŚ 2014). W zależności od wielkości miasta, wyznaczone zostaną dwie lub trzy lokalizacje, w pobliżu miejsc gdzie zwierzęta dokarmiane są całą zimę. Łatwa dostępność pokarmu sprawia, że ptaki spędzają w centrach miast cały sezon zimowy, ekspozując się tym samym na podwyższone stężenia zanieczyszczeń. W każdej z lokalizacji odłowionych zostanie do 20 ptaków od których pobrana będzie próbka krwi do badań laboratoryjnych oraz pióra z piersi do spektrofotometrycznego pomiaru intensywności zabarwienia. Dodatkowo ptaki będą ważone i obrączkowane.

Za miarę wydolności układu odpornościowego w eksperymencie przyjęto ilość białych ciałek krwi w rozmazie, oraz siłę odpowiedzi antybakteryjnej osocza w teście z *Escherichia coli*. Organizm o osłabionej odporności będzie bardziej podatny na zakażenia, dlatego sprawdzony będzie również poziom zapasów zapasów badanych ptaków. Dobrą miarą kondycji jest także intensywność ubarwienia piór opartego na karotenoidach, ponieważ jest ona wypadkową kompromisu między inwestycją w układ odpornościowy a atrakcyjność (Lumpkin i in. 2014). Dodatkowo zmierzony zostanie hematokryt oraz kortykosteron, którego podwyższony poziom może świadczyć o długotrwałym stresie.

Zebrane dane zestawione zostaną z wynikami pomiarów parametrów fizjologicznych ptaków i przeanalizowane pod kątem istnienia zależności pomiędzy poziomem zanieczyszczeń a wydolnością układu odpornościowego. Dodatkowo, w analizie uwzględnione zostaną temperatura oraz poziom hałasu w miejscach odłowów, aby sprawdzić czy czynniki te nie zaburzają otrzymanych wyników.

Metodyka Badań

Gatunek modelowy

Modelowym gatunkiem w badaniach będzie sikora bogatka (*Parus major*), która dzięki szerokiemu zasięgowi, dużym liczebnościom oraz bardzo dobrze poznanej biologii jest często wykorzystywanym gatunkiem w badaniach zanieczyszczeń środowiska (np. Costa i in. 2014)

Część terenowa badań

Pomiary przeprowadzane będą w 16 miastach wojewódzkich Polski, w których zostaną wytypowane po dwie lub trzy lokalizacje w których odławiane będą ptaki. Miejsca te znajdować się będą na terenach zielonych, w pobliżu karmników, gdzie gromadzą się duże ilości ptaków. Lokalizacje wybierane będą z pośród miejsc położonym blisko centrów miast jak również oddalonych od nich i tym samym narażonych na niższe stężenia zanieczyszczeń i mniejszy poziom hałasu.

Podczas odłowów w rozstawione w niewielkiej odległości od karmników sieci ornitologiczne schwytywane zostanie do 20 osobników. Od każdego z nich w pierwszych dwóch minutach od schwywania (w celu zminimalizowania efektu krótkotrwałego stresu) pobrana zostanie próbka krwi (2 kapilary – ok. $140 \mu\text{l}$), przeznaczona do wykonania rozmazów,

hematokrytu, odpowiedzi antybakteryjnej i oznaczeń stężenia kortykosteronu. Następnie pobrana zostanie kępka piór z piersi do badania poziomu intensywności zabarwienia. Wszystkie ptaki zostaną też zaobrączkowane.

Analizy laboratoryjne.

W celu określenia liczby białych ciałek krwi (WBC) wykonane zostaną rozmazy według metody podanej w Costa i in. (2014). W rozmazach sprawdzona zostanie ilość pasożytów krwi z rodzajów *Plasmodium* i *Haemoproteus*. Jako miara WBC oszacowana zostanie liczba leukocytów na 10 000 erytrocytów. Poziom hematokrytu zmierzony zostanie poprzez odwirowanie kapilary w wirówce przez 10 minut w 10 tys r.p.m. i następnie pomierzenie wysokości słupa erytrocytów (jak w Ots i in. w 1998). Odwirowane osocze wykorzystane będzie w teście odpowiedzi antybakteryjnej (Tieleman i in. 2005). Na szalki z podłożem agarowym posiany zostanie szczep *Escherichia coli* (ATCC, szczep 8739) następnie na połowę z nich dodane 5 µl surowicy sikor. Próby kontrolne pozostaną bez surowicy. Przez pierwsze 45 min szalki inkubowane będą w 41°C a następnie przeniesione zostaną do 37°C na 12 godzin. Po upływie tego czasu policzone zostaną wyrosłe kolonie. Poziom kortykosteronu w osoczu zmierzony zostanie przy pomocy dostępnych komercyjnie testów ELISA (ENZO Life Sciences, ADI, 900-097, Farmingdale, NY, USA) według metody podanej w Wada i in. (2007).

Pomiary reflektancji

Reflektancja, będąca miarą intensywności zabarwienia piór, zostanie zmierzona za pomocą spektrofotometru Ocean Optics JAZ (sprzęt na wyposażeniu Instytutu Nauk o Środowisku UJ). Kępka piór pobrana od każdego osobnika zostanie dziesięciokrotnie pomierzona z odległości 3 mm a uzyskane w ten sposób wyniki będą uśredniane i opracowywane w programie R Studio, przy użyciu pakietu PAVO (Maia i in. 2012).

Dane o zanieczyszczeniu

Dane o poziomie aktualnych zanieczyszczeń gazowych i pyłowych oraz poziomie hałasu w miejscach odłowów ptaków, zostaną uzyskane z odpowiednich Wojewódzkich Inspektoratów Ochrony Środowiska. W analizach uwzględnione zostaną zanieczyszczenia pyłem PM10 i PM2,5 oraz zanieczyszczenie tlenkami siarki, azotu i węgla. Dodatkowo z Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej pozyskane zostaną informacje o temperaturze w miejscach odłowów, w styczniu i lutym.

Analiza statystyczna

Aby uzyskać jedną miarę poziomu zanieczyszczeń w pierwszej kolejności przeprowadzona zostanie analiza PCA, w której zmiennymi będą dane dotyczące stężeń: tlenków azotu, siarki i węgla oraz pyłów PM10 i PM2,5. Dalsza analiza przeprowadzona zostanie przy użyciu ogólnego modelu liniowego, w którym zmienną zależną będą kolejno wyniki poszczególnych analiz dotyczących parametrów układu odpornościowego i kondycji sikor, natomiast predyktorami ciągłymi będą: główna składowa uzyskana w analizie PCA, temperatura i poziom hałasu a czynnikami losowymi miasto i miejsce odłowów.

Literatura:

Brown R.E., Brain J.D., Wang N. 1997. The avian respiratory system: a unique model for studies of respiratory toxicosis and for monitoring air quality. *Environ. Health Perspect.*, 105, p. 188.

Costa R.A., Eeva T., Eira C., Vaqueiro J., Medina P., Vingada J.V. 2014. Great tits breeding performance and mercury contamination from the paper and pulp industry in the west coast of Portugal. *Chemistry and Ecology* 11, 30(3):206-215.

Cruz-Martinez L., Smits Judit E.G., Fernie Kim. 2015. Stress response, biotransformation effort, and immunotoxicity in captive birds exposed to inhaled benzene, toluene, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Volume 112, p. 223–230.

Llacuna S., Gorriç A., Durfort M., Nadal J. 1993. Effects of air pollution on passerine birds and small mammals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24, p. 59–66.

Lumpkin David C, Murphy Troy G, Tarvin Keith A 2014. Blood parasite infection differentially relates to carotenoid-based plumage and bill color in the American goldfinch *Ecol Evol*. August; 4(16): 3210–3217.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Rafael Maia, Pierre-Paul Bitton, and Chad Eliason. 2012. PAVO: Perceptual Analysis, Visualization and Organization of Spectral Color Data in R.

Raport GIOŚ: Zbiórca raport krajowy z rocznej oceny jakości powietrza w strefach wykonywanej przez WIOŚ według zasad określonych w art. 89 ustawy-Prawo ochrony środowiska. Państwowy Monitoring Środowiska - Inspekcja Ochrony Środowiska. Warszawa. 2014

Raport GUS: Ochrona Środowiska 2013. Zakład Wydawnictw Statystycznych. Warszawa.

Smits J., Bortolotti G.R, Tella J.L.. 1999. Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. *Funct. Ecol.*, 13, p. 567–572.

Tieleman BI, Williams JB, Ricklefs RE, Klasing KC. 2005. Constitutive innate immunity is a component of the pace-of-life syndrome in tropical birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272, p. 1715–1720.

Wada. H., Hahn T.P., Breuner C.W. 2007. Development of stress reactivity in white crowned sparrow nestlings: total corticosterone response increases with age, while free corticosterone response remain slow. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 405–413.

Kosztorys:

Treść	Planowane koszty w roku (zł)		Łącznie
	2016	2017	
1. Koszty bezpośrednie, w tym:	33 850	33 000	66850
1/ Wynagrodzenia	4 000	26 000	30000
2/ Aparatura	0	0	0
3/ Inne koszty bezpośrednie	29 850	7 000	36850
2. Koszty pośrednie 20%	6770	6600	13370
Łączne koszty (1+2)	40620	39600	80220

Uzasadnienie kosztów:

Wynagrodzenia

- Wynagrodzenia wykonawców projektu: 22 000 zł (2*11 miesięcy*1000 zł)-->

Projekt został rozpisany na 11 miesięcy: od listopada 2016 do września 2017. Przybliżony harmonogram:

-listopad-grudzień 2016: przygotowania do badań,

-styczeń-luty 2017: badania terenowe,

-marzec-czerwiec 2017: analizy laboratoryjne,

-lipiec-wrzesień 2017: analiza wyników, przygotowanie manuskryptu, wyjazd na konferencję

- Wynagrodzenia dla pracowników technicznych: 8 000 zł (4*2 miesiące*1000 zł)

Inne koszty bezpośrednie:

- Odczynniki laboratoryjne:
 - Corticosterone ELISA Kit 10*1100 zł = 11 000 zł
 - szalki z podłożem tryptozo-sojowym ok. 50 paczek po 20 szalek*30 zł = 1500 zł
 - szczep wzorcowy ATCC =200 zł
- Sprzęt : (np. suwmiarka, kapilary, igły, strzykawki, szkiełka) 5 000 zł
- Obrączki: 150 zł
- Koszty badań terenowych: 12 000 zł, w tym :
 - koszty paliwa: 8 000 zł
 - diety wyjazdowe: 2 000 zł
 - zakwaterowanie: 2 000 zł
- Wyjazd na zagraniczną konferencję: 4000 zł (4 000 zł * 1 osoba)
- Publikacja: 3 000 zł

5. Wpływ zanieczyszczenia powietrza na stężenie flawonoidów w wegetatywnych i generatywnych organach poziomki pospolitej (*Fragaria vesca* L.).

