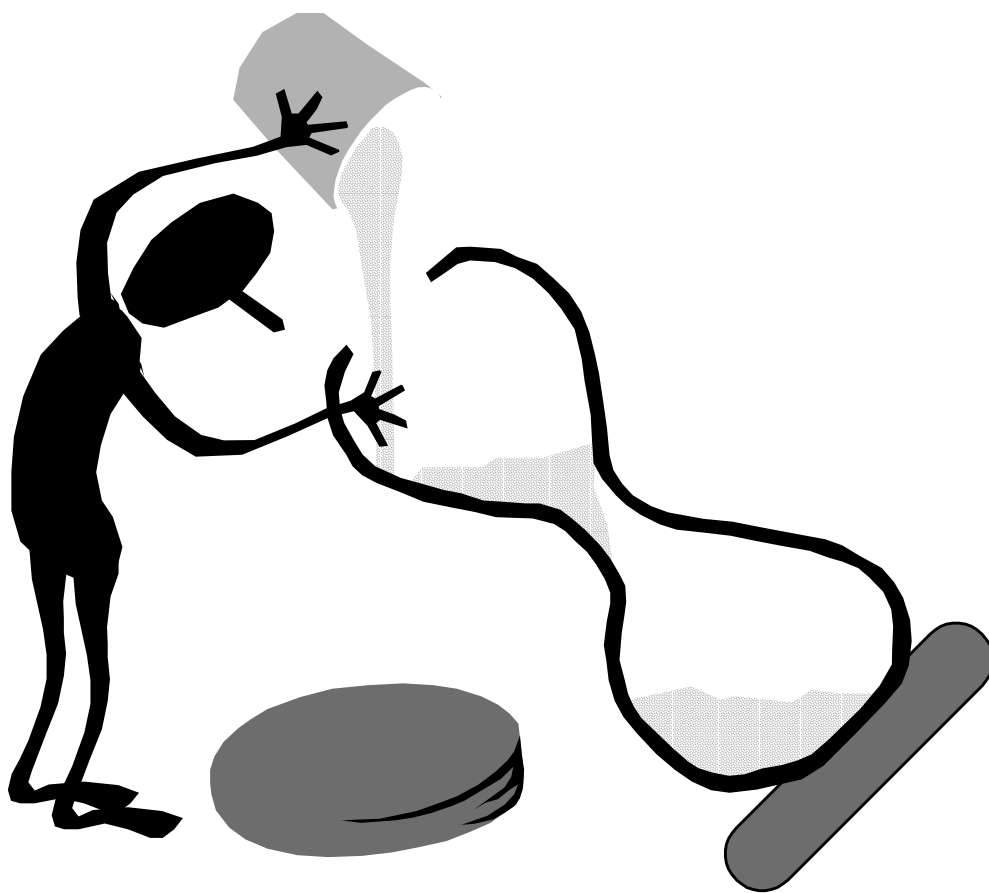


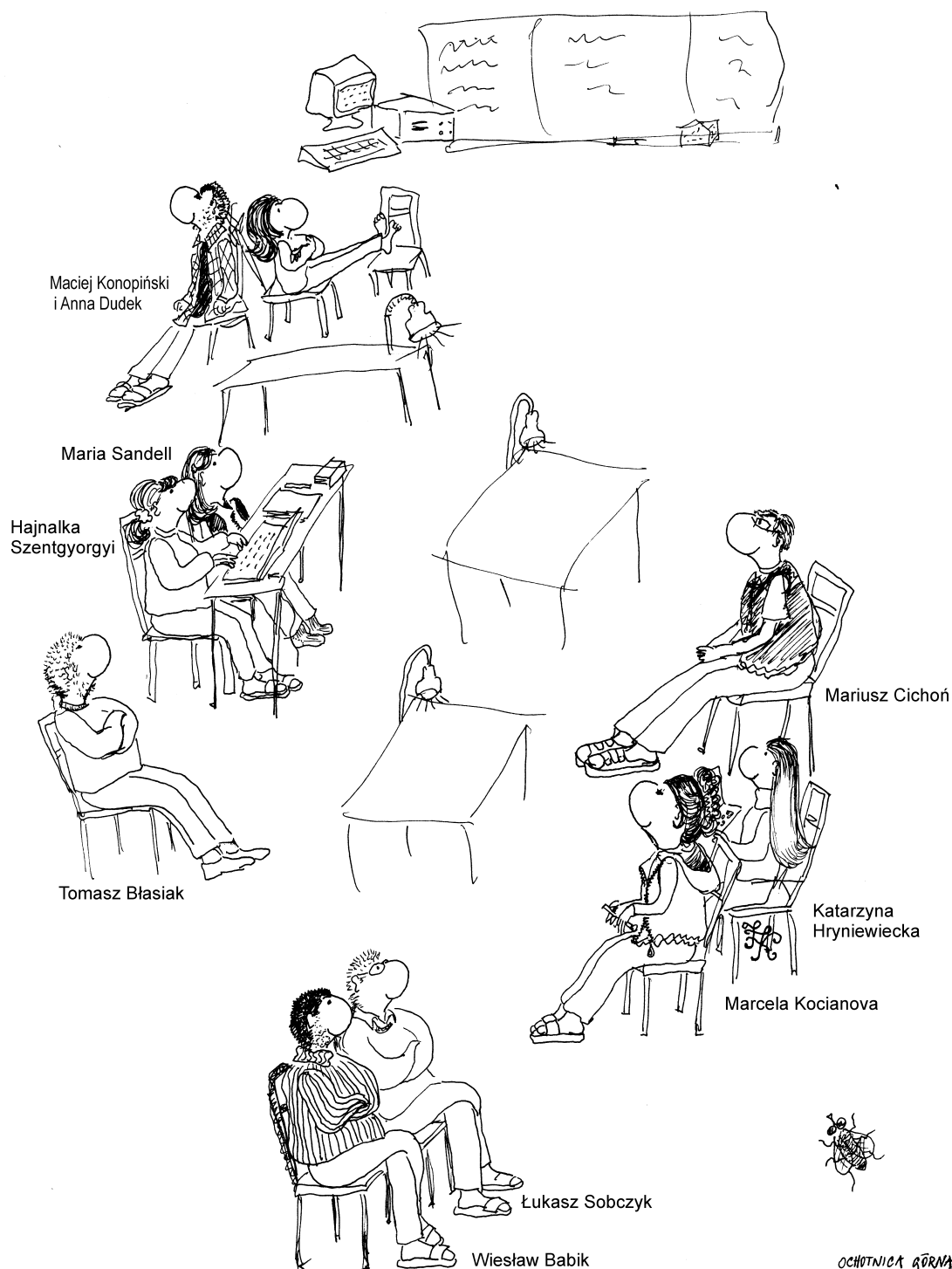
INSTYTUT NAUK O ŚRODOWISKU UJ

WARSZTATY METODYCZNE EKOLOGII EWOLUCYJNEJ



OCHOTNICA 22 – 29 PAŹDZIERNIK 2000

UCZESTNICY TRZECICH WARSZTATÓW METODYCZNYCH EKOLOGII EWOLUCYJNEJ OCHOTNICA 2000



PROWADZĄCY I RECENZENCI PROJEKTÓW

Prof. dr hab. Adam Łomnicki, Zakład Ekologii Populacyjnej, INoŚ UJ, lomnicki@eko.uj.edu.pl
mgr Magdalena Chadzińska, Zakład Immunologii Ewolucyjnej, IZ UJ, chadz@zuk.iz.uj.edu.pl
dr hab. Jan Rafiński, Zakład Anatomii Porównawczej, IZ UJ, rafin@zuk.iz.uj.edu.pl
dr hab. Ryszard Korona, Zakład Ekologii Populacyjnej, INoŚ UJ, korona@eko.uj.edu.pl
dr Kazimierz Walasz, Zakład Zoopsychologii i Etologii Zwierząt, INoŚ, walasz@eko.uj.edu.pl
dr Mariusz Cichoń, Zakład Ekologii Populacyjnej, INoŚ UJ, cichon@eko.uj.edu.pl

Edycja raportu Tomasz Błasiak, blask@zuk.iz.uj.edu.pl

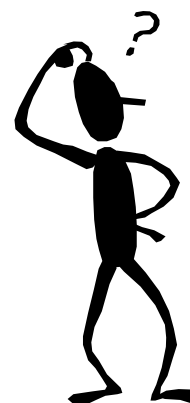
ZASADY ORGANIZACJI WARSZTATÓW

1. Warsztaty są jednymi z zajęć do wyboru dla doktorantów UJ, a każda z dwóch sesji odpowiada 30 godzinom zajęć. Nie ma obowiązku wybierania obu sesji.
2. Warsztaty prowadzone są w dwóch, tygodniowych sesjach. Pierwsza sesja, „jesienna”, poświęcona pisaniu projektów badawczych odbywa się w październiku/listopadzie. Druga sesja, „wiosenna” polegająca na samodzielnym zaprojektowaniu i wykonaniu eksperymentu ma miejsce w kwietniu/maju w Ochotnicy Górnej (Gorce), lub w Krempnej (Beskid Niski).
3. Studium Doktoranckie zapewnia bezpłatne zakwaterowanie w stacji terenowej. Pozostałe koszty (wyżywienie i dojazd) ponoszą uczestnicy Warsztatów.
4. Aby uzyskać zaliczenie i ocenę z kursu doktorant musi aktywnie uczestniczyć w zajęciach, przedstawić propozycję grantu lub przeprowadzić badania i przedstawić ich wyniki.

CEL WARSZTATÓW

Aktywny trening w:

- opracowywaniu projektów badawczych (zgodnie z wymaganiami KBN),
- dyskusja swoich pomysłów,
- przeprowadzaniu badań,
- ustnej i pisemnej prezentacji wyników.



PLAN WARSZTATÓW

- napisanie listy problemów biologicznych interesujących uczestników Warsztatów,
- ustalenie, które z problemów są dobrym materiałem do badań naukowych,
- uformowanie grup 2-3 osobowych,
- sprecyzowanie tematu projektu badawczego,
- przedstawienie swojej propozycji i dyskusja,
- napisanie 5 stronicowego projektu badawczego,
- napisanie recenzji projektu badawczego innej grupy dyskusyjnej,
- dyskusja wszystkich recenzji,
- ustne przedstawienie ostatecznej wersji projektu.

**Zagadnienia poruszane przez uczestników WARSZTATÓW METODYCZNYCH EKOLOGII
EWOLUCYJNEJ OCHOTNICA 2000**

1. Wpływ różnorodności gatunkowej na rozkład materii organicznej.
2. Korzyści ewolucyjne samców z monogamii.
3. Powtarzalność sukcesji ekologicznej.
4. Which species of birds are vulnerable to electric shock on power lines?
5. Survival rate of insectivores and rodents in life traps.
6. Behavioral differences of horse races during feeding.
7. Behavioral differences between small and large horses.
8. Do mothers under stress give birth to more aggressive babies?
9. Does selection of the partner of similar status lead to sympatric speciation?
10. What from a horse knows how good its rider is?
11. Differences in mutation rate between plants and animals as a function of DNA repair mechanism.
12. Variation of leg length of *Rana arvalis* as a phenotypic plasticity.
13. HoxD gene expression in *Latimeria* and lungfish for the formation of feet and palms.
14. Do native bumblebees hybridize with introduced species?
15. Genetic differences between populations of black birds.
16. Is prey choice dependent on age structure and pack size in wolves?
17. Allee effect in *Collembola*.
18. Effect of removal of climax flora of tropical mountain soils on nitrogen balance.
19. Effects of habitat fragmentation on predation rate of low mobility terrestrial birds.
20. Biomethylation rate of mercury as a function of environmental factors in tropical and temperate regions.
21. Human brain under evolutionary pressure in modern times.
22. Brain of our ancestors in modern man.
23. Why blond hairs are sexually more attractive?
24. Survival strategies of penguins in global warming.
25. Do flies have poor memory or they exhibit inherited behavior?
26. How do ducks compete in urban areas?
27. Difference in heavy metals accumulation in different varieties of corn.
28. Products made of white lupin as a popular food.
29. The influence of blue light on the color of leaves of *Tradescantia*.



KIKSY

- ☺ „No, chłopaki, pokażcie te ptaki!” (Marcela do Wieśka i Łukasza)
- ☺ „So, what is the subject of our study? The latest one.” (Maciek w trakcie prezentacji n-tej wersji projektu.)
- ☺ „Dlaczego ptaki giną na drutach? – Bo kopie je prąd.” (Maciek)
- ☺ „So cows need breast to give milk?!” (zdziwienie Mariusza)
- ☺ „Pan Profesor przyjeżdża tylko na 1 dzień?” (Łukasz, z nadzieją w głosie)
- ☺ „Przesunę Polskę bo tu ją potrzebuję...” (Wiesiek w trakcie tworzenia mapy Europy)
- ☺ „Za chwilę będziesz żałował, że się go zapytałeś...” (Maciek po pytaniu Tomka o „Bootstrap”)
- ☺ „Ludzie zanim zdecydują się pobrać powinni napisać wspólny projekt.” (Maciek)
- ☺ „Gdzie jest Hajnalka? – Poszła szukać mnicha...” (rozmowa Marceli z Mariuszem w Czerwonym Klasztorze)
- ☺ „Jak porównać statystycznie dwie liczby, które składają się z innych liczb?!” (Wiesiek)
- ☺ „W takim lesie tropikalnym to nawet jaja, gdy mają za dużo słońca, to po ptokach.”(Ania)
- ☺ „O ile ja rozumiem idee wiosennych warsztatów, to trzeba napisać ten projekt i potem od razu iść w krzaki i go zrealizować.” (Tomek)
- ☺ „Chciałabym zobaczyć twoje zmiany hormonalne!” (Hajnalka do Łukasza)
- ☺ „Słyszałem jak Mariusz Cichoń śpiewa i teraz mogę umrzeć” (Maciek)
- ☺ **“Popatrzcie na mnie, popatrzcie na Łomnickiego, popatrzcie na innych ludzi, którzy do czegoś doszli...” (ostatnie kazanie Mariusza)**



PROJEKT BADAŃ

(wersja pierwsza)

Przepływ genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa (*Turtus merula*) na tle zróżnicowania genetycznego gatunku w Europie



Wiesław Babik, Łukasz Sobczyk

Cel projektu:

Głównym celem naszego projektu jest stwierdzenie, czy istnieją ograniczenia w przepływie genów pomiędzy miejskimi, nie migrującymi populacjami kosa, a odlatującymi na zimę populacjami otaczających je terenów niezurbanizowanych. Nie migrujące populacje kosa pojawiały się w miastach europejskich stopniowo z południowego zachodu na północny wschód, prawdopodobnie w związku z ociepleniem się klimatu. Ewentualne istnienie ograniczenia przepływu genów pomiędzy tymi dwoma typami populacji sugerowałoby możliwość szybkiego powstania izolacji rozrodczej będącej wynikiem różnic ekologicznych. Chcemy również odpowiedzieć na pytanie, czy w Europie można wyróżnić dwie genetycznie odmienne grupy populacji kosa: wschodnią i zachodnią. Wskazuje na to istnienie dwu różnych rejonów zimowania (w Płn. Afryce i Azji Mniejszej) będących prawdopodobnie pozostałościami refugium lodowcowych, gdzie grupy te mogły zróżnicować się w allopatrii. Obie hipotezy zmierzamy przetestować badając zmienność DNA mikrosatelitarnego.

Wstęp:

Proces specjacji znajduje się w centrum zainteresowania biologów ewolucyjnych od czasu wydania *On the origin of species...* Darwina (1859). W większości przypadków badania eksperymentalne nad mechanizmami lub bezpośrednio obserwacje tego procesu nie są jednak możliwe z powodu jego długotrwałości. Tym bardziej cenne dla badaczy są stosunkowo rzadkie przypadki kiedy specjacja zachodzi szybko w ewolucyjnej skali czasu. Najszerzej znanym przykładem są "roje gatunków" pielęgnic z Wielkich Jezior Afrykańskich (Steinhausen 1999). Przypuszcza się, że gatunki te powstały sympatrycznie w wyniku zróżnicowanego wykorzystania zasobów środowiska lub działania doboru płciowego. Na taką możliwość wskazują również opublikowane ostatnio modele teoretyczne (Dieckmann i Doebeli, 1999; Kondrashov i Kondrashov, 1999). Jednym z powodów wybrania kosa jako obiektu naszych badań jest to, że dotychczasowe obserwacje populacji kosów z obszarów miejskich i nie zurbanizowanych w Europie sugerują możliwość rozwoju izolacji rozrodczej pomiędzy tymi

populacjami. Ewentualny rozwój takiej izolacji mógłby być związany ze zróżnicowaniem ekologicznym. Populacje miejskie, niemigrujące i przystępujące do rozrodu kilka dni wcześniej niż sąsiadujące populacje z terenów niezurbanizowanych pojawiały się stopniowo w miastach europejskich z południowego zachodu na północny wschód. Pomiedzy tymi dwoma typami kosów stwierdzono również inne różnice behawioralne (Walasz, 1988).

Zasadnicze znaczenie dla ukształtowania współczesnej fauny europejskiej miały zlodowacenia plejstoceny. Spowodowały one podział zasięgów wielu gatunków w wyniku zepchnięcia ich do różnych refugium. Najważniejsze z nich znajdowały się na Płw. Iberyjskim, na Bałkanach, a także na Płw. Apenińskim (Hewitt, 1996, 1999). W warunkach izolacji geograficznej prawdopodobnie gromadziły się pomiędzy nimi różnice genetyczne. Po ustąpieniu lodowca populacje z tych refugium kolonizowały ponownie obszary polodowcowe. Na podstawie badań genetycznych stwierdzono występowanie stref "styku" takich populacji, głównie wśród ssaków i niektórych bezkręgowców w Europie Środkowej i w Skandynawii (Tautz i in., 1998, Hewitt, 1996, 1999). W przeciwieństwie do wymienionych grup ptaki są organizmami o dużo większych możliwościach migracji. Jednak jak dotychczas niewiele jest podobnych badań dotyczących ptaków (Merila i in., 1996). Również struktura genetyczna populacji europejskich kosów nie była dotychczas badana.

Uważa się, że obecne miejsca zimowania europejskich ptaków migrujących są zlokalizowane na obszarach bliskich refugium lodowcowym tych gatunków (M. Cichoń, inf. ustna). Populacje kosa zamieszkujące Europę Zachodnią mają zimowiska w Afryce Pn., natomiast środkowo- i wschodnioeuropejskie zimują w Azji Mniejszej. Spodziewamy się zatem, że te dwie grupy mogą być, przynajmniej do pewnego stopnia, genetycznie różne. W takim przypadku winny być one traktowane jako odrębne jednostki (ang. *Evolutionary Significant Units*) podlegające ochronie (Ryder, 1986).

Ponieważ badania tego typu wymagają zastosowania bardzo czułych i neutralnych markerów genetycznych, zdecydowaliśmy się na użycie loci mikrosatelitarnych, (Tautz, 1989). Sekwencje primerów umożliwiających namnożenie 10 takich loci, zostały opublikowane, a poziom zmienności genetycznej zaobserwowany w tych loci (Deriglassoff i in., 1999), jest odpowiedni dla zastosowania w naszych badaniach.

Szczegółowe hipotezy badawcze i przewidywane wyniki:

1. Populacje miejskie i sąsiadujące z nimi populacje pozamiejskie różnią się genetycznie bardziej niż populacje pozamiejskie z tego samego rejonu.

Spodziewamy się, że testy różnic częstości alleli pomiędzy takimi populacjami wykażą statystycznie istotne różnice, jak również wartość statystyki F odpowiadającej poziomowi

hierarchii miasta-tereny pozamiejskie będą istotnie większe od 0. Sądzymy także, że na drzewach filogenetycznych populacje miejskie i pobliskie populacje pozamiejskie nie będą tworzyć najbardziej zbliżonych do siebie par. Wtedy przepływ genów pomiędzy populacjami miejskimi i pobliskimi pozamiejskimi byłby bardziej ograniczony niż pomiędzy populacjami pozamiejskimi w tym samym rejonie. W przypadku stwierdzenia ograniczeń w przepływie genów wskazane są dalsze badania molekularne przy zastosowaniu mtDNA. Pozwolą one stwierdzić czy bardziej ograniczony jest przepływ genów matczynych czy też ojcowskich. Wskazane byłoby również przeprowadzenie badań ekologicznych nad przyczynami ograniczenia kojarzeń pomiędzy ptakami z obu typów populacji.

2. Populacja jest zróżnicowana genetycznie na dwie grupy odpowiadające różnym miejscom zimowania (Pn. Afryka i Azja Mniejsza).

Hipotezę odrzucimy jeżeli nie będzie związku między stopniem zróżnicowania genetycznym pomiędzy populacjami a ich miejscem zimowania.

Spodziewamy się, że otrzymamy, zarówno na skonstruowanych drzewach filogenetycznych, jak i wyniku skalowania dwuwymiarowego otrzymamy wyraźny podział na dwie grupy populacji - wschodnią i zachodnią.

3. Refugia gatunku znajdowały się na Półwyspie Iberyjskim oraz na Bałkanach lub w bliskim sąsiedztwie tych rejonów; kolonizacja obszarów polodowcowych była związana z redukcją efektywnej liczebności populacji.

Spodziewamy się istotnie większej zmienności genetycznej (mierzonej jako heterozygotyczność i średnia liczba alleli na locus) w populacjach zamieszkujących miejsca bliskie hipotetycznym refugiom.

Metody:

Zamierzamy pobrać próby z dwudziestu populacji rozmieszczonych w pięciu rejonach Europy. Dwa z nich będą obejmowały najbardziej wysunięte na południe miejsca gniazdowania gatunku, prawdopodobnie najbliższe geograficznie postulowanym refugiom: Półwysep Iberyjski oraz pd.-wsch. Bałkany. Pozostałe trzy rejony, tj. Niemcy, Polska, oraz Kraje Nadbałtyckie zostały wybrane jako reprezentujące resztę europejskiego zasięgu badanego gatunku. W każdym z rejonów zostaną pobrane próby z dwu populacji zamieszkujących miasta oddalone od siebie o około 200-300 km oraz z dwu populacji pozamiejskich znajdujących się maksymalnie 30 km od wybranych miast.