PIERWSZA WERSJA PROJEKTU

Rola zmian zachodzących w roślinie w reakcji na zanieczyszczenie powietrza

Jakub Dębowski – Instytut Botaniki, Jowita Niedojadło – Instytut Nauk o Środowisku

Streszczenie projektu

Zanieczyszczenie powietrza jest czynnikiem stresowym dla roślin. Rośliny w odpowiedzi na stres produkują wtórne metabolity o działaniu antyoksydacyjnym – flawonoidy. Odpowiadają one nie tylko za obronę przed czynnikami stresowymi, ale również za kolor i zapach owoców. Wykazują one również działania terapeutyczne, jednak w wysokich stężeniach mogą wykazywać skutki nieporządne na żywiące się owocami zwierzęta. Celem projektu jest określenie czy w warunkach stresu chemicznego roślina będzie inwestowała w dostosowanie poprzez podniesienie atrakcyjności owocu czy w ochronę organizmu. Badanie przeprowadzone zostanie na poziomce (*Fragaria vesca*) w szklarniach doświadczalnych, gdzie wprowadzony zostanie czynnik stresowy w postaci zanieczyszczonego tlenkami niemetali powietrza. Ocenione zostanie stężenie flawonoidów w poszczególnych tkankach roślinnych (owoce, liście i korzenie), zawartość azotu, siarki i węgla w celu wykluczenia dodatkowego wpływu zanieczyszczeń, a także zawartość białka alergennego Tra a 1 pośredniczącego w syntezie flawonoidów. Owoce wyhodowane w warunkach eksperymentalnych ocenione zostaną pod kątem preferencji przez normicę rudą (*Myodes glareolus*). Nieznaczny wzrost zawartości flawonoidów w owocu mógłby poprawić jego walory smakowe i zapachowe, a tym samym mógłby mieć wpływ na zwiększenie dostosowania. Z drugiej strony wysokie stężenia we wszystkich badanych tkankach mogłyby sugerować, że stres jest zbyt duży i roślina inwestuje w mechanizmy obronne. Badania poruszają ważny aspekt zmiany fizjologii roślin w warunkach zanieczyszczonego powietrza i mogą wskazać ewentualne skutki na zachowania roślin. Jednocześnie oznaczając wpływ zanieczyszczenia na syntezę alergicznego białka Tra a 1 badania stają się atrakcyjne nie tylko dla naukowców z tej dziedziny, ale także dla szeroko pojętego społeczeństwa.

Cel naukowy projektu

(jaki problem naukowy wnioskodawca podejmuje się rozwiązać, hipotezy badawcze)

Rośliny w odpowiedzi na stres produkują wtórne metabolity, które mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla zwierząt rozsiewających ich nasiona. z drugiej strony wiele z tych substancji odpowiedzialnych jest za jakość i atrakcyjność kolorystyczną owocu i wykazuje pozytywny wpływ na zdrowie. W sytuacji stresowej roślina aby zoptymalizować swoje dostosowanie może zastosować różne strategie, inwestycja w ochronę własnych tkanek lub zwiększenie atrakcyjności owocu. Można zadać pytanie, czy w warunkach stresu chemicznego roślina inwestuje w zwiększenie dostosowania czy w ochronę organizmu? Zwiększona ilość flawonoidów we wszystkich tkankach rośliny włącznie z owocem w stężeniach mogących zaszkodzić zwierzętom rozsiewającym ich nasiona, może być sygnałem, że roślina skoncentrowana jest na walce ze szkodliwymi oddziaływaniami substancji chemicznych

zawartych w powietrzu. Sytuacja, w której roślina wykazuje wysokie stężenia flawonoidów w tkankach wegetatywnych przy jednoczesnym ograniczonym wzroście tych substancji w owocu, mogących wpływać na ich kolorystyczną i zapachową atrakcyjność, sugerować może próbę zwiększenia swojego dostosowania.

Znaczenie projektu

(dotychczasowy stan wiedzy, uzasadnienie podjęcia problemu badawczego, uzasadnienie nowatorskiego charakteru badań, znaczenie wyników projektu dla rozwoju danej dziedziny i dyscypliny naukowej oraz rozwoju cywilizacyjnego)

Zanieczyszczenie powietrza tlenkami niemetali i ozonem staje się coraz poważniejszym problemem w związku z rozrostem aglomeracji, przemysłu i transportu. Negatywny wpływ na organizmy roślinne potwierdzony został w wielu badaniach (WHO 2014, AHA 2010). Stres chemiczny jakiego doświadczają rośliny zmusza je do aktywacji mechanizmów obronnych. Przeprowadzone badania wykazały w tkankach pyłku brzozy (*Betula pendula*) wzmożoną produkcję alergennego białka Bet v 1 pod wpływem zanieczyszczeń. Homologiem białka Bet v 1 jest występujące w truskawkach (*Fragaria x ananassa*) i dziko rosnących poziomkach (*Fragaria vesca*) białko o działaniu alergennym Tra a 1 (Futsuki 2014). Białka te biorą udział w szlaku syntetyzującym związki z grupy flawonoidów (Helander 1997), które wykazują działanie antyoksydacyjne, chroniąc aparat fotosyntetyczny rośliny przed uszkodzeniem. Wzrost stężenia białka w roślinie skutkuje wzmożoną syntezą flawonoidów (Muñoz 2000). Może ono następować na skutek działania stresorów fizycznych i chemicznych. Roślina broni się przed czynnikiem stresowym, próbując zminimalizować negatywny wpływ, co objawia się wzrostem stężenia białka i flawonoidów. Flawonoidy oprócz silnego działania antyoksydacyjnego, wykazują właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze. Jednocześnie flawonoidy pełnią funkcje barwników roślinnych nadających kolor dojrzałym owocom. Wpływają one również na ich zapach (Mierziak i in. 2014). Wielokrotnie potwierdzano terapeutyczne i zdrowotne działanie flawonoidów na organizmy ludzkie i zwierzęce (EFSA 2010; Cushine i Lamb 2006). Jednocześnie badania nad flawonoidami wskazują ich działanie szkodliwe, zwłaszcza w wysokich stężeniach (Skibola i Smith 2000, Ross 2000, Rosenthal i Berenbaum 2012).

Badania podejmują aktualny temat wpływu zanieczyszczeń na zmiany zachodzące w narażonych roślinach. Niniejszy projekt przyczyni się do lepszego zrozumienia procesów stresowych u roślin w potencjalnym kontekście ewolucyjnym. Jednocześnie praca pozwoli na uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat alergennych białek występujących w poziomkach i potencjalnym wpływie zanieczyszczeń na wzrost ich alergenicności, co pozwoli rozszerzyć krąg zainteresowań badaniem na szeroko pojęte społeczeństwo.

Koncepcja i plan badań

(ogólny plan badań, szczegółowe cele badawcze, wyniki badań wstępnych)

Badania zaproponowane w projekcie mają charakter eksperymentalny i przeprowadzone zostaną w ściśle kontrolowanych warunkach szklarniowych, co pozwoli na zminimalizowanie wpływu innych czynników na doświadczenie. Ramy czasowe projektu zawierają się dwuletnim okresie, który obejmuje: wstępne analizy materiału roślinnego, uprawę eksperymentalną poziomki (*Fragaria vesca*), testy preferencji pokarmowych, obróbkę i analizę zebranego materiału roślinnego, analizę statystyczną.

Wiadomym jest, że białko Bet v 1 wykazuje zwiększoną ekspresję pod wpływem zanieczyszczeń. Homologiczne białko występujące w tkankach truskawek Tra a 1 w sytuacji stresów również wykazuje wzmożoną ekspresję (Futsuki 2014). Jednakże wpływ zanieczyszczeń powietrza na wydzielanie tego białka do tej pory nie został badany, a jest to wysoce

prawdopodobne. Białko to bierze udział w szlaku syntezy flawonoidów, które wydzielane są w warunkach stresu i mają za zadanie zapewnić roślinie przetrwanie. Jednakże stres spowodowany zanieczyszczeniem powietrza pochodzenia antropologicznego nie jest tak ostrym stresem jak np. atak patogena. Roślina może zareagować na taki chroniczny stres w odmienny sposób. Nawet jeśli nie powie się jednoznaczne potwierdzenie hipotezy, wciąż wartościowym wkładem w naukę będzie ocena ekspresji białka Tra a 1 w różnych tkankach poziomki w warunkach zanieczyszczenia.

Metodyka badań

(sposób realizacji badań, metody, techniki i narzędzia badawcze, metody analizy i opracowania wyników, urządzenia i aparatura wykorzystywane w badaniach)

Uprawa

Pierwszym etapem planowanych badań jest założenie hodowli poziomki pospolitej *Fragaria vesca* L. W tym celu zakupione zostaną dwie szklarnie z poliwęglanu o szkieletcie aluminiowym, wyposażone w metalową podłogę i uchylane okna. Szklarnie zostaną umieszczone na terenie należącym do Uniwersytetu Jagiellońskiego w obrębie Polanki Haller. W każdej szklarni pod koniec kwietnia zostanie posadzone 50 sadzonek poziomki w podłużnych skrzynkach plastikowych z zachowaniem 15cm odstepu. Skrzynki wypełnione będą mieszanką ziemi ogrodowej, torfu i piasku w proporcji 400:80:20L. W momencie posadzenia sadzonkom zostanie podany nawóz azotowo-magnezowy następnie podczas wzrostu co 5 dni będą otrzymywać nawóz fosforowo-potasowy podawany w formie płynnej doglebowo. Wszystkie rośliny będą regularnie podlewane. Do jednej ze szklarni zostanie poprowadzony gumowy wąż odprowadzający spaliny z agregatu z silnikiem diesla w celu symulowania antropogenicznego zanieczyszczenia powietrza. W drugiej szklarni kontrolnej zostanie zainstalowana instalacja suplementująca CO₂ w celu wyeliminowania różnic pomiędzy zawartością tego gazu, którego to podwyższone stężenie mogłoby wpłynąć na rośliny (Amthor 1995) Za pomocą przyrządów pomiarowych dokonywane będą pomiary stężenia gazów w obu szklarniach. Pierwszym pobieranym materiałem do badań występujących białek będzie pyłek. Planowany zbiór owoców zostanie przeprowadzony w lipcu i jednocześnie pobrany zostanie do badań materiał zielny z 30 roślin z obu szklarni wliczając w to 3 owoce z krzaczka oraz próbki z korzenia i liścia oraz owoce do badań behawioralnych.

Przygotowanie materiału do badań

Zebrane części roślin (pyłek, liście, korzenie i owoce) poddane zostaną procedurze liofilizacji przy użyciu liofilizatora DONSERV. Zabieg ten ma na celu przygotowanie do badań przy jednoczesnym jak najwierniejszym zachowaniu właściwości materiału. Następnie rozdrobniony zostanie on w młynku kulowym firmy Retsch CryoMill. Pozwoli to na uzyskanie jednorodnego materiału z dużo większą precyzją niż przy pomocy manualnych klasycznych metod, jednocześnie oszczędzając czas. Tak przygotowany materiał poddany zostanie późniejszym analizom molekularnym i chemicznym w laboratorium Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Analizy chemiczne i molekularne

Pierwiastki C, N, S: Przy użyciu spektrometru masowego (porównanie próbek pod kątem obecności pierwiastków C, N, S) zostaną zbadane próbki owoców z 5 roślin doświadczalnych i 5 kontrolnych. Ma to na celu sprawdzenie czy nie zachodzi akumulacja jednego z wymienionych pierwiastków.