Z każdej populacji w okresie lęgowym zmierzamy pobrać od 20 osobników złowionych w sieci ornitologiczne po 20 μ l krwi. Próbkę zostaną umieszczone w alkoholu. Z krwinek

zostanie wyizolowane całkowite DNA metodą fenolowo-chloroformową (Sambrook i in. 1989). Następnie zostaną przeprowadzone reakcje PCR w celu namnożenia 10 loci mikrosatelitarnych. Allele zostaną rozdzielone na żelach poliakrylamidowych i uwidocznione metodą srebrną (Argentos i in., 1992). Wielkość alleli (mierzona liczbą par zasad) zostanie określona przez każdorazowe porównanie ze standardową "drabiną" wielkości DNA. Dla każdej populacji zostaną obliczone częstości alleli. Otrzymane częstości zostaną porównane z częstościami oczekiwanymi dla równowagi Hardy-Weinberga za pomocą testów G z późniejszą sekwencyjną poprawką Bonferroniego. Ewentualne odstępstwa od równowagi mogą świadczyć o występowaniu alleli zerowych (ang. *null alleles*), o nielosowych kojarzeniach w obrębie populacji lub też o działaniu doboru naturalnego na geny sprzężone z danym locus. Obliczone zostaną również standardowe miary zmienności genetycznej, liczba alleli na locus i średnia heterozygotyczność. Przetestujemy też różnice w częstościach alleli pomiędzy populacjami za pomocą testów permutacyjnych. Następnie obliczymy odległości genetyczne pomiędzy populacjami (Nei, 1978, Zhivotovsky, 1999). Z macierzy częstości alleli oraz z macierzy odległości genetycznych zostaną skonstruowane kilkoma metodami drzewa filogenetyczne (Swofford i in., 1996); wiarygodność otrzymanych topologii zostanie oceniona techniką bootstrap. Te same macierze odległości genetycznych zostaną wykorzystane do przedstawienia związków pomiędzy populacjami na płaszczyźnie metodą niemetrycznego skalowania dwuwymiarowego. W odróżnieniu od metod konstrukcji drzew filogenetycznych skalowanie nie narzuca *a priori* hierarchicznej struktury danych.

Hierarchiczna analiza statystyk F (Wright 1978) zostanie zastosowana do oceny stopnia zróżnicowania genetycznego populacji na różnych poziomach hierarchii. Za najwyższy stopień hierarchii zostanie uznany podział na dwa obszary geograficzne w zależności od miejsca zimowania, kolejnym poziomem będzie podział na rejony w obrębie obu obszarów (patrz wyżej), następnym stopniem będzie podział na populacje miejskie i pozamiejskie, zaś najniższy stopień hierarchii stanowić będą poszczególne populacje.

Z wartości statystyk F można wnioskować o istotności zróżnicowania genetycznego na poszczególnych poziomach hierarchii, a więc również o wielkości przepływu genów na tych poziomach. Istotność statystyczną statystyk F zostanie sprawdzona metodą bootstrap.

Materialy:

Thermocycler, aparat do poliakrylamidowych żeli do sekwencjonowania, zasilacz prądu stałego 3000 V, komputer + skaner umożliwiający skanowanie materiałów przezroczystych, pipety automatyczne, lodówka, zamrażarka, eppendorfy, odczynniki do reakcji PCR, odczynniki do izolacji DNA, akrylamid i bis-akrylamid, odczynniki do wybarwiania DNA metodą srebrną,

oprogramowanie do analiz genetyczno-populacyjnych i filogenetycznych: PAUP* (pozostałe oprogramowanie darmowe, dostępne przez Internet).

Formy rozpowszechniania wyników:

Publikacje w międzynarodowych czasopismach naukowych. Prezentacja wyników na kongresie Europejskiego Towarzystwa Biologii Ewolucyjnej, oraz na krajowych konferencjach naukowych i na Warsztatach Biologii Ewolucyjnej.

Literatura (ma być)

RECENZJE PROJEKTU BADAŃ



①

Adam Łomnicki

Ocena projektu badawczego „Przeływ genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa (*Turdus merula*) na tle zróżnicowania genetycznego gatunku”

W innych okolicznościach odmówił bym recenzji tego projektu. Bo autorzy po jego napisaniu powinni dobrze się przypatrzeć w jakiej jest on formie i nie przysyłać roboczego tekstu na brudno w dużej części na czerwono z podkreśleniami i przekreśleniami poprzedniej wersji. Recenzenta naprawdę, *excusé le mot*, gówno obchodzi, utrudnia mu to tylko czytanie, że na początku ten tekst był gorszy, a potem tacy zdolni autorzy go poprawili. Recenzent chce mieć wersję ostateczną. Nie mogę tego inaczej wytłumaczyć jak tylko tym, że autorzy nie są pewni wersji ostatecznej i chcą abym rozpatrywał obydwie. Ale tego nie zrobię. Do tego literatura, która ma być a jej nie ma, a to kompromituje autorów.

Autorzy zakładają, że kosy żyją albo w miastach albo w lasach, a one żyją także w małych miasteczkach, wioskach, osiedlach i koloniach domów w pobliżu lasu i stwierdzenie, że kosy są odławiano 30 kilometrów od granicy Krakowa nie oznacza, że nie są to kosy miejskie. W zalesionych dolinkach podkrakowskich kos jest równie liczny i spotykany zimą jak w Parku Jordana. Autorzy zapewne bywali w dużych lasach: centrum Puszczy Niepołomickiej, Białowieży i ciekaw jestem czy spotkali tam kosy, a szczególnie czy jest tam tyle kosów aby lekko złowić po 20 osobników. W Ochojnie nie ma pełnej literatury, ale może ktoś jest kto obserwował liczne kosy w Puszczy Niepołomickiej. Czy my wiemy, z których miejsc w Europie kosy migrują do Afryki, a z których do Azji Mniejszej i czy jesteśmy pewni, że w terenach przez nas wybranych występują kosy migrujące w oba te refugia? Czy badanie zróżnicowania wynika z różnych refugium lodowcowych dotyczyć będzie tylko kosów leśnych? A jakie ważne wnioski teoretyczne można z tych badań wyprowadzić?

Autorzy jakoś dziwnie prześlizgują się nad pochodzeniem kosów miejskich. Mogą nic na ten temat nie wiedzieć, ale w omawianym projekcie trzeba to przedyskutować i dać jakieś hipotezy. Czy każda populacja miejska pochodzi od najbliższej leśnej czy też była to grupa osobników migrująca do miast z jednego miejsca, na przykład z Turcji tak jak synogarlica? Hipotezy mogą być bardzo śmiałe, a jedynie relacjonowanie wyników badań musi twardo trzymać się faktów.

A może ten projekt nie powinien mieszać dwóch różnych zjawisk: zróżnicowania geograficznego na kosy wschodnie i zachodnie oraz zróżnicowania między miastami i lasami, a tylko zająć się jedną z tych spraw i porządnie spisać wszystkie możliwe wyniki badań nad zróżnicowaniem genetycznym. Na przykład (1) duża zmienność między miastem a lasem, niewielka zmienność geograficzna, (2) jw. ale miejskie bardziej zróżnicowane, (3) jak 1, ale leśne bardziej zróżnicowane i tak dalej. I co z każdej rozważanej możliwości wynika dla teorii ewolucji, a co dla ochrony przyrody. Myślenie i rozważenie wszelkich możliwości jest na pewno tańsze niż prowadzenie badań i kupowane za dolary odczynniki.

Trzeba dać choćby przybliżone obliczenia ile ludzi potrzebujemy, na jak długo, ile to będzie wszystko kosztować, łącznie z delegacjami do Niemiec i Estonii i biorąc pod uwagę, że w najtańszym hoteliku w Niemczech zapłacimy 200 zł od osoby na dobę. Trzeba by też dodać koszty analiz genetycznych.

Kazimierz Walasz

Ocena projektu "Przeływ genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa (*Turdus merula*) na tle zróżnicowania genetycznego gatunku w Europie"

Przedstawiony projekt jest bardzo interesujący. Wymaga jednak dokładniejszego sprecyzowania samego problemu badawczego. Przedmiotem badań jest gatunek *Turdus merula* (napisano w projekcie *Turtus merula*).

Populacje zurbanizowane zostały opisane z Niemiec i Wielkiej Brytanii. Następnie stwierdzono wkraczanie kosa do miast na zachód i południe od tego centrum, a potem przesuwanie się na wschód, a nie jak podaje się w projekcie, na północny-wschód.. Na dziś nic nie wiadomo, by kosy ze wschodniej Europy, te które mają migrować na południe, a nie na zachód, gniazdowały w miastach czyli wytworzyły populacje zurbanizowane. Inny problem, to zróżnicowanie podgatunkowe, np. kosy z Bałkanów mają należeć do innego podgatunku, podobnie jak i kosy ze wschodu, choć te różnice podgatunkowe są bardzo subtelne i nie ma wyraźnych granic między wyróżnionymi formami.

Wg mnie kosy ze zurbanizowanych populacji z Zach. Europy kolonizują zurbanizowane "wyspy" coraz dalej na wschód, podczas gdy w sąsiadujących z tymi wyspami lasach, nadal gniazdują populacje leśne. Jednak w miarę rozrostu populacji miejskiej, część osobników miejskich zasiedla tereny coraz odleglejsze od centrów zurbanizowanych, wkraczając na tereny pozamiejskie i leśne. Dlatego by zweryfikować pogląd o genetycznym zróżnicowaniu kosów miejskich i leśnych należałoby pobrać próbki z centrów zurbanizowanych, np. parków typowo miejskich i z lasów ale takich, które charakteryzują się małą penetracją przez człowieka, tj. miejsc w których możemy spodziewać się wyraźnych różnic. Gdyż można sobie wyobrazić, że w lasach częściej odwiedzanych przez ludzi, większą szansę na zasiedlenie, będą miały osobniki o cechach "miejskich" i w razie konkurencji, kosy miejskie, potrafiące szybciej zaadaptować się do bliskiej obecności człowieka, wyeliminują osobniki o cechach "leśnych".

Należy spodziewać się, największego zróżnicowania między osobnikami pochodzącymi z populacji o odrębnych zimowiskach. Natomiast zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi populacjami miejskimi w całej Europie powinno być mniejsze niż pomiędzy tak samo rozmieszczonymi populacjami leśnymi.

Jest bardzo prawdopodobne, choć nikt tego nie badał, że lasy Europy Zachodniej, mogą obecnie zasiedlać osobniki o miejskim pochodzeniu. Są to ptaki bardziej plastyczne, o większych możliwościach uczenia się. Nadwyżka kosów miejskich mogła skutecznie konkurować z ptakami leśnymi i wyprzeć je z tych terenów. Ten projekt mógłby także dać odpowiedź na to pytanie. W tym świetle interesujące wydaje się określenie stopnia podobieństwa genetycznego między populacjami leśnymi, a miejskimi w Wielkiej Brytanii, Niemczech i Polsce.

Osobiście wydaje mi się, że odłowienie planowanej liczby osobników z 20 populacji będzie bardzo trudne, by powiedzieć nierealne w przypadku populacji leśnych. Typowo leśne populacje żyją w zagęszczeniu 0.5 do 6.0 par/ 10 ha, przy czym najczęściej do 2 p/10 ha. Natomiast w miastach zagęszczenia w parkach wynoszą od 10-20 p/10 ha, a nawet więcej. Bardzo trudno jest odłowić kosy na rozległych terytoriach leśnych. Jeśli by samemu podejmować odłowy, to okaże się, że przynajmniej jeden sezon lęgowy autorzy projektu będą musieli poświęcić na przezwycięzenie trudności z odłowem kosów w lasach. Najlepiej byłoby zatrudnić do tego celu osoby, które mają doświadczenie w tego typu odłowach. Łatwiej byłoby pobierać jaja lub pobierać krew piskląt w gniazdach.

③

Ryszard Korona

Recenzja projektu badawczego: „Przeptyw genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa (*Turtus merula*) na tle zróżnicowania genetycznego gatunku w Europie”, autorstwa Wiesława Babika i Łukasza Sobczyka.

Projekt dotyczy ciekawego i ważnego zagadnienia izolacji genetycznej w populacjach kosa z możliwymi konsekwencjami dla badań mechanizmów specjacji. Mocną stroną jest wstęp będący bardzo dobrym ogólnym wprowadzeniem zagadnienia i dobrym uzasadnieniem celowości podjęcia badań. Nieco gorzej opisano same populacje kosa. Czy badania Walasza (1988) są jedynym aktualnym źródłem wiedzy, czy są dane o wielkości populacji miejskich i pozamiejskich (choćby względem siebie), na ile kosy są przywiązane do jednej z tych grup, jakie może być tempo kojarzeń poza parą, itd.

Wybór markerów genetycznych nie jest dostatecznie uzasadniony. Dla jakich organizmów je znaleziono, na ile mogą być uniwersalne, u jakich gatunków je zastosowano, jaki był poziom wykrytej zmienności genetycznej? Mogą to być kluczowe pytania dla poprawnego wyznaczenia wielkości prób. Uzasadnienia wielkości prób nie ma. Trzeba podać argumenty (porównawcze z innych badań i być może statystyczne), że taka wielkość wystarczy.

Podane hipotezy są w zasadzie dobre. Nie do końca rozumiem logikę trzeciej z nich. Czy zakłada się, że kosy z południa Europy nie migrują do byłych refugiumów i dlatego nie stykają się z kosami północnymi, czy owszem wędrują ale poszczególne populacje nie zmieniają miejsc lęgowych? Ich większa zmienność miałaby być pozostałością historyczną, jak rozumiem.

Autorzy wydają się być dobrze przygotowani do analizy statystycznej i filogenetycznej, a jeśli jeszcze czegoś nie wiedzą, to wzbudzają zaufanie, że się będą w stanie nauczyć. W obecnej formie, jednak, opis przyszłych analiz jest mało czytelny. Radziłbym bardziej przejrzyste pogrupowanie metod na etapy analiz (być może w formie wyróżnionych punktów), z krótkim opisem celu i uzasadnieniem wyboru technik.

Ogólnie oceniam projekt w formie obecnej na prawie bardzo dobry, a to prawie ma szansę zniknąć po dalszej nad nim pracy.

④

Hajnalka Szentgyörgyi

Review of "Przeptyw genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa na tle zróżnicowania genetycznego gatunku w Europie.

Authors: Wiesław Babik and Łukasz Sobczyk

The aim of the authors of this project is to investigate the possible barriers of gene flow between populations of blackbird living in two different habitats: in urban area and in non-urban area. According to some studies blackbirds living in cities are not likely to migrate to south for the winter, while the population living in non-urban are migrating generally to two regions: North Africa and Asia Minor. Authors suggest that these twogroups can be genetically different dividing them into western and eastern population of blackbird. Suggestng also that the animals living in different habitats are probably limited in their gene flow. Both hypothesis will be tested using the analysis of DNA microsatelite variation.

The authors show a widespread knowledge of the topic, citations cover both recent and earlier studies conducted on different species.

Suggesting that populations of birds (highly mobile animals) stays divided genetically because of two different wintering region is highly not significant. Especially if there is no preliminary studies conducted on these groups and their migratory behavior.

Were there any studies conducted on urban and non-urban populations to exclude the possibility of mixing between the two groups?

There is no sense in using such expensive methods (DNA microsatellites), if there is a cheaper one (capture, mark and recapture).

p.3 point 3. It is not clear how much hypothetical or not hypothetical is species refuge in this case.

The project is interesting, but before conducting such an experiment at least preliminary studies of the species should be done.

⑤

Katarzyna Hryniewiecka

Recenzja projektu pt „Przepływ genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa (*Turdus merula*) na tle zróżnicowania genetycznego gatunku w Europie

Przedstawiony projekt ma na celu stwierdzenie, czy istnieją różnice między grupami kosów występujących w Europie, związane z pochodzeniem z różnych refugium polodowcowych i wynikającą z tego czasową izolacją geograficzną. Ponadto Autorzy poszukują odpowiedzi, czy kosa żyjąca w terenach zurbanizowanych, zimująca na miejscu, również różni się genetycznie od tych, które zamieszkują tereny niezurbanizowane.

Ogólnie cel projektu i wstęp są niezwykle enigmatyczne i dopiero lektura dalszych części nieco rozjaśnia o co chodzi w tym projekcie.

W związku z wstępem powyższej pracy uważam, że skoro kosa żyjąca w mieście i w lasach zachowują się do tego stopnia odmiennie, że jedne odlatują na zimę, a inne nie, to moim zdaniem jest to związane z zasiedleniem środowisk o odmiennych warunkach, a nie z czynnikiem genetycznym. Gdyby te stosunkowo małe populacje były rzeczywiście tak izolowane, to doszłoby do ujawnienia m. in. genów letalnych, podczas gdy tymczasem Autorzy nie piszą nic o zmniejszaniu się populacji kosów miejskich, bo pewnie one jako niemigrujące stanowiłyby bardziej hermetyczną populację.

Do części założeń dotyczących różnic pomiędzy terenami migracji tych ptaków a filogenezą i różnicami genetycznymi nie mam zastrzeżeń.

Nie jest wyjaśnione, (str. 2) czy chodzi o wprowadzenie zmian do systematyki kosów, tj o wydzielenie podjednostek systematycznych na podstawie badań genetycznych, czy o objęcie kosów ochroną gatunkową, tylko na jakiej podstawie ?

Nazwa „pielęgnice” powinna mieć podaną obok nazwę łacińską.

Punkt pierwszy części dotyczącej hipotez badawczych jest napisany tak nieskładnie, że nic nie można zrozumieć. Pierwsze zdanie zamiast coś wyjaśniać, tylko wprowadza zamęt, to sprawia wrażenie, jakby Autorzy się sami powtarzali. Dopiero dalsza część pracy wyjaśnia, o co naprawdę chodzi. Także w tej części występuje tajemnicze stwierdzenie: „przeprowadzenie badań ekologicznych”. To znaczy konkretnie jakich?

Skróty pojawiające się po raz pierwszy należy wyjaśniać (mt DNA), a w innych przypadkach, np. Płw., są one niedopuszczalne.

W metodyce warto było by napisać, co to jest technika bootstrap lub/i zacytować jakąś książkę, w której recenzent mógłby sobie to sprawdzić.

Podoba mi się, że Autorzy planują rozpowszechnianie wyników powyższych badań, ale mogliby napisać więcej konkretów.

Autorzy nie wysilili się, żeby pozbierać i spisać cytowane pozycje literatury.

Jak mawia profesor Łomnicki: „Projekt powinien być nie tylko zwięzły i wyjaśniający wszystko, ale także pisany ładną polszczyzną, aby recenzent mógł go bez bólu czytać”. W powyższym projekcie jest zbyt dużo pojęć i terminów specjalistycznych oraz wiele skrótów myślowych. Projekt to nie krzyżówka, żeby recenzent musiał cokolwiek zgadywać.

Projekt oceniam jako bardzo dobry i wart realizacji, ale wstrzymam się z przyznaniem grantu do czasu, aż Autorzy włożą nieco więcej serca w napisanie projektu i pomyślą, jak skutecznie przekonać recenzenta, że projekt wart jest realizacji.

⑥

Maciej Konopiński

Ocena projektu badawczego „Przeływ genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa (*Turdus merula*) na tle zróżnicowania genetycznego gatunku w Europie”

Oceniany projekt porusza problem zróżnicowania genetycznego europejskiej populacji kosa. Istnieją spore różnice behawioralne pomiędzy osobnikami rozmnażającymi się w miastach i tymi rozmnażającymi się w lesie. Autorzy podejrzewają, iż poprzez ograniczenie przepływu genów to zróżnicowanie znajdzie odbicie w strukturze genetycznej populacji. Miałyby to według autorów doprowadzić do stopniowego podziału tych gatunków na dwa niezależne taksony. Dodatkowo autorzy spodziewają się znaleźć rodzaj wzoru zmienności związany z podziałem populacji europejskiej na dwie subpopulacje zimujące w dwóch odległych rejonach jako konsekwencji zróżnicowania powstałego w refugiach glacialnych.

Tematyka pracy jest bardzo ciekawa. Autorzy dobrze orientują się w dotychczas zgromadzonej na ten temat literaturze, a ich przypuszczenie o występowaniu behawioralnej bariery rozrodowej wydaje się być uzasadnione. Wykrycie takiego zjawiska miałyby donieść znaczenie dla rozwoju „conservation genetics”.

Hipotezy pierwsza i druga są dobrze sformułowane lecz niektóre założenia przyjęte przez autorów wydają się być nie uzasadnione lub sprawiają, że przyjęte techniki nie dadzą oczekiwanych rezultatów. Jeśli istotnie istnieje przepływ genów pomiędzy tymi populacjami można się spodziewać, że różnice w heterozygotyczności pomiędzy populacjami synantropijną i dziką będą znikome. Wówczas znacznie lepszą cechą do budowania drzew filogenetycznych byłaby sekwencja loci podlegających mutacjom punktowym. Abstrahując od problemów wynikających z przepływu genów, niesposób jest go badać nie znając wyjściowego składu genetycznego populacji. W drugiej hipotezie autorzy nie uwzględniają podstawowego założenia eksperymentu, czyli zróżnicowania na populację miejską i pozamiejską. Ma ona jednak sens pod warunkiem zawężenia badań do populacji pozamiejskiej. Sporo do życzenia pozostawia trzecia hipoteza. Ponieważ badania będą odbywały się głównie w Europie środkowej i południowej, czyli stosunkowo blisko refugiów lodowcowych tego gatunku (północna granica występowania kosa sięga północnych krańców Europy) i biorąc pod uwagę mobilność ptaków nie sądzę żeby udało się znaleźć jakikolwiek gradient zmienności. Mała liczebność prób będzie dużym problemem przy testowaniu zgodności rozkładu genotypów z prawem Hardy’ego-Weinberga.

Niestety ze względu na wyżej wymienione błędy nie mogę poprzeć finansowania tego projektu. Zachęcałbym jednak autorów do przeredagowania wniosku i złożenia go na kolejną sesję KBN.

Marcela Kocyanova

Recenzja projektu W. Babika i Ł. Sobczyka: Przepływ genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa (*Turdus merula*) na tle zróżnicowania genetycznego gatunku w Europie

Autorzy postawili sobie za cel stwierdzenie, czy istnieją ograniczenia w przepływie genów pomiędzy miejskimi, niemigrującymi populacjami kosa, a odlatującymi na zimę populacjami otaczających je terenów niezurbanizowanych. Przypuszczają, że w Europie można wyróżnić dwie genetycznie odmienne grupy populacji kosa - wschodnią i zachodnią, na podstawie tego, że istnieją dwa różne rejony zimowania, będące prawdopodobnie śladem refugium lodowcowych. Obie hipotezy autorzy planują przetestować badając zmienność DNA mikrosatelitarne.

Autorzy wybrali sobie bardzo interesujący temat, jest widoczne, że się orientują w problematyce, ale uważam, że projekt jest napisany nieco chaotycznie, niespójny, jakby mieli za mało czasu na napisanie projektu.