Flawonoidy: Zawartość flawonoidów w pobranym materiale roślinnym oznaczona zostanie za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Technika ta charakteryzuje się dużą czułością, pozwala na identyfikacje i ocenę ilościową związków chemicznych. Metoda ta jest szeroko stosowana w ocenie stężenia flawonoidów (Wang i in. 2009, Rijkea i in. 2006)

Białko Tra v 1: Białko alergenne oznaczone zostanie za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Metoda powszechnie stosowana jest w ocenie białek roślinnych.

Test preferencji

W testach wykorzystane zostanie 30 nornic pochodzących z niewoli. Dieta tego gatunku w środowisku naturalnym bogata jest w owoce leśne między innymi poziomki. Test przeprowadzany będzie w czystym pudełku, w którym umieszczona zostanie krótka przegroda (25 mm i 10 mm) oddzielająca dwa stanowiska z randomowo podawanymi owocami (owoce pochodzące z kontroli i z grupy z czynnikiem eksperymentalnym). Oceniany będzie wybór owocu, czas w jakim został on dokonany, czas przeznaczony na wacanie i procent zjedzonego owocu (zmieniono za: Cooper and Francis, 1979)

Analiza statystyczna

W celu wykazania różnic pomiędzy zawartością związków fenolowych i białek pomiędzy grupą kontrolną a eksperymentalną zastosowany test t-Studenta dla prób niezależnych. W testach oceny preferencji również wykorzystany zostanie test t-Studenta dla prób niezależnych.

Literatura

1. Cooper S. J., Francis R. L. (1979) *Food-Choice in a Food-Preference Test: Comparison of Two Mouse Strains and the Effects of CMordiazepoxide Treatment*, Psychopharmacology 65, 89- 93
2. Wang Shiow Y., Chen Chi-Tsun, Wangb Chien Y. (2009) *The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries*, Food Chemistry 112 676–684
3. Amthor J. S., (1995) *Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [CO₂] in relation to the global carbon cycle*, Volume 1, Issue 4, pages 243–274
4. Rijkea E. de, Outb P., Niessenb W. M. A., Arieseb F., Gooijerb C., Brinkmanb Udo A. Th. (2006) *Analytical separation and detection methods for flavonoids*, Journal of Chromatography A, Volume 1112, Issues 1–2, 21 Pages 31–63
5. Futsuki Nitta, Y., Iduhara, M., Tsugehara, T., Uno, Y. (2014) *Expression of strawberry allergen Fra a 1 gene during fruit ripening*, Acta horticulturae, 1049 Page:323 – 328
6. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy (2010) *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant EFSA Journal 8 (2): 1489*
7. Cushnie T. P., Lamb A. J. (2005) *Antimicrobial activity of flavonoids*, International Journal of Antimicrobial Agents 26 (5): 343–356
8. Ross J.A. (2000) *Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia?*. Proc Natl Acad Sci USA, 97 (9), s. 4411-3
9. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A., (2014) *Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment*, Molecules, 19, 16240-16265
10. Skibola C.F., Smith M.T. (2000) *Potential health impacts of excessive flavonoid intake*, Free Radic Biol Med.;29(3-4):375-83

11. Helander M. L., Savolainen J., Ahlholm J. (1997) *Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens*. *Allergy*. 52(12):1207-14
12. Muñoz C., Hoffmann T., Escobar N. M., Ludemann F., Botella M. A., Valpuesta V., Schwab W. (2009) *The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis* *Mol Plant*.;3(1):113-24
13. Rosenthal G. A. ,May R. B. (2012) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*
13. WHO (25 March 2014) *7 million premature deaths annually linked to air pollution*
14. American Heart Association (2010) *Evidence growing of air pollution's link to heart disease, death at the Wayback Machine*

Kosztorys

Przedmiot	Środki na poszczególne lata (zł)		
	2016	2017	Razem
1. Bezpośredni koszt, w tym:	60 280	16 500	76 780
1/ Wynagrodzenie	24 000	12 000	36 000
2/ Sprzęt	14 500	0	14 500
3/ Inne	21 780	4 500	26 280
2. Pośredni koszt	9 156	3 300	12 456
Koszt całkowity (1+2)	69 436	19 800	89 236

Szczegółowe koszty:

Uprawa:

Sadzonki poziomki: 100 x 3,00zł = 300zł

80L torfu: 10zł

Pojemniki: 130zł

Piasek sortowany rzeczny 40kg: 30zł

Ziemia ogrodowa 400L: 50zł

Nawóz fosforowo-potasowy Florovit Agro 20L: 160zł

Nawóz azotowo-magnezowy Florovit Agro 5L: 50zł

Szklarnia z poliwęglanu o powierzchni 6,2m² z podłogą metalową i szkieletem aluminiowym:
2x1700zł = 3400zł

Agregat prądotwórczy z akcesoriami 1500zł

Paliwo do agregatu: 3800zł

Analizator jakości powietrza IEQ: 9600zł

Butla 8L CO₂ z instalacją do aplikacji: 250zł

Hodowla gryzoni - koszt całkowity wypożyczenia na 1 miesiąc 30 normic: 9000zł

Procedury laboratoryjne

Spektrometria Mas: 500zł

ELISA kit: 2000zł

HPLC: 2000zł

Wynagrodzenie: 2 x 1000 x 12 + 2 x 500 x 12 = 3600

Konferencja: 8000zł

RECENZJE

Recenzja projektu Jakuba Dębowskiego i Jowity Niedojadło pt. „Rola zmian zachodzących w roślinie w reakcji na zanieczyszczenie powietrza”.

Ocena merytoryczna

Mam wrażenie, że projekt nie został do końca przemyślany i dokładnie zaplanowany. Brak jest jasno podanych celów i hipotez oraz przewidywań. Tok rozumowania i kolejne kroki planowane podczas badań są logiczne i oparte na dostępnej literaturze (która powinna być posortowana alfabetycznie). Należy pochwalić korzystanie z najnowszych badań, na temat negatywnego wpływu zanieczyszczenia powietrza na rośliny. Budowa projektu opiera się na przedstawieniu tego, co w badanej dziedzinie jest znane i zwróceniu uwagi na luki w badaniach, które autorzy projektu chcą uzupełnić.

Mocną stroną projektu jest opisanie poszczególnych metod, zwłaszcza tych, które mogą nie być powszechnie znane wszystkim, a także uwzględnienie argumentacji dlaczego właśnie ta metoda została wybrana spośród wszystkich dostępnych. Zdanie: „Za pomocą przyrządów pomiarowych dokonywane będą pomiary stężenia gazów w obu szklarniach” nie jest precyzyjne – lepiej będzie brzmieć gdy zostaną podane nazwy tych przyrządów lub to stwierdzenie zostanie uproszczone.

Do słabych elementów należy występowanie literówek i zdań budowanych czasem w sposób gramatycznie niepoprawny. Mogą one sugerować, że autorzy nie są sumienni i dokładni. Ponadto, streszczenie za bardzo skupia się wokół metodyki – korzystniejsze mogłoby być poświęcenie tego miejsca na skrócony opis znaczenia projekt – najważniejszym celem streszczenia powinno być przekonanie fundatorów, że projekt jest ważny.

Informacja o tym, że flawonoidy w wysokich stężeniach mogą wywoływać niepożądane skutki jest ważna i bardzo ciekawa, brak jednak w tym wypadku przypisu i odniesienia do literatury.

Tytuł rozpoczynający się od „Rola zmian zachodzących w roślinie (...)” nie oddaje charakteru badań. Jest to stwierdzenie zbyt ogólne i sugeruje, że w projekcie będą uwzględnione różne zmiany, które w roślinie zachodzą, a nie tylko badane przez autorów stężenie flawonoidów. Ponadto, nie jestem pewna czy używanie stwierdzenia „zachowania roślin” jest rozsądne.

„Sytuacja w której roślina wykazuje wysokie stężenia flawonoidów w tkankach vegetatywnych przy jednoczesnym ograniczonym wzroście tych substancji w owocu, mogących wpływać na ich kolorystyczną i zapachową atrakcyjność, sugerować może próbę zwiększenia swojego dostosowania.” Rozumiem, że w momencie podniesienia poziomu flawonoidów w tkankach (organów) vegetatywnych roślina zwiększa ochronę własnych tkanek nawet w sytuacji gdy flawonoidy w owocach pozostają na poziomie nie zaburzającym atrakcyjności owocu w taki sposób, aby nie zmniejszyć/zwiększyć szansy na skuteczną endozoochorię. Sugerowałabym raczej zwrócenie uwagi, że zwiększony poziom flawonoidów we wszystkich częściach roślin, z wyjątkiem owocu byłoby raczej strategią mieszaną polegającą jednocześnie na ochronie ważnych dla przetrwania organów vegetatywnych i próbie zwiększenia dostosowania. Drugim aspektem jest zastanowienie się, w jakim stopniu u rośliny narażonej na działanie zanieczyszczeń powietrza, flawonoidy mają szansę znajdować się w różnych stężeniach, w poszczególnych organach nadziemnych (jednakowo narażonych na działanie tych zanieczyszczeń).

Flawonoidy nie są synonimem fenoli – w obrębie związków fenolowych wyróżniamy między innymi flawonoidy. Metodyka mówi o tym, że zbadane zostaną części roślin pod kątem

występowania w nich flawonoidów, w części ‘analiza statystyczna’ autorzy natomiast chcą wykazać różnice pomiędzy zawartością związków fenolowych i białek (jakich białek – wszystkich?). Ponadto, flawonoidy to bardzo liczna grupa do której należy ponad 8000 różnych związków chemicznych – może warto zastanowić się które związki będą badane i z jakich powodów akurat te?

Kwestia badań behawioralnych związanych z testem preferencji nornic nie jest całkowicie jasna. Uważam, że trzeba zaplanować ile należy przeprowadzić powtórzeń dla jednego osobnika. Nic nie wspomniano również o rozkładzie płci. Testy preferencji są trudne w interpretacji, a mierzenie czasu w jakim dokonano wyboru owocu może nie być dobrym wskaźnikiem preferencji. Czy na pewno wyniki będą mogły odpowiedzieć na hipotezę stawianą przez autorów projektu? Czy na pewno ewentualny brak chęci wyboru owocu przez nornicę będzie świadczył o braku preferencji, a nie na przykład o tym, że nie jest głodna lub nie zna takiego pokarmu ponieważ pochodzi z niewoli? Proszę wyobrazić sobie, że po zjedzeniu pierwszej poziomki w całości (nie istotne z której grupy) apetyt i zainteresowanie zwierzęcia będą maleć z każdym następnym owocem, co również będzie prowadziło do różnic w wynikach (biorąc pod uwagę zwłaszcza to, że autorzy chcą uwzględnić % zjedzonego owocu).

Jaki jest przewidywany mechanizm, którym będą kierować się nornice podczas wyboru owocu? Jakim zmysłem posługują się nornice podczas wyboru pokarmu, istotny jest tutaj wzrok czy węch? Autorzy wspominają o możliwym wpływie fenoli na kolor oraz zapach owocu, ale czy zostało to gdzieś zbadane i potwierdzone? I czy fenole wpływają na zapach owocu sprawiając, że może on stać się bardziej atrakcyjnym pokarmem dla nornic?