Do pracy Autorów mam kilka pytań i uwag:

1. Istotny błąd w nazwie łacińskiej w tytule, zamiast *Turtus* powinno być *Turdus*, ale mam nadzieję, że to tylko „literówka”
 2. Jeżeli pisze się nazwę rodzaju, to nie pisze się obok niej łacińskiej nazwy gatunku, tylko „*species*”
 3. Najpierw powinien być przedstawiony wstęp, a w nim postawione cele, lub cele umieszczone po wstępie
 4. W tekście tam, gdzie podana jest nazwa „kos”, nigdzie nie jest podana nazwa łacińska
 5. Cytacje nie są jednolite w sposobie napisania
 6. Na str. 2, wers 10: „W warunkach...” nie jest jasne, czy to jest cytat, czy uwaga autora
 7. Str. 2, wers 15: Skoro mało jest podobnych badań, to po co przytaczać tu jakichś autorów
 8. Na jakiej podstawie miały by kosi być chronione, bo podział ich populacji na podjednostki systematyczne nie wydaje się być wystarczającym powodem
 9. Pierwszy wers w „Hipotezie 1” jest całkiem niezrozumiały, a wers 3: co mają znaczyć: „różnice między takimi populacjami”
 10. „Badania ekologiczne” w ostatnim wersie hipotezy 1 brzmi zbyt tajemniczo
 11. W hipotezie 2 ostatnie zdanie jest źle sformułowane
 12. Autorzy powinni napisać konkretne tytuły czasopism, w których będą publikować wyniki badań, oraz brak jest spisu podanej w tekście literatury
- Po poprawieniu projektu można będzie przyznać grant na badania na powyższy temat.

PROJEKT BADAŃ

(wersja pierwsza)



Can forest fragmentation lead to extinction of low mobility birds?

- case of *Dendrocolaptes picumnus*.

Anna Dudek i Maciej Konopiński

Introduction

Unsustainable management of the tropical forests has led to severe losses in the amount of tropical forests (about 40% of the previous forest cover). Such decrease in the amount of forest habitats has been reported to trigger biodiversity loss of tropical species such as rare endemic species and highly specialised species. Present state of the knowledge suggests that low mobility birds are extremely susceptible to negative consequences of fragmentation due to changes in biotic (e.g. increase of predation rate, loss of habitat critical size) and abiotic (e.g. insulation, water availability) factors of the environment. Furthermore, due to genetic drift and inbreeding the population decline and decrease of migration rate result in genetic depauperation which can affect the population fitness and finally lead to extinction (Frankham, 1995).

The subject of this research is to study an effect of habitat fragmentation on vulnerability to extinction of *Dendrocolaptes picumnus*. We will try to find out whether population size and genetic variability is related to patch size in fragmented tropical forest.

Methods

Dendrocolaptes picumnus (woodpecker) belongs to the family of Dendrocolaptidae (Dzięcioł, 1985). It is the low mobility, food specialised species restricted to lowland forest habitats. It has very low ability to pass deforested areas and in open spaces it is highly vulnerable to predators. In this case even little gaps are strong barriers for dispersal in this species. In an unchanged forest the species has even distribution and the average population density ranges from 96 to 148 individuals on square kilometre with average of 103 individuals.

Research will be performed in the tropical lowland rainforest in the northern part of Bolivia, South America, in the National Park and Area of Natural Management „Amoro”, province Rurenabaque. The forest is a climax forest which is managed as a part of the project „Towards needs of sustainable forestry” financed by the Dutch governmental organisation ALOEFE. In 1993 as the effect of human activities the pristine forest has been fragmented in several patches of different size (Ktośtam, 1997). Succession in deforested areas is very slow and therefore creating strong barrier for individuals migration. Ktośtam (1990, 1997) reported the occurrence of this species in study area both before and after the exploitation of the forest.

The study area will consist of 20 patches of size ranging from 0,1 to 1,5 km². The number of individuals occupying given patch will be counted by capture-mark-recapture method. Birds will be caught in ornithological nets and ringed. In small patches where extremely low densities are expected we will try to catch all individuals. After two days the population will be surveyed by means of binoculars and direct observations for proportion of ringed birds.

Genetic Analyses

Blood samples will be taken from caught birds. The samples will be transported dried on filter paper. Analyses will be performed in the Conservation Genetics Laboratory of the Institute of Nature Conservation in Krakow, Poland. Following the extraction with use of commercial kit

(BioRad) the DNA will be amplified using PCR technique. We will analyse two kinds of polymorphism:

- microsatellite length polymorphism - 10 loci,
- sequence polymorphism HV-2 region of D-loop in mitochondrial DNA.

Microsatellites will be separated on 6% denaturing polyacrylamide gel and stained with silver. Then the images of electrophoresis will be scanned and stored in computer. Mitochondrial DNA sequences will be analysed using 310 ABI Prism Genetic Analyser.

Data analysis

In order to test the correlation between the patch size and population size and genetic variation we are going to use the Spearman rank order correlation coefficient. We will investigate the relation of population size, heterozygosity in each of microsatellite loci and number of haplotypes in mitochondrial DNA to the patch size.

Predictions

In studied populations we expect to find following patterns:

1. Population size increases with patch size.
2. The probability of extinction is higher in smaller patches therefore some proportion of the smallest patches lacks the woodpeckers.
3. Because of the genetic drift the genetic variability decreases with decreasing patch size.
4. Both microsatellites and control region are hypervariable regions of genom, therefore, we expect to find some level of variation in most populations except of those that were subjected to severe bottleneck.

Practical meaning

The tropical rainforest is very fragile ecosystem type with complex relations between elements of trophic chain. Biological control mechanisms control energy transport in the trophic chain and shape population size through control of population explosions. However, it is difficult to follow all the relationships among species occurring in this kind of forest we are able to point out key-stone species that are crucial for functioning of the system.

Dendrocolaptes picumnus is extremely important species as it is foraging on several species of tree pests and it is important component of diet of small predators. Removal of this species from a trophic chain will have severe consequences for the predators that have diet attached to it, as well as tree pest populations controlled by *D. picumnus*. Therefore protection of this species is not only important for conservation reasons but it is of crucial importance for the forest industry to maintain health of their forests.

Furthermore, results obtained during this project will provide scientific basis for improvement of logging methods. Current logging strategies developed to reach goal of sustainable development include selective logging and logging in patches to maintain partial habitat and prevent biodiversity loss. Although those methods provide better alternative to the traditional logging techniques they do not take into account individual needs of species.

This study will establish a critical habitat size of *D. picumnus* necessary for maintenance of the viable population

As the result of this research strategy of conservation of this species will be established. Experiences gained will be used to work out guidelines for forthcoming projects on other species crucial to existence of tropical rainforest.

Additionally, tropical regions have a global economic meaning for an obvious reason of biodiversity and genetic resources and their future potential to cure diseases and support biochemical industry.

Eventually, it is worth protecting this species as it has great aesthetic and cognitive value.

Presentation of results

Results obtained in this project are novel to science and we expect to meet large interest from ecological and conservation journals. We expect to publish at least two papers in reviewed journals (e.g. Conservation Biology, Molecular Ecology). Results will also contribute to the project of sustainable use of tropical regions.

References

Dzięciół, T. 1985. Ecology of tropical woodpeckers of Southern America. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London

Frankham, R 1995. Conservation genetics. *Annu. Rev Genetics* 29:305-327.

Ktośćm, A. 1990. Low Mobile Avifauna of the Province Rurenabaque. Oxford University Press. Oxford

Ktośćm, A. 1997. The influence of intensive forest exploitation on genetic composition of tropical avifauna. *Cons. biol.* 8:1025-1043.

RECENZJE PROJEKTU BADAŃ



①

Adam Łomnicki

Evaluation of the research project: „Can forest fragmentation lead to extinction of low mobility birds? - Case of *Dendocolaptes picumnus*”

Although no limits were set for the places in which research project can be made, it is a pity that the authors have decided to work in South America instead of Poland. The fragmentation of forest is a phenomenon occurring in Gorce Mountains too, and one can find there woodpeckers who are subject of heavy mortality outside the forest. By placing their studies in Gorce or in some areas in Central Europe they will have better data on woodpecker density and on the age of fragmented forest patches. For example, knowing high diversity of tropical species of birds one can hardly believe that this one exhibits high density of about 100 individuals per square kilometer.

The aim of the studies should be stated at the beginning and I gather this aim is mainly practical, not theoretical. The authors put forward some prediction which can be considered as hypotheses, but they do not give reasons for proposing this and not other alternatives. For example habitat fragmentation increase the area of ecotone habitats and it is known that population density in such ecotone habitats is higher than within a more homogeneous one. If woodpeckers in tropics do not show this effect, it should be clearly stated and explained why. It is a pity that when considering habitat fragmentation the authors ignore the theory of island biogeography and when proposing the study of genetic drift, they do not cite any publications concerning this phenomenon. Textbooks describing the theory island biogeography and genetic drift are available in Ochotnica. The knowledge of this theory should make authors to discuss to important aspects of their studies: distances between patches and their age. Taking into account inability of authors to discuss these two important aspects of their project, their application of nonexistent references is neither funny nor reasonable.

The weakest part of this project is calculation of the number of researchers and time required for completing the field studies of this project. Assuming data on woodpecker density given by the authors, we can expect one individual per hectare. How to catch this individual in net: at its nest or placing nets randomly? This was not stated clearly in the project. How many persons for how many hours should on the average work in the field per each individual caught? Is marking recapture method the best for individuals which are not very mobile and stay at their territories? If a patch has on average 0.5 km then we have 1000 woodpeckers there. Do you want to catch 500 or 200 or less? How large is the area of 20 patches and how will you move between patches? When will you sleep and eat in the tropical forest? Is there a field station? What is the price of air ticket to South America for the group of people who are going to work there? What are the expenses there and expenses of DNA sequencing in Poland. In Ochotnica you may have no information on it but you have to assume some realistic expenses. When writing a research proposal you are no longer a technician, on the bottom of the scientific hierarchy, who is going to take blood samples only but a person responsible for the calculation of expenses and estimation of the values of the predicted results.

I understand that these studies are mainly of applied importance. However your descriptions of the way the forest should be managed to maintain woodpecker population is very general and vague. What are alternative outcome of your predictions (alternative hypotheses) and how it may change the management of the forest? Are all analyses of the genetic variation really necessary for the aims assumed. What are the results of these studies, which may change our

understanding of population dynamics and genetic structure of populations in fragmented habitats?

There are many points in this project, which should be improved before it is accepted.

②

Jan Rafiński

Recenzja projektu A. Dudek i M. Konopinskiego ‘Can forest fragmentation lead to extinction of low mobility birds? – Case of *Dendrocolaptes picumnus*’.

1. Tytuł stanowczo przesadzony, projektowane badania w zadnej mierze nie mogą odpowiedzieć na tak postawione pytanie.

2. Zbyt ogólnikowo przedstawione cele badań (1 zdanie!). Nie uzasadniono wyboru gatunku i miejsca badań (jest w części METHODS), ale powinno się znaleźć już we wstępie.

3. W omówieniu metod nie podano jak i w jakiej ilości będzie pobierana krew (to ważne w przypadku gatunku, o istnienie którego się martwimy). Nie podano czy dla badanego gatunku istnieją dane o sekwencjach DNA, które pozwolą przeprowadzić planowane badania (np. dane mikrosatelitarne są najczęściej gatunkowo-specyficzne), czy też trzeba będzie prowadzić wstępne badania sekwencyjne, to by zmieniło istotnie zakres badań, wymagało znajomości specjalnych technik, itd.

Brak uzasadnienia dlaczego do analizy związku między zmiennymi będzie stosowana korelacja rang Spearmana, a nie inne możliwe testy.

4. Oczekiwania.

Brak badanego gatunku w mniejszych płatach lasu wcale nie musi świadczyć, że tam lokalna populacja wymarła. Czy gatunek jest aż tak mało ruchliwy, że nie może wyemigrować do większych płatów (mало prawdopodobne w przypadku ptaka)?