Znaczenie projektu

Projekt może pozwolić na zgłębienie tematu radzenia sobie roślin z niekorzystnym wpływem środowiska. Autorzy piszą, że „niniejszy projekt przyczyni się do lepszego zrozumienia procesów stresowych u roślin w potencjalnym kontekście ewolucyjnym” –nie widzę, aby w metodologii badań i stawianych hipotezach była wzmianka o chęci zrozumienia procesów stresowych. Żaden z testów przytoczonych przez autorów projektu nie ma na celu sprawdzenia w jaki sposób działają procesy stresowe. Ciekawym elementem za to jest zwrócenie uwagi na alergenność badanych związków. Projekt uważam za ciekawy i mający duży potencjał, ale konieczne jest jego ponowne przemyślenie i dopracowanie, a przede wszystkim zdefiniowanie hipotez i przewidywań. Po zakończeniu projektu wyniki mogą zostać opublikowane w czasopiśmie specjalistycznych.

Ocena możliwości wykonania

Eksperyment, pomimo nieścisłości jest zaplanowany logicznie i jest możliwy do przeprowadzenia w zaplanowanym czasie. Przygotowanie szczegółowej metodyki technologii uprawy oraz analiz świadczy o wysokiej wiedzy autorów na przedstawiony temat i zwiększa ich wiarygodność, co jest bardzo mocną stroną całego projektu.

Ocena kosztorysu

Badania są stosunkowo tanie, całkowity ich koszt nie przekracza 90000 zł. Wynagrodzenia stanowią aż 40% kosztów całkowitych, co wydaje się bardzo dużym kosztem, jednak przy wzięciu pod uwagę niskich kosztów całego projektu, można na ten fakt przymknąć oko, zwłaszcza, że eksperymenty zaplanowano na dwa lata co zdecydowanie zmniejszyło koszty wynagrodzeń. Mocną stroną kosztorysu jest wyszczególnienie wszystkich potrzebnych rzeczy wraz z kosztem ich zakupu.

Biorąc pod uwagę, że nornice będą wykorzystywane przez 1 miesiąc, a badania ich preferencji nie są kluczową składową projektu (i istnieje duża szansa, że nic z nich nie wyjdzie), bardzo dobrym rozwiązaniem jest zaproponowane przez autorów wypożyczenie nornic wraz z potrzebnym do ich hodowli sprzętem, co również znacznie obniżyło koszty całego projektu. Autorzy nie zapomnieli o zaplanowaniu konferencji, w której uczestnictwo jest istotnym elementem badań pozwalającym na podzielenie się z wynikami z innymi. Myślę, że podanie konkretnej konferencji, która dotyczy rozpatrywanej w projekcie tematyki, zostałoby dobrze odebrane.

Anna Giermek

Recenzja projektu pt.: Rola zmian zachodzących w roślinie w reakcji na zanieczyszczenie powietrza

Ocena merytoryczna projektu

Autorzy projektu podjęli się odpowiedzi na interesujące pytanie w jaki sposób rośliny reagują na stres wywołany zanieczyszczeniami antropogenicznymi oraz jaką w związku z tym wybierają strategię przetrwania – inwestycję w ochronę własnych tkanek czy też w rozsiewanie nasion.

Pomimo niewątpliwie ciekawego celu badawczego założenia obarczone są pewną niekonsekwencją a uzasadnienie podjęcia takiego tematu opisane zostało w sposób dość zawiły co utrudnia mi zrozumienie wniosku przeprowadzonego przez autorów (Być może przedstawienie zależności na schemacie byłoby bardziej czytelne?)

Na podstawie danych literaturowych autorzy podają, iż zanieczyszczenia powietrza mogą być czynnikiem stresującym i wywoływać u roślin odpowiedź obronną w postaci zwiększonej produkcji flawonoidów. Niejednoznaczny jest natomiast wpływ flawonoidów na zwierzęta i ludzi, co zostało przez autorów przytoczone kilkakrotnie (str. 1, acc. 2; strona 2, acc. 1). W kontekście powyższego podejmowanie tematu różnych strategii ewolucyjnych roślin w zależności od preferencji pokarmowych potencjalnych rozsiewaczy nasion nie daje jednoznacznej odpowiedzi. Analogicznie można by stwierdzić, że zwiększenie ilości flawonoidów w owocach jest strategią mającą na celu przyciągnięcie gryzoni.

W drugim akapicie „Koncepcji” (str. 2, acc. 4) autorzy przytaczają informację nt. homologicznych białek Bet v 1 i Tra a 1, które odpowiedzialne są m. in. za produkcję flawonoidów w roślinach. W pierwszym zdaniu podają, iż udowodniony jest wpływ zanieczyszczeń na zwiększoną produkcję białka Bet v 1 u roślin, w dalszej zaś części poddają w wątpliwość czy stres związany z zanieczyszczeniami może być wystarczająco silny aby indukować produkcję białka Tra a 1. Można odnieść wrażenie że cała koncepcja została oparta wyłącznie na założeniu, iż zanieczyszczenia powietrza w przypadku białka Tra a 1 powodują inną odpowiedź niż w przypadku białka Bet v 1.

Na korzyść projektu przemawia natomiast uwaga autorów, iż ocena ekspresji białka Tar a 1 w różnych tkankach poziomki ekspozowanej na zanieczyszczenia może sama w sobie stanowić wartościowy wynik projektu zwłaszcza w kontekście właściwości alergicznych badanego białka.

Ocena kosztorysu

Kosztorys jest niewątpliwie mocną stroną projektu. Wszystkie wydatki zostały uzasadnione w sposób klarowny i bardzo dokładny – widać, że autorzy dokładnie wiedzą jakie urządzenia, materiały i artykuły zastosują podczas wykonywania badań, co z pewnością koreluje

z dokładnym przemyśleniem wszystkich technicznych aspektów. Całościowe koszty projektu nie są wygórowane.

Ocena możliwości wykonania

Zarówno uprawa szklarniowa jak również przygotowanie materiału do badań i przeprowadzenie analiz laboratoryjnych przedstawione zostały w klarowny sposób. Autorzy uwzględnili nie tylko podstawowe kwestie związane z klasycznym glebowym nawożeniem uprawy ale również dostarczenie podobnych ilości CO₂ w obu badanych grupach. Możliwości poprawnego wykonania tej części badań nie budzą wątpliwości. Nieco większym ryzykiem cechuje się część eksperymentu dotycząca preferencji pokarmowych. Wydaje się, iż nornice pochodzące z hodowli laboratoryjnej mogą znacznie się różnić pod kontem wybiórczości pokarmowej od osobników dziko żyjących. Być może wato byłoby wykorzystać do badań osobniki odłowione z natury. Problemów może również dostarczać analiza wyników niejednoznacznych (gdy ciężko ocenić preferencje danego osobnika), których odsetek może być znaczny. Autorzy nie podają dokładnie czy zwierzęta otrzymają po jednym owocu z każdej grupy czy też większą ich ilość. Wydaje się, że podanie większej ilości owoców i wydłużenie czasu obserwacji mogłoby przyczynić się do otrzymania wyników bardziej jednoznacznych.

Elżbieta Jędrzejczak

Recenzja projektu: „Rola zmian zachodzących w roślinie w reakcji na zanieczyszczenie powietrza”

W projekcie autorzy starają się odpowiedzieć na pytanie dotyczące strategii przyjmowanych przez roślinę w odpowiedzi na stresor i możliwych tego konsekwencji dla roślinożercy.

Badania poruszają aktualny problem związany z chemizacją środowiska, która bez wątpienia oprócz bezpośredniego wpływu na rośliny może także oddziaływać na organizmy, dla których stanowi niejednokrotnie bardzo ważny składnik diety. W moim mniemaniu jest to wyniki badań przeprowadzonych w ramach tego projektu mogą zainteresować zarówno botaników jak i badaczy zajmujących się interakcją w układzie żywiciel- roślinożerca. Dostarczają nowej wiedzy dotyczącej pojawiania się nowych strategii u roślin pod wpływem zanieczyszczenia środowiska i możliwych konsekwencji. Projekt spełnia wymagania formalne pod względem formy i części składowych.

Autorzy jako jedną z zastosowanych metod badawczych podali test sprawdzający akumulację pierwiastków (C, N, S) w roślinie. W samym projekcie brak uzasadnienia dlaczego można spodziewać się akumulacji tych pierwiastków.

Interesującym aspektem projektu, lecz wymagającym nieco dopracowania metody, jest przeprowadzenie testu preferencji pokarmowych z udziałem nornic. W doświadczeniu tym autorzy planują wykorzystać nornice utrzymywane w niewoli – stwierdzenie to w moim przekonaniu po pierwsze jest dość potoczne, ponadto wzbudza też wątpliwość, czy autorom nie chodzi o odłów nornic w terenie i wykorzystanie ich w eksperymencie. Sugerowałabym użycie innego sformułowania np.: “zwierząt pochodzących z hodowli laboratoryjnej”. Nie jest dla mnie zrozumiałe czemu ma służyć przegroda w pudełku używanym w teście preferencji pokarmowej i dlaczego różni się długością.

O ile wieloaspektowa ocena (wybór owocu, czas w jakim został on dokonany, czas przeznaczony na wążanie i procent zjedzonego owocu) w teście preferencji nie wzbudza żadnych zastrzeżeń, to należałoby zastanowić się nad innym sposobem podawania owoców.

Moim zdaniem lepszym rozwiązaniem byłoby podanie obu grup owoców jednocześnie i obserwowanie preferencji. Można zmieniać miejsca podawania owoców pochodzących z 2 grup eksperymentalnych, aby zwierzę nie nauczyło się pobierać pokarmu z określonej części klatki.

Jeżeli jeden z pomiarów dotyczy czasu dokonywania wyboru należałoby zadbać o jednaki stopień „przełodzenia” normic, np. tyle samo godzin od ostatniego posiłku. W innym wypadku trudno będzie dokonać analizy uzyskanych danych.

Autorzy zakładają, że preferencja wyboru owoców spowodowana będzie wyłącznie zawartością flawonoidów. Sugerowałabym także zbadanie zawartości np. cukrów w wybieranych nadgryzionych tj. wybranych w teście preferencji przez normice owocach, gdyż może okazać się on silniejszym atraktantem i wpływać istotnie na wyniki przeprowadzonego testu.

Założenia projektu są realne i nie znajdują przeszkód uniemożliwiających jego realizację zarówno pod względem zaplecza badawczego potrzebnego do przeprowadzenia testów planowanych w projekcie, jak i logistycznych- tj. miejsca założenia uprawy poziomek. Wydatki uwzględnione w kosztorysie są adekwatne do planowanych badań i umożliwiają ich przeprowadzenie.

Mocne strony wniosku: Proponowane badania są ciekawe i istotne w kontekście współczesnych problemów wzrostu zanieczyszczenia środowiska, a także stosunkowo łatwe do przeprowadzenia.

Słabe strony wniosku: Mimo dobrego planu ogólnego pewne wspomniane powyżej kwestie metodologiczne wymagają dopracowania. Wielokrotnie w tekście pojawiają się stylistyczne potknięcia w tekście i drobne błędy edytorskie.