Jak można wnioskować z projektu las uległ fragmentacji bardzo niedawno. Jeśli tak, to mogło upłynąć zbyt mało czasu, żeby oczekiwać zmian zmienności genetycznej w małych populacjach (po ‘bottleneck’); takie procesy obserwuje się dopiero po wielu pokoleniach, co wiadomo z genetyki populacyjnej (chyba, że redukcja liczebności jest bardzo ostra). Czy można ocenić liczbę pokoleń tego ptaka w stosunku do czasu od fragmentacji środowiska? Czy znana jest migracyjność tego gatunku? Migracje mogą tak skutecznie wyrownać zróżnicowanie genetyczne między subpopulacjami, że żadnego zróżnicowania nie powinniśmy się spodziewać.

Ogólna ocena. Za duże, nierealistyczne oczekiwania, już objawiające się w sformułowaniu tytułu. Watpliwe czy obiekt badań szczęśliwie wybrany: czy są wiadomości o jego ruchliwości i czasie pokolenia tego gatunku? Bez takich elementarnych wiadomości wszelkie interpretacje stopnia zmienności genetycznej i zróżnicowania genetycznego subpopulacji nie będą miały oparcia, i jest bardzo watpliwe czy same (plus wiadomości o wielkości płatów lasu) coś wyjaśnia. Autorzy przekonując do projektu bardziej bazują na uczuciach czytelnika (zagrożenie lasów tropikalnych, etc.) niż przesłankach rozumowych.

Łukasz Sobczyk

Recenzja projektu badawczego: „Can forest fragmentation lead to extinction of low mobility birds? - case of *Dendrocolaptes picumnus*”

Autorzy chcą prawdopodobnie postawić hipotezę, że fragmentacja lasów tropikalnych przyczynia się do spadku zagęszczeni dzięcioła *Dendrocolaptes picumnus* oraz spadku zróżnicowania genetycznego w obrębie jego populacji. Natomiast wielkość tego efektu ma być skorelowana z wielkością fragmentów lasu powstałych w czasie jego eksploatacji przez człowieka.

W rzeczywistości pytają czy istnieje relacja pomiędzy wielkością populacji i zmiennością genetyczną w jej obrębie, a wielkością zamieszkiwanego przez tę populację obszaru co wydaje się jednak oczywiste. Na większych terenach będzie przeważnie więcej osobników niż na mniejszych. Uwaga ta dotyczy również punktu pierwszego w rozdziale "Predictions"

Badania mają być prowadzone na jednym terenie, który zaczął być od niedawna (1993 rok) eksploatowany. Niestety nie ma informacji, jakie było wcześniejsze zagęszczenie dzięcioła na tym terenie. Z projektu można wywnioskować, że wiadomo jedynie, iż gatunek ten na danym terenie występował. Dlaczego autorzy nie wybrali obszaru kontrolnego? Nie wiedzą tym samym nic o naturalnych wahaniami liczebności tego gatunku.

Niejasne jest ostatnie zdanie pierwszego akapitu w rozdziale "Methods". Prawdopodobnie przez przeoczenie użyto dwukrotnie słowa średnia (average), co pozbawia zdanie sensu. Ponadto skąd pochodzą dane dotyczące zagęszczenia.

Metoda opisana w ostatnim zdaniu tego rozdziału nie jest metodą "capture-mark-recapture", którą autorzy zamierzają zastosować.

Na jakiej podstawie autorzy twierdzą że badany gatunek jest gatunkiem zwornikowym.

Skąd optymizm, że na podstawie takich pojedynczych badań będzie można ustalić "critical habitat size".

Przedostatni akapit rozdziału "Practical meaning" nie ma bezpośredniego związku z resztą projektu.

Drobne uwagi formalne:

Nazwy łacińskie piszemy zawsze kursywą.

Dobrze jest ponumerować strony

Podsumowując, projekt w takiej formie nie może zostać zaakceptowany. Testowano by bowiem twierdzenie raczej oczywiste. Skądinąd przypuszczam, że autorom chodziło o coś innego. Główną zatem wadą projektu jest niejasność sformułowania.(Recenzent też ma z tym kłopoty).

④

Marcela Kocyanowa

Recenzja projektu A. Dudek i M. Konopińskiego: „Can forest fragmentation lead to extinction of low mobility birds ? – case of *Dendrocolaptes picumnus*.”

Celem autorów jest zbadanie, czy fragmentacja siedlisk tropikalnego gatunku dzięcioła żyjącego w Boliwii ma wpływ na wielkość populacji w tych fragmentach oraz na zmienność genetyczną populacji. Autorzy zamierzają wykorzystać w swoich badaniach metodę CMR, oraz analizę zmienności mikrosatelitarnego i mitochondrialnego DNA.

Projekt jest napisany chaotycznie. Dla osób nie będących specjalistami w danej dziedzinie jest niezrozumiały.

Do pracy mam kilka pytań i uwag:

1. Nazwa łacińska gatunku powinna być zawsze pisana kursywą i podany w nawiasie autor, który go pierwszy opisał
2. Nazwa rodziny *Dendrocolaptidae* powinna być także napisana kursywą
3. Brak opisu biologii badanego gatunku
4. Skąd Autorzy wzięli podane w metodyce dane o zagęszczeniu (zakres występowania) – brakuje cytacji
5. Dlaczego ponowne obserwacje obrączkowanych ptaków będą prowadzone po 2, a nie po np. 4 dniach? Czy to jest jakaś metoda? Czyja?
6. Przez jaki czas będą prowadzone obserwacje ptaków

⑤

Maria Sandell

Evaluation of *Dendrocolaptes picumnus* project.

This projekt will result in finding the relation between patch sizes, genetic variability and density of *Dendrocolaptes picumnus*.

The losses in amount of tropical forest, threat the viability of many species, especially they who are lowmobility.

The subjekt of Your projekt is of current interest, especially when the chenges in tropical forests are very fast.

The projekt make sense but I miss a clear hypotes and alternativ hypotes. You should also have written something about expekted costs of the prodjekt. There are even some lack of fullnes about how you will manage to catch and count the birds in each patch.

About your predictions I do wonder how you will scientficly will pow that the patches lacking off Dentrocolaptes picumnus are doing this because of patch area and not because of any other reason?

Because of your propotials lack of fullness, I cant give you any help with this projekt when the competition is very high.

But I suggest that you improve your proposal making it more convincing and try again. Your subject is very important and of greatest interest.

⑥

Tomasz Błasiak

Evaluation of the scientific project entitled: „CAN FOREST FRAGMENTATION LEAD TO EXTINCTION OF LOW MOBILITY BIRDS ? - CASE OF *DENDROCOLAPTES PICUMNUS*.”

Authors of the project want to study the effect of forest fragmentation on the population size and its genetic variation in isolated forest fragments. Project is designed to study population of *Dendrocolaptes picumnus*, representative of low mobility birds of tropical lowland rainforest in the northern part of Bolivian, in the National Park and Area of Natural Management „Amoroburo”.

This research is based on solid data already collected and treating about this very particular species living in Bolivian National Park. It seems to be a very good idea to continue this study and recollect the data in changed environment.

Methodological part of this project is quite well designed but with two important restrictions:

1. There should be well defined what should be the smallest distance between studied patches. Regardless of the fact that little gaps are strong barriers for dispersal in this species, one can not be sure about the real exchange of genes between closely neighbouring patches.
2. The goal of this study is to detect differences between genetic variation in population living in patches of different size. Genetic changes will be detected in comparison to data collected by Ktośtam in early nineties. My question is if it is not too early to study genetic variation after only few years of isolation?

The general idea of the project is very good. It would be great loss for the science not to use such an opportunity as this population of *Dendrocolaptes picumnus* having good documentation from past studies. I think that after making it more precise this proposed studies should take place but not earlier than in second half of 21-st century.

⑦

Wiesław Babik

Review of the project: Anna Dudek, Maciej Konopiński: "Can forest fragmentation lead to extinction of low mobility birds? - Case of *Dendrocolaptes picumnus*."

The aim of the presented project is to assess the impact of recent habitat fragmentation on the population size and the genetic variability in a low-mobility tropical forest woodpecker *To*

establish the population size they are going to use capture-mark-recapture methods and to assess genetic variability - mtDNA and microsatellites analysis.

Such problems are of increasing importance nowadays as habitat fragmentation caused by human activity in tropics is a severe threat for many species inhabiting tropical forests.

However, in my opinion, the presented project has several drawbacks.

First of all, population size in smaller patches should be obviously smaller than in larger, but how this observation could be helpful in assessing the effect of fragmentation on the population?

It would be possible if the Authors studied changes in population size in different patches over time. This is also the case with genetic variability. Negative impact of fragmentation would be suggested by the decrease of genetic variability with time in smaller patches, otherwise the differences in genetic variability would simply reflect the differences in "starting conditions".

The statement that the study would establish the conservation strategy for the species is too strong. Rather it can give clues for such an establishment.

Furthermore, the Authors do not explain how they are going to estimate the critical habitat size. Is it possible at all to do it from the data they are going to collect?

I understand that Authors are going to perform several correlation tests. How they intend to control Type I error level?

The sentence: "...succession...[is] creating strong barriers" should be rewritten to clarify its meaning.

What does it mean: "... the average population density ranges... with average...?"

The last sentence on page 2 is not clearly related to the subject and should be removed.

The latin name of the species should be in italic.

There are many typing errors. English also should be considerably improved.

In my opinion the subject of the project is interesting, but the Authors haven't designed their project carefully. It should be corrected and rewritten. Therefore I would not recommend funding it in this version.

PROJEKT BADAŃ

(wersja pierwsza)

Comparative study of delivery methods in humans based on the level of stress hormone in the mother and newborn.



Maria Sandell, Tomasz Błasiak & Hajnalka Szentgyörgyi

Environmental Science Fiction Group™, Jagiellonian University, Kraków

INTRODUCTION

Delivering a child is an enormous stress for both the mother and the baby. During the last forty years alternative methods of delivering a child are emerging and getting more and more common all over the world. Some after-delivery psychological tests conducted on mothers, having babies born, both traditionally in hospital or by one of these alternative ways, suggest, that alternative methods are less stressing for the mother, and according to the mother, also for the baby (see Delaxrois, 2002). To our knowledge no stress level tests were performed on the mothers and/or newborns to compare these methods.

The aim of our study is to compare these different methods of delivery using a blood hormone level test to study stress level before, during and after the delivery process. As it is shown in earlier studies conducted on animals (Microtus and Neomys, 2001) and humans (Sapiens, 2001), the level of adrenalin in the blood can be used as a good indicator of stress in the tested subject. As shown by Fellini (in 2005) the level of adrenalin in human blood in normal conditions differs between individuals. To achieve comparable data, it is necessary to compare, not the actual level, but the changes in the level of these stress hormones for every tested individual. Bigger changes in the level of adrenalin suggest higher stress condition in the tested subject.

We expect that alternative delivery methods can reduce the stress of the mother and the child and this difference can be measured by means of stress hormone levels.

The results should point out the least stressful way of giving birth, and give a chance to develop the optimal method of conducting a delivery process by medical staff.

If no significant stress hormone level differences between the tested groups will be detected, we expect, that psychological tests performed before and after delivery can point out the methods mostly preferred by women and reliable in their long term psychological effect.