Paulina Kosztyła

Recenzja projektu: „Rola zmian zachodzących w roślinie w reakcji na zanieczyszczenia powietrza”

Projekt podejmuje temat bardzo aktualny, a dokładnie wpływ zanieczyszczeń powietrza na organizmy żywe, w tym wypadku organizmy roślinne. Ta tematyka badawcza jest bardzo ważnym kierunkiem, jako że problem zanieczyszczenia środowiska dotyczy coraz większej liczby rejonów na Ziemi, a jego wpływ na organizmy nie może być pomijany. Stąd badania nakierowane na tę tematykę są na pewno przyszłościowe.

Do projektu mam jednak kilka uwag, ogólnych jak i nakierowanych mocniej na przeprowadzenie części eksperymentalnej:

- w projekcie nie ma jasno postawionego celu badawczego (jedynie w streszczeniu), hipotez i przewidywań
- pytanie postawione na początku, czy roślina w warunkach stresu chemicznego inwestuje w zwiększenie dostosowania czy w ochronę organizmu nie jest do końca dobrze sformułowane. Inwestowanie w ochronę organizmu też jest inwestowaniem w dostosowanie, bo może wpłynąć na zwiększenie przeżywalności
- zaproponowane dwie możliwe strategie roślin w sytuacji stresowej nie muszą się, według mnie, wykluczać. Roślina, mając wysoki poziom flawonoidów w tkankach poza owocami, być może zarówno przyciąga zwierzęta jak i efektywnie minimalizuje negatywny wpływ stresora
- w pierwszych akapitach pojawia się szereg informacji dotyczących już wiadomego wpływu zanieczyszczeń powietrza na rośliny, ich reakcji na ten czynnik stresowy, czyli produkowanie przez nie białek i substancji ochronnych – flawonoidów. Z drugiej strony słabo uwypuklone jest to, czego jeszcze nie wiadomo i czemu warto to badać. Odnosi się wrażenie, że wszystko jest już zbadane, a mechanizmy poznane. Główne pytanie o strategie roślin w reakcji na warunki stresowe jest szczerze rozwinięte

- w tekście pojawia się szereg stwierdzeń, jednak w większości brakuje cytacji, które mogłyby odnieść do źródeł
- projekt nie uzasadnia wystarczająco, czemu poziomka jest obiektem badań, zamiast tego nagle pojawia się w tekście
- we wstępie brakuje mi informacji, czy poza produkowaniem flawonoidów, istnieją inne znane mechanizmy obronne roślin na czynnik stresowy
- w części metodycznej warto wyjaśnić, czym jest symulowanie antropogenicznego zanieczyszczenia powietrza generowanego przez silnik, czyli jakie dokładnie związki będą wprowadzane do szklarni
- fragment dotyczący sposobu pobierania próbek do badań i samych analiz wymaga kilku poprawek. Nazwy pierwiastków, podane po raz pierwszy w tekście, powinny być wymieniane pełną nazwą, a nie skrótowo.
- w planowanym teście wyboru zapach owocu ma być kluczowym czynnikiem, jednak nie ma w tekście informacji, w jaki sposób flawonoidy modyfikują zapach owocu i czy faktycznie jest on odbierany przez zwierzęta
- test preferencji powinien zostać uszczegółowiony. Nie wiadomo, czy nornice będą przegłodzone przed testami, ilokrotnie dane zwierzę będzie uczestniczyło w eksperymencie oraz jaka dokładnie liczba owoców z każdej kategorii zostanie podana. Wymieniona losowość nie określa, na czym będzie dokładnie polegała. Czy owoce z danej kategorii będą podawane zamiennie, raz z lewej a raz z prawej strony? Wydaje mi się również, że bardzo ciężko jest określić czas przeznaczony na wachanie – nie jestem pewna czy można w ogóle zaobserwować na tyle dokładnie proces wachania, żeby je móc zmierzyć i o czym miałyby to świadczyć? Procent nadgryzienia owocu jest także bardzo trudnym do interpretacji wynikiem.
- w tekście wspomina się, że pewne stężenie flawonoidów mogą zaszkodzić zwierzętom, czy wiadomo jakie to są stężenia? Być może podwyższone stężenia flawonoidów w owocach będą wciąż przez nornice akceptowane

Analizy statystyczne

Wydaje mi się, że zaplanowanie testu t-Studenta dla próbek niezależnych w przypadku testu preferencji mogłoby zostać zastąpione testem dla par związanych bądź testem chi-kwadrat

Powyższe uwagi i sugestie nie zaniżają wartości tego projektu ani jego pomysłowości. Tekst, po wnikliwszej korekcie i rozpisaniu z większym rozmysłem schematu eksperymentów ma wciąż bardzo duży potencjał, by problem na linii zanieczyszczenia-roślina pokazać w szerszym kontekście – nie tylko na poziomie procesów molekularnych i fizjologicznych zachodzących w roślinie, co w dużej mierze już jest wiadome, ale ukazując, jak roślina wykorzystuje te mechanizmy i dysponuje zasobami, by zmaksymalizować dostosowanie w stresogennym środowisku.

Agata Rozik

Recenzja projektu: „Rola zmian zachodzących w roślinie w reakcji na zanieczyszczenia powietrza” J. Dębski, J. Niedojadło

Projekt ma na celu sprawdzenie na ile zanieczyszczenie powietrza spalinami z silnika Diesla wpływa na poziom flawonoidów, zawartość białka Tra oraz preferencji u roślinożerców owoców poziomki wyhodowanych w warunkach czystych i zanieczyszczenia. Poziomki mają być

hodowane w dwóch szklarniach, przy czym w jednej w atmosferze spalin, a w drugiej z powietrzem wzbogaconym w CO₂.

To czego brakuje mi w tym projekcie to przesłanki, które miałyby stać za oczekiwaniem, że zanieczyszczenie spalinami mogłoby mieć znaczenie dla ilości produkowanych flawonoidów. Rozdział Cel naukowy jest mało konkretny odwołuje się do strategii życiowych poziomki, ale do końca czytelnik nie jest pewien po przeczytaniu tego podrozdziału, co właściwie stanowi problem badawczy, który wnioskodawcy chcą spróbować rozwiązać. Brakuje jasno postawionych hipotez i przewidywań. Cel badań odnosi się do flawonoidów, podczas gdy reszta opisu projektu sprawia wrażenie, że autorzy większą wagę przywiązują do białka Tra podkreślając, że jest to białko alergenne i nie bardzo wiem też dlaczego to w ogóle ważne. Proszę sprawdzić, przy koncepcji badań – jest ona sfokusowana na białku, a nie flawonoidach. Nie wiem, czy autorzy uznają poziom flawonoidów i poziom ekspresji białka Tra jako wskaźniki kondycji osobniczej? Jeśli tak, to jakie poziomy – niskie, czy wysokie wskazują na wyższą kondycję? Trochę się w tym gubię czytając ten tekst. Sam tytuł projektu także nie jest informatywny: „Rola zmian” ale w ogóle w czym? Coś tu jest pokręcone.

Metodyka

Mam poważne wątpliwości, czy obie szklarnie są do końca porównywalne. Choć pomysł suplementacji CO₂ wydaje się rozsądny, to nie jestem pewien czy autorom uda się doprowadzić do sytuacji, że obie szklarnie będą miały dostarczoną taką samą ilość CO₂ (wystarczy popatrzeć na kosztorys, by utwierdzić się w tych wątpliwościach, proszę porównać ilość paliwa i ilość CO₂, które mają być kupione). Autorzy piszą o pomiarach gazów w szklarniach. Co konkretnie mają na myśli? Jakie gazy? Jaki sens ma badanie pyłku? Czy w nim szczególnie jakość należy się spodziewać efektów zanieczyszczenia? Nie bardzo także rozumiem co mają na myśli autorzy w podrozdziale Analizy, pisząc że będą badane zawartości C, N i S, by sprawdzić, czy któryś z tych pierwiastków się nie akumuluje. Przecież chyba jest jasne, że będą się one akumulować w miarę wzrostu roślin. Domyślam się, że autorom może chodzi o wzajemne proporcje tych pierwiastków, co pewnie o czymś świadczy. W celu badań nie ma ani słowa o tym, że cokolwiek autorzy przewidują w tym względzie. Podobnie w celu badań nie pojawiają się kwestie związane z planowanymi testami preferencji. Jaki sens mają te testy preferencji? Czemu mają właściwie służyć, jeśli projekt byłby związany z flawonoidami i ekspresją białek?

Nie wiem, czy prosty test t-Studenta jest odpowiedni do analizy danych uzyskanych w tych badaniach. Rośliny będą hodowane w skrzynkach, czy zatem nie należy kontrolować na fakt tego że niektóre będą pochodzić z tej samej skrzynki, a inne z innych skrzynek? Szkoda, że nie znamy planowanej wielkości próby (wiemy ile będzie rośli wysadzonych, ale to niekoniecznie jest wielkość próby w analizach). Szkoda, że tak naprawdę nie wiemy jaka jest przewidywana struktura uzyskanych danych. Test t dla danych niezależnych raczej nie będzie odpowiedni, jeśli planuje się dokonać test wyboru – wybór jednego rodzaju pokarmu wpływa na możliwości wyboru tego drugiego – nie są to zatem zdarzenia niezależne. Znowu, może nie mam racji, ale nie dowiemy się tego bez znajomości struktury danych.

Czy autorzy mają jakiegokolwiek doświadczenia w obszarze planowanych badań? Szczególnie, czy potrafią obsługiwać urządzenia o których mowa w projekcie?

Kosztorys i harmonogram:

Dlaczego te badania muszą trwać 2 lata? Przecież te badania można zrobić bez większego problemu w ciągu jednego roku zaczynając projekt od wczesnej wiosny.

Kosztorys jest moim zdaniem mocno zawyżony. Szklarnia o powierzchni 6m² dla 50 roślin to chyba przesada. Autorzy planują spalić ok. 800l paliwa, czy to nie pomyłka? W każdym razie wynika to z kwoty przeznaczonej na zakup paliwa, która wydaje się wyssana z palca. Koszt wypożyczenia nornic? Nie wiedziałem, że są takie wypożyczalnie i z takimi stawkami. Jak

przystąpienie do tego projektu to proszę o kontakt, bo to wygląda na złoty interes. Za takie pieniądze to możecie je mieć ode mnie na zawsze! Nie będę żądał zwrotu. Czy na pewno konieczny jest zakup analizatora powietrza? Nie da się tego pożyczyć, czy zamówić takich analiz za opłatą? Czy w ogóle jest konieczne badanie tego powietrza? Przecież wiadomo, że tam gdzie będą włączane spaliny to będzie ono zawierało spaliny, a tam gdzie nie będą one włączane to spalin nie będzie. Wydanie prawie 10tys zł, żeby tą oczywistość wykazać to chyba gruba niegospodarność. W wynagrodzeniach chyba brakuje jednego zero. Zaplanowanie konferencji jest dobrym pomysłem, ale należy coś tu więcej uzasadnić. Np. co to będzie za konferencja i jaki to ma związek z planowanymi badaniami.