MATERIALS AND METHOD

The subjects of this study will be pregnant women and their newborn children. We will restrict our samples to women between the age of 25 to 35 years, healthy from medical point of view, with no complications during pregnancy, having their and second child (but not twin) by one of the tested methods. Birth mass of the tested children should be between 3000-4000 gr., reach at least 7 points on Apgar grade. Subjects will be informed about the project and necessary permissions obtained after the mother decides in what way she would like to deliver the baby. Data will be collected by the members of the European Association of Gynecologists and provided to the laboratory of the Environmental Science Fiction Group at the Jagiellonian University, in Kraków, Poland. Blood samples will be taken and analyzed in situ, by Prince Dracula Two Marks Method (Dracula et al., 1768) for adrenalin level. From preliminary and unpublished data we know that there is no significant correlation between the high androgen level during delivery and the level of adrenalin concentration in the blood, but to clearly exclude eventual influence of androgens, in our case mainly oxytocin, also the concentration of this hormone will be measured. The psychological picture of mothers (individual expectations and

feelings about the method and also the opinion after birth) before and after delivery will be drawn by group of independent psychologists, using the Universal Stress Test Questionnaire, sent to every cooperating gynecologist (see Freak, 2002).

Subjects will be divided into the following experimental groups, consisting of 100 mothers:

1. conventional delivery group (delivery without the father, standard hospital conditions)
2. family delivery group (delivery with the father present, standard hospital conditions)
3. home delivery group (delivery with members of family present, at least a qualified midwife present)
4. water delivery group (delivery in specially prepared pools, at least a qualified midwife present)
5. water delivery group with father (delivery in specially prepared pools, the father and at least a qualified midwife present)

Blood samples from the mothers will be taken two weeks to a month before the expected delivery and at the final stage of delivery process. First blood samples of the child will be taken from the umbilical cord as soon as possible (Nero, 2003), the second blood sample should be taken a day after birth.

Questionnaires will be provided to the cooperating gynecologist and handled to the mothers first, two weeks before the expected delivery and second, two weeks after delivery.

STATISTICAL ANALYSIS

To exclude eventual correlation of androgen level in the organism of the mother, correlation test between the level of oxytocin and adrenalin will be done. If any correlation will be found also influence of this hormone will be taken in account in later analysis. The changes in stress hormone levels in the mothers before and during delivery will be analyzed using ANOVA followed by post-hoc comparison across groups if ANOVA is significant. Similarly the data from the newborn right after birth and in their first day of life will be performed.

Questionnaires will be analyzed and graded according to the changes in stress level of the every tested individual using the Hitchcock Stress Scale (Hitchcock, 2003).

EXPECTED RESULTS

We expect significant differences in the adrenalin concentration changes during delivery process in the blood of the mothers in each experimental group. This would confirm the results of studies conducted on stressed animals. Expected differences in the changes of adrenalin level would confirm our hypothesis, that alternative or at least some alternative methods of delivery can lower the impact of stress on the mother and the newborn.

There is a high probability that no differences will be observed in the level of stress hormone in the newborn child, between tested groups. If any statistical differences will occur, one can assume, that psychological state of the mother can influence the stress level of the child.

On the other hand results showing no biological differences between the tested groups, are not negating the possible psychological effects not measurable by these methods.

In both cases data collected in our study will help to point out the possibly optimal delivery method for women.

EXPECTED COSTS

Equipment:

- Blood Sample Kits – 5000pcs.,
- Office materials,
- BMW motorbike, Volvo X-Country, Ferrari F 40 - for collecting data all over Europe,
- Silicon Graphics Workstation equipped with latest version of STATISTICA – storage and analysis of data,
- Three California Access laptops – for collecting data,

Salaries:

- Travel expenses,
- Payment for Psychologists Commission,
- salaries for the members of Environmental Science Fiction Group involved in the project.



①

Adam Łomnicki

Evaluation of the research project: „Comparative study of delivery methods in humans based on the level of stress hormone in the mother and newborn”

I highly appreciate the sense of humour of the authors and I like very much the name „Environmental Science Fiction Group” but exaggeration spoils everything. I know that there is no possible to obtain necessary references in Ochoznica but it is not good reason to invent citations and to suggest that they will be published in future, so they actually do not exist. What is more: there are no references at the end of the manuscript (titles, journal names, volumes and pages). Without references the project is not complete. The concept of this Workshop is the following: *take it seriously, take it seriously, take it seriously if you can, if for some reasons you cannot take it seriously, take it as seriously as you can.*

I do not know what is the aim of this study. I gather it has no theoretical consequences for human physiology but is made to prevent the stress of mother and possible her child due to traditional delivery in hospitals. But is the level of adrenaline more important than the feeling of women who already have some experience in delivery and can get some information from their female friends? If you choose a dentist you do not ask what is the level of adrenaline of his patients before and after the visit but you ask whether one likes this particular dentist. The pain and stress of delivery will not be removed by studying adrenaline level and by doing this stressing the women even more but by spread of information about the possibility of different delivery methods and by women selecting the method which they consider the best for them.

We biologists should always take into account that human beings are not experimental animals. I cannot imagine such a project to be completed by random division of 100 women to 5 experimental groups, therefore good scientific experiment cannot be done here and it should not be done. The only possibility is that during different types of delivery the gynaecologists will also collect data on adrenaline level as a by-product of their activity. But it will not be a proper scientific experiment since the level of adrenaline and its dynamics may be correlated with the character of a woman which make her to choose this or other type of delivery. Only extensive studies of this correlation may allow to interpret properly the data collected by physician.

Much more precise and both theoretically and practically important may be some studies on mice. Now with human beings, it is not a good project, since it cannot and it should not be done properly for either statistical or ethical reasons.

In any case, the expected costs should be more precisely calculated in zlotys. Even if we do not know the precise cost of travel and equipment we should try to do some estimations. How many people should be employed and for how long?

Magdalena Chadzińska

Recenzja projektu: "COMPARATIVE STUDY OF DELIVERY METHODS IN HUMANS BASED ON THE LEVEL OF STRESS HORMONE IN THE MOTHER AND NEWBORN." Marii Sandell, Tomasza Błasiaka i Hajnalki Szentgyörgyi.

WARTOŚĆ NAUKOWA PROJEKTU

W projekcie brak jest teoretycznego wprowadzenia do tematu, podsumowującego obecny stan wiedzy na temat zmian hormonalnych w trakcie porodu. Inaczej niż twierdzą autorzy wiedza na temat poziomu hormonów stresu podczas porodu jest dość rozległa. Polecam prace przeglądową na temat farmakologii porodu (Roy i Arulkumaran 1991). Znaczny wzrost poziomu adrenaliny i towarzyszący mu wzrost ciśnienia krwi i tempa bicia serca są elementami normalnej fizjologii akcji porodowej u różnych ssaków, w tym też u człowieka (m.in. Hydbring i wsp., 1997 i 1999, Legrand i Maltier 1981). Zarówno adrenalina jak i noradrenalina regulują np. kurczliwość macicy. Biorąc pod uwagę skalę tego wzrostu można się spodziewać, że poczucie komfortu psychicznego (np. obecność lub nieobecność ojca) minimalnie tylko zmienia poziom adrenaliny i zmiany te w praktyce są maskowane przez fizjologiczny wyrzut tego hormonu. Tak więc wzrost poziomu adrenaliny może w tej sytuacji nie być swoisty dla reakcji stresowej. Autorzy nie powinni zapominać, że wyrzut adrenaliny może być wywołany również np. podaniem anestetyków, radością z narodzin dziecka, hipoksją (szczególnie w przypadku noworodka np. Santala i wsp., 1990). Właściwe wydaje się więc równoległe monitorowanie poziomu glikokortykosterydów (kortizolu), z tym zastrzeżeniem, że zmiany endokrynne towarzyszące ciąży i porodowi dotyczą również tego hormonu.

Autorzy słusznie zauważają, że poziom adrenaliny może się niezwykle różnić między osobnikami, ale również reakcja na stres może być różna. Wskazane byłoby więc przeprowadzenie przed porodem testów psychologicznych określających typ osobowości matek, i ich podatność na stres. Cechy te mogą być związane z poziomem wzrostu stężenia adrenaliny i kortizolu w odpowiedzi na stres. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na wyniki badań może być preferencyjny wybór danej metody porodu przez matki o określonym typie osobowości. Na przykład "histeryczki" mogą preferować np. poród rodzinny w basenie w obecności partnera.

Warto też zaznaczyć, że test psychologiczny po stresie porodu może nie być obiektywny, ponieważ udowodniono wpływ wysokiego poziomu oksytocyny i endorfin uwalnianych podczas porodu na stan mentalny kobiety, w tym na proces zapamiętywania wliczając w to nieprzyjemne doświadczenia związane z porodem.

Czy oksytocyna jest naprawdę androgenem?!

METODYKA I DOBÓR LITERATURY

Metodyka opisywana przez autorów jest dość archaiczna (Prince Dracula Two Marks). Gdyby zamiast zakupu Ferrari F 40 zdecydowali się na pojazd mniej ekskluzywny to pozostałe fundusze można by przeznaczyć np. na HPLC, co byłoby z korzyścią dla projektu. Zastosowanie skali Hitchcocka do pomiaru stresu budzi zastrzeżenia, bo z tego co pamiętam w skali tej najniższy poziom stanowi trzęsienie ziemi, a gdyby stres okołoporodowy był mierzalny w tej skali zdziwienie musiałby budzić fakt przetrwania gatunku ludzkiego.

Cytowana literatura dzieli się na dwie grupy, jest albo archaiczna albo jeszcze się nie ukazała (zazdrość recenzenta budzi w tej sytuacji zdolność jasnowidzenia jaką wykazują się autorzy).

PODSUMOWANIE

Zamiast stosowania pseudościślych metod badania natężenia stresu właściwszym przy porównaniu stresogenności różnych metod porodu wydaje się po prostu zapytanie o opinie matek wieloródek rodzących tymi metodami.

③

Anna Dudek

Review of „Comparative study of delivery methods in humans based on the level of stress hormone in the mother and new-born”

The subject of this project is to study consequences of delivery methods for stress levels in mother and new-born. Project concerns different methods of delivery and compares changes in the level of stress hormones between different methods of delivery in the mother and new-born.

Project is written logically and clearly. Results are well presented. There are not large inconsistencies here.

The only „con” that I can find in this moment is high cost of the project and lack of equipment suggesting that authors have no previous experience with this kind of research.

If results of this experiment are going to contribute to children and mother health of whole Europe why it is KBN to pay ?

Why is it necessary too travel in Europe to perform this study?

There are some problems with English (don't start sentences with „to”).

Generally I consider the experiment to be very interesting and important, it might contribute to development of „sane” methods of delivery which has a global meaning for health of human population.

I would do it as an international project and involve EU to pay.

④

Katarzyna Hryniewiecka

Recenzja projektu: „Comparative study of delivery methods in humans based on the level of stress hormone in the mother and newborn.

Celem projektu jest stwierdzenie, jak metoda porodu wpływa na poziom hormonów, których poziom świadczy o tym, że badana osoba jest pod wpływem stresu, i finalnie jaki wpływ ma stres na komfort i zdrowie matki i dziecka. Zespół badawczy zamierza przeprowadzić badania na możliwie jak najbardziej jednolitej grupie matek, zarówno pod względem tego, że będą rodziły po raz pierwszy, jak i podatności na stres określonej za pomocą testów psychologicznych oraz pod względem innych czynników. Na podstawie eksperymentu grupa badawcza zamierza ustalić najbardziej optymalną metodę porodu.

W całej pracy cele i hipotezy są potwierdzone cytatami, choć Autorzy nie zadali sobie trudu, aby tą literaturę zebrać na końcu pracy.