Mariusz Cichoń

Uwagi ogólne

Tematyka projektu badawczego jest interesująca. Projekt spełnia kryterium badań podstawowych i potencjalnie może poszerzyć naszą wiedzę na temat funkcjonowania organizmów żywych w warunkach skażenia środowiska substancjami toksycznymi. Jednakże, w obecnej formie projekt na pewno nie uzyskałby dofinansowania. Moim największym zarzutem jest brak jasno opisanej hipotezy badawczej - po kilukrotnym przeczytaniu projektu nie jestem pewna, czy głównym obiektem badań są rośliny (flawonoidy w poziomkach), czy też zwierzęta (preferencje smakowe/żywieniowe nornic), gdyż nie ma jasnego związku pomiędzy tymi dwoma zagadnieniami. Nie wiadomo też, jaki jest związek pomiędzy badanym białkiem alergennym a zawartością flawonoidów w owocach. Układ eksperymentalny jest bardzo uproszczony i w mojej opinii, nie umożliwi odpowiedzi na stawiane pytania. Projekt jest napisany bardzo słabo pod względem językowym, zawiera liczne błędy gramatyczne, a nawet ortograficzne, które mogą zdyskwalifikować nawet najlepszy pomysł. Proponuję czytać na głos poszczególne zdania, wtedy łatwiej wychwycić dziwne (czasem nielogiczne) sformułowania. Przecinki służą do oddzielania części zdań, szczególnie w zdaniach wielokrotnie złożonych i są niezbędne w niektórych konstrukcjach językowych.

Poniżej podaję zagadnienia, które wymagają wytłumaczenia lub uszczegółowienia. Pozostałe uwagi są naniesione bezpośrednio w tekście, np. jako komentarze.

Tytuł.

W ogóle nie oddaje zawartości projektu. Tytuł powinien być tak skonstruowany, aby czytelnik wiedział, czego może się spodziewać w tekście. Określenie 'rola zmian' jest zbyt wieloznaczne i mało informacyjne. Określenie 'w roślinie' musi zostać zmienione – najlepiej użyć nazwy badanego gatunku (szczególnie, że nie wszystkie rośliny mają owoce). Lepiej użyć określenia 'skażenie' a nie 'zanieczyszczenie'; skażenie sugeruje negatywny wpływ szkodliwych substancji.

Streszczenie.

Musi być przeredagowane w taki sposób, aby zawierało mniej ogólników, a więcej konkretów, przede wszystkim - hipotezę badawczą. Co prawda autorzy piszą, że: 'Celem projektu jest określenie czy w warunkach stresu chemicznego roślina będzie inwestowała w dostosowanie poprzez podniesienie atrakcyjności owocu czy w ochronę organizmu.', ale ta hipoteza w ogóle nie jest testowana.

Cel naukowy.

Podstawowa moja wątpliwość to czy w przyrodzie inwestycja roślin w atrakcyjność owoców dla zwierząt roznoszących nasiona poprzez zmianę smaku/zapachu jest tak znacząca? Czy inwestycja w rozmnażanie nie powinna polegać przede wszystkim na np. zwiększaniu rozmiaru, widoczności, ilości kwiatów i owoców, zwiększaniu ilości nasion albo np. wcześniejszym kwitnieniu? Autorzy całkowicie pomijają takie kwestie, jak na przykład wpływ skażenia na szybkość wzrostu roślin poziomki czy całkowitej wartości energetycznej nasion. Nie wiadomo, jaka jest optymalna zawartość flawonoidów w owocach dla zjadających je zwierząt. Nie wiadomo, jakie znaczenie ma poziomka jako źródło pokarmu dla nornic. Brakuje jasno nakreślonego problemu badawczego i hipotezy badawczej (zerowej, alternatywnej). W gruncie rzeczy nie wiadomo, co autorzy chcą zbadać.

Znaczenie projektu.

Jest w miarę dobrze opisane, ale brakuje konkretów. Uzupełnienie wiedzy jako wynik projektu jest zbyt ogólne. Czy synteza flawonoidów jest powszechna u roślin?

Koncepcja i plan badań.

Czy tylko skażenia powietrza indukują zwiększoną ekspresję danego białka? Co z zanieczyszczeniem wody, gleby etc.? Nie wiadomo, co za hipoteza ma być potwierdzona. Co z ochroną własnych tkanek rośliny, o której było wspomniane wcześniej?

Metodyka badań.

Pojedyncze szklarnie (zabieg i kontrola) powodują, że na badany efekt nakłada się 'efekt szklarni'. Lepsze by były mniejsze szklarnie, ale w większych ilościach. Właściwie nie wiadomo, dlaczego doświadczenie będzie wykonywane w terenie, gdzie na wyniki może wpłynąć bardzo wiele innych czynników (np. szkodniki korzeni roślin). Poziomka (lub inna roślina) może być z powodzeniem wyhodowana w komorach klimatycznych, z regulowaną temperaturą, wilgotnością itp. Jak często będą podawane spaliny? Czy w sposób ciągły, to koszt paliwa staje się dosyć znaczny (plus dodatkowe skażenie środowiska, które z powietrza dostanie się do gleby w stacji rolniczej).

Jak nawożenie może wpłynąć na ekspresję białek/zawartość flawonoidów?

Brakuje w planie doświadczenia tak prostych elementów, jak pomiar biomasy części nadziemnych i podziemnych (które mogą być zmienione pod wpływem skażenia).

Po co mierzona jest zawartość pierwiastków w roślinie? Czy autorzy mają dostęp do takiego sprzętu, jak wymieniony we wniosku (w INoŚ takich nie ma)?

Nie wydaje mi się, żeby test preferencji miał sens w odniesieniu do pojedynczych owoców, jakie przełożenie mają wyniki testu preferencji na hipotezę badawczą? Nawet jeżeli owoce z zanieczyszczonych roślin będą miały większą zawartość flawonoidów (będą smaczniejsze), to i tak są mniej pożądanym pokarmem ze względu na zawartość zanieczyszczeń, nie tylko związków fenolowych. Skoro nawet bezkręgowce są w stanie unikać pożywienia zawierającego substancje szkodliwe, to tym bardziej nornice. Nie wiadomo, po co oznaczanie flawonoidów w korzeniach i liściach, skoro interesują nas owoce. Co z pyłkiem?

Czy 30 nornic to wystarczająca próba?

Przy użyciu tylko testu t-Studenta jest niemożliwe uwzględnienie wszystkich efektów.

Kosztorys.

Jest bardzo optymistyczny, rzeczywiste koszty analiz laboratoryjnych zawsze są dużo wyższe (amortyzacja urządzeń, wymiana części, galanteria szklana i plastikowa itp.). Agregat do

wytwarzania spalin powinien być dostępny w stacji badawczej – czy to sprawdzono? Co z kosztami urządzenia do zwiększania zawartości dwutlenku węgla? Czy w ogóle całe badania, przeprowadzone w atmosferze zwiększonego stężenia CO₂, mają przełożenie na rzeczywistość? Może lepiej byłoby usuwać CO₂ ze szklarni w atmosferze spalin, w końcu CO₂ do pewnego stopnia sprzyja wzrostowi roślin i może to nawet (teoretycznie) przewyższać negatywny wpływ zanieczyszczeń?

Podsumowując, projekt wymaga dopracowania.

Beata Klimek

Recenzja projektu pt. „Rola zmian zachodzących w roślinie w reakcji na zanieczyszczenie powietrza”

Projekt ma celu sprawdzenie czy w warunkach stresu chemicznego roślina inwestuje w dostosowanie poprzez podniesienie atrakcyjności owocu czy poprzez ochronę całego organizmu. Badanie ma być przeprowadzone na poziomce pospolitej (*Fragaria vesca*), gdzie część sadzonek będzie narażona na czynnik stresowy w postaci zanieczyszczonego tlenkami niemetalu powietrza, a druga część będzie stanowić kontrolę. Planowane są kompleksowe analizy chemiczne i molekularne różnych części roślin (owoc, liście i korzenie) pod kontem stężenia flawonoidów, zawartość azotu, siarki i węgla. Następnie owoce z kontroli i grupy eksperymentalnej mają być ocenione w testach preferencji przez nornicę rudą (*Myodes glareolus*). Niewątpliwie jest to ważny aspekt proponowanego projektu, gdyż uzyskany wynik pozwala na interpretację w szerszym ekologicznym kontekście. Dodatkową wartością projektu jest zbadanie zawartość białka alergennego Tra a 1, co może mieć konsekwencje w naukach medycznych.

Autorzy projektu przewidują dwa scenariusze radzenia sobie z zanieczyszczeniami przez roślinę. Nieznaczny wzrost zawartości flawonoidów w owocu mógłby poprawić jego walory smakowe i zapachowe, a tym samym mógł by mieć wpływ na zwiększenie dostosowania. Z drugiej strony wysokie stężenia we wszystkich badanych tkankach mogłoby sugerować, że stres jest zbyt duży i roślina inwestuje w mechanizmy obronne. Zastanawiam się tylko na ile różne strategie radzenia sobie z zanieczyszczeniami może wynikać z jak dużym zanieczyszczeniem roślina ma do czynienia (czy też jest to uniwersalne dla gatunku). Można sobie wyobrazić, że przy małym zanieczyszczeniu środowiska roślina rzeczywiście zwiększa walory owocu, natomiast przy zbyt dużym zanieczyszczeniu nie jest już w stanie „chronić owocu”. Ciekawe byłoby zbadanie reakcji rośliny w gradiencie zanieczyszczeń.

Owoce wyhodowane w warunkach eksperymentalnych mają być ocenione pod kątem preferencji przez nornicę rudą. Jednakże autorzy nie przedstawili wprost hipotez dotyczących tych preferencji. Co więcej w podrozdziale „Koncepcja i plan badań”, gdzie powinien znaleźć się ogólny plan badań i szczegółowe cele badawcze, jest tylko ogólnie napisane, że testy preferencji pokarmowych będą wykonywane, ale nie ma wzmianki czemu one miałyby służyć.

Metodyka badań dotycząca uprawy sadzonek i późniejszych analizy chemicznych i molekularnych jest szczegółowo przedstawiona. Wzięto pod uwagę także możliwość różnego wpływu CO₂ (co jest konsekwencją zastosowanej metody zanieczyszczenia) i wyrównanie stężenia CO₂ w kontrolnej grupie do poziomu w grupie eksperymentalnej. Do badań zostanie zebrany materiał z 30 roślin z obu szklarni, co jest pełni wystarczające do oszacowania różnic

między grupami proponowanym testem t-Studenta dla prób niezależnych. Jednakże w dalszej części przy opisie oznaczania pierwiastków C, N, S, zostaną zbadane próbki owoców z 5 roślin doświadczalnych i 5 kontrolnych. Niejasne jest dlaczego te pierwiastki będą oznaczane tylko w owocach i dlaczego tylko dla 10 roślin. Niejasne jest także w ilu próbkach będzie oznaczona zawartość flawonoidów i białka Tra v 1 oraz w jakich częściach rośliny. W związku tym ocenie, czy wysokość planowanych koszty jest uzasadniona, jest niemożliwa. Jednakże koszt samego projektu wydaje się relatywnie niski, co wiąże się z tym, że wykonawcy projektu mają dostęp do szklarni oraz do laboratorium Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie będą używać sprzęt niezbędny do wykonania planowanych analiz chemicznych i molekularnych.

Testy preferencji pokarmowych będą wykonywane w sposób standardowy i na nornicach pochodzących z hodowli, a więc na takich które nie będą miały wcześniej kontaktu z badaną rośliną, co pozwoli na jednoznaczną interpretację wyników. Jednakże brakuje mi informacji jak długo test będzie wykonywany i jaki czas będą miały nornice na przyzwyczajenie się do czystego pudełka (co niewątpliwie będzie stresujące dla nich) zanim dostaną owoce do wyboru. Brakuje mi także informacji czy nornica będzie głodzona przed testem - przeważnie gryzonie nie są zainteresowane nowym pokarmem póki nie są głodne. Wydaje mi się, że zanim wykonawcy przejdą do tej części eksperymentu powinni wykonać szereg badań pilotowych. Nie ma także informacji czy testy te będą nagrywane (i czy wykonawcy mają dostęp do kamer) czy też będą obserwowane na bieżąco – co z kolei może przyczynić się do większego błędu obserwacji po pierwsze poprzez wpływ obserwatora na zachowanie nornic a po drugie poprzez mniej dokładne wykonanie pomiaru czasu. Niejasne jest dla mnie także w jaki sposób mają być przeprowadzone analizy statystyczne. Wykonawcy proponują test t-Studenta dla prób niezależnych, co wydaje się tutaj być nieuprawnione. Na przykład, jeżeli nornica wacha owoce z jednej grupy, to nie może jednocześnie wachać owoców z drugiej grupy, a więc obserwacje te nie są niezależne od siebie.

Podsumowując, projekt jest ciekawy i porusza ważny problem z dziedziny fizjologii i ekologii roślin. Pozwoli on na określenie strategii rośliny w warunkach stresu chemicznego, a następnie konsekwencje stosowanej strategii na rozsiewanie nasion. Jednakże do pełnego sukcesu projektu dobrze byłoby doprecyzować stawiane hipotezy oraz szczegóły eksperymentu.

Edyta Sadowska

Wpływ zanieczyszczenia powietrza na stężenie flawonoidów w wegetatywnych i generatywnych organach poziomki pospolitej (*Fragaria vesca* L.)

Jakub Dębowski – Instytut Botaniki, Jowita Niedojadło – Instytut Nauk o Środowisku

Streszczenie projektu

Zanieczyszczenie powietrza jest czynnikiem stresowym dla roślin. Rośliny w odpowiedzi na stres produkują wtórne metabolity o działaniu antyoksydacyjnym – flawonoidy. Odpowiadają one nie tylko za obronę przed czynnikami stresowymi, ale również za kolor i zapach owoców. Wpływ flawonoidów na żywiące się nimi zwierzęta jest zazwyczaj korzystny, jednak w wysokich stężeniach mogą również wykazywać skutki niepożądane. Celem projektu jest określenie czy w warunkach stresu chemicznego roślina będzie inwestowała w swoją ochronę poprzez produkcję antyoksydantów i w jaki sposób wpłynie to na jej atrakcyjność dla roślinożercy żywiącego się jej owocami. Badanie przeprowadzone zostanie na poziomce (*Fragaria vesca* L.) w szklarniach doświadczalnych, gdzie wprowadzony zostanie czynnik stresowy w postaci zanieczyszczonego tlenkami niemetali powietrza. Ocenione zostanie stężenie flawonoidów w poszczególnych tkankach roślinnych (owoce, liście i korzenie), a także zawartość białka Fra a 1 pośredniczącego w syntezie flawonoidów (owoce, liście, korzenie i pyłek). Zawartość azotu, siarki i węgla zostanie zbadana w tkankach dodatkowo w celu wykluczenia ewentualnego wpływu akumulacji związków w roślinach eksperymentalnych w stosunku do próby kontrolnej. Owoce wyhodowane w warunkach eksperymentalnych ocenione zostaną pod kątem preferencji żywieniowych przez normicę rudą (*Myodes glareolus*). Nieznacznym wzrostem zawartości flawonoidów w owocu mógłby poprawić jego walory smakowe i zapachowe, a tym samym mógłby mieć wpływ na sukces endozoochorii. Z drugiej strony wysokie stężenie we wszystkich badanych tkankach mogło by sugerować, że stres jest zbyt duży i roślina inwestuje w mechanizmy obronne. Badania poruszają ważny aspekt zmiany fizjologii roślin w warunkach zanieczyszczonego powietrza. Jednocześnie, poprzez wykazanie wpływu zanieczyszczenia na syntezę alergicznego białka Fra a 1 badania stają się atrakcyjne nie tylko dla naukowców z tej dziedziny, ale także dla szeroko pojętego społeczeństwa.

Cel naukowy projektu

(jaki problem naukowy wnioskodawca podejmuje się rozwiązać, hipotezy badawcze)

Rośliny w odpowiedzi na stres produkują wtórne metabolity, które mogą również pełnić dodatkową funkcję korzystną lub niekorzystną dla rośliny. Do takich związków należą flawonoidy, których obecność w owocach stanowi atraktant dla potencjalnego roślinożercy. Dzieje się tak, ponieważ wpływają one na zapach i kolor owocu. Flawonoidy są antyoksydantami, więc ich produkcja w warunkach stresu chemicznego jest uzasadniona mechanizmami ochronnymi. Zakładamy, że w sytuacji stresowej roślina będzie reagować poprzez zmiany metaboliczne. W naszym projekcie chcielibyśmy sprawdzić czy rezultatem tych zmian będzie wzrost stężenia flawonoidów. Zwiększona ilość flawonoidów we wszystkich tkankach rośliny może być sygnałem, że roślina skoncentrowana jest na walce ze szkodliwymi oddziaływaniami substancji chemicznych zawartych w powietrzu. Zakładamy, że zanieczyszczenie powietrza może spowodować nadmierną koncentrację flawonoidów i białek ich szlaku metabolicznego, która wpłynie na atrakcyjność owoców dla roślinożercy, czyli potencjalnego rozsiewacza nasion. Dlatego chcielibyśmy również przetestować zależność roślina-roślinożerca, żeby odpowiedzieć na pytanie czy w warunkach stresu kwestia przetrwania rośliny jest nadrzędna względem atrakcyjności owoców dla potencjalnych rozsiewaczy. Projekt ma na celu zweryfikowanie następujących hipotez:

W warunkach stresu chemicznego, jakim jest zanieczyszczenie powietrza tlenkami niemetalami, wzrasta stężenie flawonoidów w tkankach wegetatywnych i generatywnych poziomki zwyczajnej.

Nieznaczny wzrost stężenia flawonoidów w owocu podnosi jego atrakcyjność względem roślinożercy na przykładzie nornicy rudej.

Znaczenie projektu

(dotychczasowy stan wiedzy, uzasadnienie podjęcia problemu badawczego, uzasadnienie nowatorskiego charakteru badań, znaczenie wyników projektu dla rozwoju danej dziedziny i dyscypliny naukowej oraz rozwoju cywilizacyjnego)

Zanieczyszczenie powietrza tlenkami niemetalami i ozonem staje się coraz poważniejszym problemem w związku z wzrostem aglomeracji, przemysłu i transportu. Negatywny wpływ na organizmy roślinne potwierdzony został w wielu badaniach (WHO 2014, AHA 2010). Stres chemiczny jakiego doświadczają rośliny zmusza je do aktywacji mechanizmów obronnych. Przeprowadzone badania wykazały w tkankach pyłku brzozy wzmożoną produkcję alergennego białka Bet v 1 pod wpływem zanieczyszczeń powietrza. Homologiem białka Bet v 1 jest występujące w truskawkach (*Fragaria x ananassa*) i dziko rosnących poziomkach (*Fragaria vesca* L.) białko o działaniu alergennym Fra a 1 (Futsuki 2014). Białka te biorą udział w szlaku syntetyzującym związki z grupy flawonoidów (Helander 1997), które wykazują działanie antyoksydacyjne, chroniąc aparat fotosyntetyczny rośliny przed uszkodzeniem. Wzrost stężenia białka w roślinie skutkuje wzmożoną syntezą flawonoidów (Muñoz 2000). Flawonoidy oprócz silnego działania antyoksydacyjnego, wykazują właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze. Jednocześnie pełnią funkcje barwników roślinnych nadających kolor dojrzałym owocom. Wpływają one również na ich zapach (Mierziak i in. 2014).

Pomimo, że znany jest wpływ różnych czynników stresowych na fizjologię roślin (Futsuki 2014), ciągle nie posiadamy wystarczającej wiedzy na temat wpływu zanieczyszczeń powietrza na proces odporności roślin. Roślina w odpowiedzi na chroniczny stres chemiczny powinna zwiększać stężenie związków odpowiedzialnych za obronę organizmu, między innymi flawonoidów w swoich tkankach. Jednakże flawonoidy oprócz tego, że są barwnikami, nadają zapach owocom oraz wykazują zdrowotne działanie na organizmy zwierzęce (EFSA 2010; Cushine i Lamb 2006), mogą również objawiać potencjalnie szkodliwe działanie, zwłaszcza w wysokich stężeniach (Skibola i Smith 2000, Ross 2000, Rosenthal i Berenbaum 2012). Sugeruje to, że utrzymywanie wysokiego stężenia flawonoidów w owocu mogłoby oddziaływać niekorzystnie na relację rośliny z roślinożercą rozsiewającym jej nasiona. Jednocześnie nieznaczny wzrost zawartości flawonoidów w owocu mógłby poprawić jego walory smakowe i zapachowe czym wywarłby korzystny wpływ na zjawisko endozoochorii.

Proponowane badania podejmują aktualny temat wpływu zanieczyszczeń powietrza na zmiany fizjologiczne zachodzące w roślinach. Niniejszy projekt przyczyni się do lepszego zrozumienia procesów reakcji roślin na stres w kontekście zanieczyszczenia środowiska. Jednocześnie praca pozwoli na uzupełnienie dotychczasowej wiedzy na temat alergennych białek występujących w poziomkach i ewentualnym wpływie zanieczyszczeń na wzrost ich alergenicności, co pozwoli rozszerzyć krąg osób potencjalnie zainteresowanych wynikami. Ocena ekspresji białka Fra a 1 w różnych tkankach poziomki w warunkach zanieczyszczenia sama w sobie będzie miała cenną wartość poznawczą i praktyczną. Wyniki uzyskane w ramach projektu pozwolą na stworzenie dwóch lub trzech publikacji oraz artykułu w czasopiśmie popularnonaukowym.

Koncepcja i plan badań

(ogólny plan badań, szczegółowe cele badawcze, wyniki badań wstępnych)

W ramach projektu zaplanowano dwa eksperymenty. Wybrany modelem roślinnym jest *Fragaria vesca* L. czyli poziomka pospolita. Powodami przemawiającymi za wyborem tej rośliny są występujące w rodzaju *Fragaria* białka alergenne oraz obecność u naturalnie występujących poziomek endozoochorii jako mechanizmu rozsiewania. Drugim organizmem modelowym wykorzystanym w doświadczeniach będzie nornica ruda (*Myodes glareolus*). Zwyczajnie

pokarmowe nornicy oraz jej powszechne występowanie sprawiają, że w naturze poziomka jest jej potencjalnym pokarmem (Jacobs i in. 2014). Ramy czasowe projektu obejmują okres jednego roku w trakcie, którego założona zostanie eksperymentalna hodowla poziomki, przeprowadzona analiza materiału roślinnego, testy preferencji pokarmowych, obróbka i analiza zebranego materiału roślinnego oraz analiza statystyczna. Zaplanowane badania wykonane będą przez autorów projektu, którzy posiadają praktyczną wiedzę na temat hodowli eksperymentalnych roślin, jak również metod laboratoryjnych wykorzystywanych w projekcie.

Układ eksperymentalny będzie składał się z dwóch szklarni o identycznych warunkach rozwojowych dla roślin. Jednakże do jednej z nich wprowadzony zostanie czynnik eksperymentalny w postaci spalin o stężeniu symulującym warunki obserwowane na terenach z zanieczyszczeniem. Przed wykonaniem eksperymentów przeprowadzone zostaną badania pilotażowe obejmujące próbny rozruch i kalibrację systemu służącego do hodowli poziomki. Dodatkowo wykonane zostaną próby najbardziej optymalnego testu preferencji z udziałem nornic.

Metodyka badań

(sposób realizacji badań, metody, techniki i narzędzia badawcze, metody analizy i opracowania wyników, urządzenia i aparatura wykorzystywane w badaniach)

Uprawa

Pierwszym etapem planowanych badań jest założenie hodowli poziomki pospolitej (*Fragaria vesca L.*). Wybrana została metoda hodowli szklarniowej ze względu na łatwość wyprowadzania spalin i niskie koszty. W tym celu zakupione zostaną dwie szklarnie z poliwęglanu o szkielecie aluminiowym, wyposażone w metalową podłogę i uchylane okna. Dodatkowo w oknach zostaną zamontowane wentylatory wyposażone w termostat oraz higrometr co pozwoli stworzyć warunki porównywalne między szklarniami. Powierzchnia szklarni to 6,2 m². Dobrana została ona pod kątem zoptymalizowania warunków wewnętrznych. Obie szklarnie zostaną umieszczone na terenie należącym do Uniwersytetu Jagiellońskiego w obrębie Polanki Hallera. W każdej szklarni pod koniec kwietnia zostanie posadzone 50 sadzonek poziomki w osobnych pojemnikach z wykorzystaniem warstwy drenażu. Doniczki zostaną umieszczone na tackach plastikowych spoczywających na lekkim podwyższeniu. Wykorzystane materiały będą obojętne chemicznie. Do uprawy użyta zostanie mieszanka ziemi ogrodowej, torfu i piasku w proporcji 400:80:20 litrów. W momencie posadzenia sadzonkom zostanie podany nawóz azotowo-magnezowy następnie podczas wzrostu co 5 dni będą otrzymywać nawóz fosforowo-potasowy podawany w formie płynnej doglebowo. Wszystkie rośliny będą regularnie podlewane. Do jednej ze szklarni zostanie poprowadzony gumowy wąż odprowadzający spaliny z agregatu z silnikiem diesla w celu symulowania antropogenicznego zanieczyszczenia powietrza. Typ silnika zostanie dobrany dzięki konsultacjom ze specjalistami. W drugiej szklarni kontrolnej zostanie zainstalowana instalacja suplementująca CO₂. To pozwoli wyeliminować różnice wzrostowe u roślin wynikające z podwyższonego stężenia tego gazu w szklarniach (Amthor 1995). Planowane są krótkie konsultacje przed rozpoczęciem hodowli dotyczące kalibracji wykorzystywanego sprzętu oraz próby jego działania. Pierwszym pobieranym materiałem do badań oznaczenia stężenia białka będzie pyłek w celu uzupełnienia stanu obecnej wiedzy. Do pobrania materiału wybrane zostanie 30 roślin o porównywalnej wielkości owoców i cechach biometrycznych spośród 50 roślin z każdej szklarni. Owoce, korzenie i liście zostaną zebrane w lipcu.

Przygotowanie materiału do badań

Zebrane części roślin (pyłek, liście, korzenie i owoce) poddane zostaną zliofilizowane przy użyciu liofilizatora DONSERV. Zabieg ten ma na celu przygotowanie do badań przy jednoczesnym jak najwierniejszym zachowaniu właściwości materiału. Następnie rozdrobniony zostanie on w młynku kulowym firmy Retsch CryoMill. Pozwoli to na uzyskanie jednorodnego materiału z dużo większą precyzją niż przy pomocy manualnych klasycznych metod, jednocześnie oszczędzając czas. Tak przygotowany materiał poddany zostanie późniejszym analizom molekularnym i chemicznym w laboratorium Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Analizy chemiczne i molekularne

Badanie akumulacji pierwiastków:

Przy użyciu spektrometru masowego zostaną zbadane próbki owoców z 5 roślin eksperymentalnych i 5 kontrolnych. Dodatkowe badanie owoców ma wykluczyć ewentualne różnice w akumulacji związków pomiędzy roślinami z doświadczenia, a próbą kontrolną, które mogły by wpłynąć na test preferencji. Ma to na celu sprawdzenie czy nie zachodzi dodatkowa akumulacja pierwiastków występujących w spalinach takich jak siarka, węgiel i azot w stosunku do próby kontrolnej.

Flawonoidy:

Zawartość flawonoidów w 180 próbkach materiału roślinnego (Kontrola: 30 x korzenie, 30 x liście, 30 x owoc, Grupa eksperymentalna: 30 x korzenie, 30 x liście, 30 x owoc) oznaczona zostanie za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC. Technika ta charakteryzuje się dużą czułością, pozwala na identyfikację i ocenę ilościową związków chemicznych. Metoda ta jest szeroko stosowana w ocenie stężenia flawonoidów (Wang i in. 2009, Rijkea i in. 2006).

Białko Fra a 1:

Białko alergenne oznaczone zostanie w 240 próbkach materiału roślinnego (Kontrola: 30 x korzenie, 30 x liście, 30 x owoc, 30 x pyłek; Grupa eksperymentalna: 30 x korzenie, 30 x liście, 30 x owoc, 30 x pyłek) za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Metoda powszechnie stosowana jest w ocenie białek roślinnych.

Test preferencji

W testach wykorzystane zostanie 30 nornic rudych pochodzących z hodowli, które nie miały wcześniej kontaktu z badaną rośliną, co pozwoli na uniknięcie ewentualnych indywidualnych preferencji zwierzęcia. Dieta tego gatunku w środowisku naturalnym bogata jest w owoce leśne, między innymi poziomki (Jacob i in. 2014). Test przeprowadzany będzie w czystym pudełku, w którym umieszczone zostaną dwa stanowiska z owocami (owoce pochodzące z kontroli i z grupy z czynnikiem eksperymentalnym). Owoce zostaną zważone, a następnie obliczone zostanie jaką proporcję spośród zjedzonych owoców stanowiły te z grupy eksperymentalnej. Owoce będą podawane do obydwu stanowisk w sposób losowy tak, aby wykluczyć ewentualny wpływ położenia stanowiska na wyniki. Każda nornica będzie mieć tylko jedną próbę, która będzie trwać godzinę. Przed przystąpieniem do badania zostanie ona przegłodzona, w celu stymulacji do pobrania pokarmu.

Analiza statystyczna

W celu wykazania różnic pomiędzy zawartością związków flawonoidowych i białek pomiędzy grupą kontrolną a eksperymentalną zastosowana zostanie analiza dwuczynnikowa, w której czynnikiem będzie eksperyment i część rośliny. Potencjalne różnice w testach preferencji wyznaczone zostaną za pomocą odchylenia od losowej proporcji 0,5 za pomocą testu t – Studenta.

Literatura

American Heart Association (2010) *Evidence growing of air pollution's link to heart disease, death at the Wayback Machine.*

Amthor Jeffrey S., (1995) *Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [CO₂] in relation to the global carbon cycle*, Volume 1, Issue 4, pages 243–274.

Rijkea Eva de, Outb Pieter, Niessenb Wilfried M.A., Arieseb Freek, Gooijerb Cees, Udo A.Th.

Brinkmanb, (2006) *Analytical separation and detection methods for flavonoids*, Journal of Chromatography A, Volume 1112, Issues 1–2, 21 Pages 31–63.

Cushnie TP, Lamb AJ (2005). *Antimicrobial activity of flavonoids*, International Journal of Antimicrobial Agents 26 (5): 343–356.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy (2010). "Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage pursuant to Article of Regulation. EFSA Journal 8 (2): 1489.

Helander M.L., Savolainen J., Ahlholm J. (1997) *Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens*. Allergy. 52(12):1207-14.

Mierziak Justyna, Kostyn Kamil, Kulma Anna, (2014) *Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment*, Molecules, 19, 16240-16265.

Muñoz C., Hoffmann T., Escobar N.M., Ludemann F., Botella M.A., Valpuesta V., Schwab W. (2009) *The strawberry fruit Fra a 1 allergen functions in flavonoid biosynthesis* Mol Plant. 3(1):113-24.

Nitta Futsuki, Iduhara Y., Tsugehara M., Uno T. (2014) *Expression of strawberry allergen Fra a 1 gene during fruit ripening*, Acta horticulturae, 1049 Page:323 – 328.

Rosenthal Gerald A., Berenbaum May R. (2012) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*.

Ross J.A. (2000) *Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia?*. Proc Nat. Acad. Sci. USA. 97 (9), s. 4411-3.

Skibola C.F., Smith M.T. (2000) *Potential health impacts of excessive flavonoid intake*, Free Radic Biol Med.;29(3-4):375-83.

Wang Shioy Y., Chen Chi-Tsun, Wang Chien Y. (2009) *The influence of light and maturity on fruit quality and flavonoid content of red raspberries*, Food Chemistry 112 676–684.

WHO, (25 March 2014) *7 million premature deaths annually linked to air pollution*.

Kosztorys

Przedmiot	Środki na poszczególne lata (zł)	
	2016	Razem
1. Bezpośredni koszt, w tym:	63 480	63 480
1/ Wynagrodzenie	24 000	24 000
2/ Sprzęt	5 900	5 900
3/ Inne	33 580	33 580
2. Pośredni koszt	11516	11516
Koszt całkowity (1+2)	74996	74996

Szczegółowe koszty:

Uprawa:

Sadzonki poziomki: 100 x 3,00zł = 300zł
80L torfu: 10zł
Żwir o małej granulacji: 100zł
Pojemniki: 130zł
Piasek sortowany rzeczny 40kg: 30zł
Ziemia ogrodowa 400L: 50zł
Nawóz fosforowo-potasowy Florovit Agro 20L: 160zł
Nawóz azotowo-magnezowy Florovit Agro 5L: 50zł

Sprzet:

Szklarnia z poliwęglanu o powierzchni 6,2 m² z podłogą metalową i szkieletem aluminiowym:
2x1700zł = 3400zł
Agregat prądotwórczy z akcesoriami: 1500zł
Klimatyzator z higrostatem i termostatem: 1000zł
Paliwo do agregatu: 3800zł
Butla 40L CO₂ z instalacją do aplikacji: 550zł

Hodowla gryzoni - koszt całkowity wypożyczenia na 1 miesiąc 30 normic: 9000zł

Procedury laboratoryjne
Spektrometria Mas: 500zł
ELISA kit: 5000zł
HPLC: 6000zł

Wynagrodzenie: 2 x 1000 x 12= 24000

Konferencja: 8000zł(- Plant Biology – Minnesota, USA
- International Conference on Modelling, Monitoring and Management of Air Pollution,
Walencja, Hiszpania)