Metodyka i opracowanie statystyczne nie budzi zastrzeżeń.

Projekt eksperymentu jest bardzo interesujący i wart przeprowadzenia, jednak recenzenta odstraszały wysokie koszty. Po pewnych ograniczeniach kosztów grant zostanie przyznany.

⑤

Maciej Konopiński

Opinia o projekcie: „Comparative study of delivery methods in humans based on the level of stress hormone in the mother and newborn”

Autorzy omawianego projektu planują przeprowadzenie szeroko zakrojonych badań na temat wpływu wyboru metody rodzenia na poziom stresu u matki i noworodka. Badania mają być prowadzone w kilku krajach europejskich. W eksperymencie zostaną planuje się użyć dwóch metod określania poziomu stresu: poziomu hormonów matki i niemowlęcia oraz indywidualnych wywiadów z matkami. Autorzy spodziewają się wyznaczyć najmniej stresującą metodę porodu.

Problematyka poruszona przez autorów jest dość istotna ze względu na potencjalny wpływ stresu okołoporodowego na przyszły rozwój dziecka. Metody planowanego eksperymentu zostały opracowane z dużą uwagą w celu uniknięcia problemów zwykle napotykanym w badaniach nad ludźmi. Projekt nie jest jednak pozbawiony pewnych błędów i nieścisłości. Spore wątpliwości budzi założenie autorów o braku związku pomiędzy charakterem a wyborem metody porodu i poziomie stresu. Dlatego uważam, że autorzy powinni zmienić metodę wyboru przyszłych matek do eksperymentu tak aby zadbać o w pełni losowy wybór.

Mimo iż nie sądzę aby wyniki tych badań zostały prędko zastosowane w polskich szpitalach ich wartość poznawcza jest duża i projekt zasługuje na finansowanie.

⑥

Wiesław Babik

Review of the project: "Comparative study of delivery methods in humans based on the level of stress hormone in the mother and newborn"

By M. Sandell, T. Błasiak and H. Szentgyörgyi

The aim of the presented project is to compare the effect of five different ways of delivery on stress level of mother and child. To measure of stress they intended to use the differences in adrenalin (or adrenalin in conjunction with oxytocin) level during the delivery process and the "normal" situation. They are also going to test the psychological effect of choice of a particular method. If the differences among the different ways of delivering were detected it would indicate the least stressful way of giving birth.

The problem is of great practical importance as finding the optimal way of delivery would make the delivery process more comfortable both for the mother and for the child.

The experiment is generally appropriately designed and the Authors should be able to detect the differences in stress level if such existed. In my opinion the main problem in this project is with statistical analyses. It is not clearly stated what will be taken as a difference between the hormone level between „normal” and delivery conditions. If it is be the absolute difference, or the ratio or something else. In my opinion Authors should consider controlling the „normal” hormone level by using it as a covariate in ANCOVA. The Authors do not give any explanation for testing 100 subjects in each group. Is this number taken *ad hoc* because it looks well? Moreover they do not state how they would analyse the data if the oxytocin and adrenalin level were correlated. Also the method of analysing of the results of psychological tests is not given explicitly.

More specific comments:

1. Oxytocin is not an androgene, it is not even a steroid, its a peptide
2. I do not know word „eventual” (Statistical analysis, line 1), what does it mean?
3. I think that it would be better to buy a biometry textbook instead of the latest SG machine and the latest Statistica In fact I'm not sure if there is a SG version of this package
- 4 English needs more attention

In spite of this criticism I think that presented project is of importance and the Authors should be able to test their hypotheses using the experimental design proposed. Therefore I would suggest funding the project by KBN, after reducing unnecessary costs.

PROJEKT BADAŃ

(wersja pierwsza)



Wpływ światła niebieskiego na stężenie barwników – chlorofilu i antocyjanów - w liściach trzykrotki (*Tradescantia sp.*).

Katarzyna Hryniewiecka¹ i Marcela Kocianova²

¹Instytut Botaniki UJ, Zakład Cytologii i Embriologii Roślin

²Instytut Nauk o Środowisku UJ, Zakład Ekologii Zwierząt, kocian@eko.uj.edu.pl.

STRESZCZENIE

Długość fali świetlnej, czyli barwa światła ma istotny wpływ na wiele procesów fizjologicznych, szczególnie dla roślin rozmnażanych metodą kultur in vitro.

Badania nad hiacynthem (*Hyacinthus sp.*) i begonią (*Begonia x rex*) wykazały, że światło niebieskie ma znaczenie dla zmiany stężeń chlorofilu **a**, **b**, i antocyjanów, a w konsekwencji na zmianę barwy liści na niebieską. Na podstawie tych badań planowane jest doświadczenie na trzykrotce (*Tradescantia* 'Little Violet'). Celem badań jest uzyskanie poprzez ekspozycję na światło niebieskie trzykrotki o liściach niebieskich.

WSTĘP

Każdy barwnik roślinny jest akceptorem specyficznego rodzaju światła. Chlorofil jest akceptorem światła białego, antocyjany – niebieskiego, natomiast nieznanym jest akceptor światła zielonego (Duda & Gumiński, 1961). Stężenie barwników powoduje, że roślina ma specyficzną barwę liści, pędów lub kwiatów (Szweykowska & Szweykowski, 1974).

Przeprowadzono badania dotyczące stężenia chlorofilu i antocyjanów w liściach hiacyntha (*Hyacinthus sp.*) oraz begonii królewskiej (*Begonia x rex*) rozmnażanych w kulturach in vitro pod wpływem światła niebieskiego.

Stwierdzono na podstawie analizy chromatograficznej, że w liściach roślin formowanych z kalusa zmienia się stosunek chlorofilu do antocyjanów. U hiacyntha, który na świetle białym zawiera niewiele antocyjanów a głównym barwnikiem jest chlorofil, na świetle niebieskim poziom chlorofilu znacznie spadał, a wzrastała zawartość antocyjanów, w wyniku czego liście uzyskiwały kolor niebieski (Bach et al., 1999). Natomiast u begonii, która naturalnie wykazuje wysoką zawartość antocyjanów, na świetle niebieskim wykazała wzrost zawartości chlorofilu, przez co jej liście przybrały barwę niebieską (Ptak et al., 1998). Efekt niebieskiej barwy liści był trwały, utrzymywał się przez 12 tygodni.

Na podstawie powyższych badań zostanie przeprowadzony eksperyment, który będzie miał na celu stwierdzenie, czy trzykrotka (*Tradescantia sp.*) rozmnażana w kulturach in vitro pod wpływem światła niebieskiego będzie miała liście wybarwione na niebiesko oraz jak będzie kształtował się stosunek chlorofilu **a** do chlorofilu **b** oraz zawartość antocyjanów.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ LABORATORYJNYCH

Obiekt badań

Obiektem badań będzie trzykrotka *Tradescantia sp.* odmiany 'Little Violet', której cechą typową jest silne wybarwienie liści przez antocyjany. Badana odmiana charakteryzuje się tym, że górna strona liścia jest fioletowo – bordowa, co związane jest z wysokim stężeniem antocyjanów, a dolna jest zielono – niebieska, co wiąże się z większym stężeniem chlorofilu.

Materiały

- ❖ 24 kolbki o pojemności 50 ml
- ❖ zestaw mikro- i makroelementów z witaminami – wg Murashige i Skooga
- ❖ agar
- ❖ sacharoza
- ❖ regulatory wzrostu: IBA, BAP
- ❖ świetlówki Philips emitujące światło niebieskie i białe
- ❖ chromatograf gazowy i odczynniki potrzebne do ekstrakcji barwników
- ❖ jednorazowe nożyki do cięcia materiału
- ❖ materiał wyjściowy – trzykrotka doniczkowana
- ❖ Area Li – Meter, urządzenie do pomiaru powierzchni asymilacyjnej liści

DOŚWIADCZENIE

Doświadczenie zostanie przeprowadzone w laboratorium kultur in vitro.

Plan doświadczenia:

Eksplantatem inicjalnym będą pąki liściowe *Tradescantia* 'Little Violet'. Po odkażeniu materiału w chloraminie T fragmenty pąków zostaną przeniesione w warunkach sterylnych na pożywkę zalecaną dla begonii ze względu na podobną intensywność regeneracji (Ptak et al., 1998). Skład pożywki: makro-, mikroelementy, witaminy wg Murashige i Skooga 4,4 g/dm³, agar – 30 g/dm³, sacharoza – 30 g/dm³, IBA – 3 μM/dm³, BAP – 1 μM/dm³.

Światło niebieskie o długości fali 500 nm emitowane przez świetlówkę Philips o natężeniu 325 μJ/m²/s, światło białe o natężeniu 620 μJ/m²/s.

ŚWIATŁO NIEBIESKIE

6 KOLBEK
w każdej kolbce
5 roślin

ŚWIATŁO BIAŁE

6 KOLBEK
w każdej kolbce
5 roślin

Przez 6 tygodni raz w tygodniu będzie pobierane po jednej kolbce wystawionej na działanie światła niebieskiego i białego. Na materiale z tych kolbek, tj. po 5 roślin, będzie wykonana analiza chromatograficzna barwników. Następnie otrzymane stężenie chlorofilu **a** dla każdej rośliny podzielimy przez stężenie chlorofilu **b**, oraz oznaczymy poziom antocyjanów. Takie dane otrzymamy co tydzień dla 5 roślin pozostających pod wpływem światła niebieskiego i 5 spod światła białego. Światło białe stanowi tu kontrolę. Przed wykonaniem analiz chromatograficznych zostanie zmierzona powierzchnia asymilacyjna liści roślin spod światła niebieskiego i białego.

Tabela opracowania wyników

ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA

Czynnik 2 Tygodnie ekspozycji	Czynnik 1 ŚWIATŁO NIEBIESKIE		Kontrola ŚWIATŁO BIAŁE	
	Cb/Ca ¹	Cb/A ²	Cb/Ca	Cb/A
I	1	1	1	1
	2	2	2	2
	3	3	3	3
	4	4	4	4
	5	5	5	5
II	1	1	1	1
	2	2	2	2
	3	3	3	3
	4	4	4	4
	5	5	5	5

Itd.

POWIERZCHNIA ASYMLACYJNA LIŚCI

Tygodnie ekspozycji	ŚWIATŁO NIEBIESKIE	ŚWIATŁO BIAŁE
I	1	1
	2	2
	3	3
	4	4
	5	5
	6	6

Itd.

ANALIZA STATYSTYCZNA DANYCH

Wyniki analiz chromatograficznych, dane dotyczące stężenia chlorofilu **a** podzielimy przez stężenia chlorofilu **b** w liściach trzykrotki. Ponadto zostaną zbadane zawartości antocyjanów. Czynnik pierwszy będzie stanowiło światło niebieskie, czynnik drugi – czas ekspozycji na światło w tygodniach. Zostanie przeprowadzona analiza wariancji dwuczynnikowa oraz obliczone korelacje między stężeniami chlorofilu i antocyjanów, między powierzchnią liści a barwą światła (Łomnicki 1995).

Przewidywany rezultat doświadczenia

1. Zawartość chloroplastów będzie wyższa w liściach roślin rosnących pod światłem niebieskim niż w kontroli.
2. Liście będą miały barwę niebieską u roślin pozostających pod działaniem światła niebieskiego.
3. Powierzchnia liści będzie większa u roślin rosnących na świetle białym.
4. Światło niebieskie spowoduje zwiększenie stosunku stężenia chlorofilu do antocyjanów, a światło białe zmniejszenie go.

¹ Stosunek chlorofilu **a** do chlorofilu **b**

² Stosunek chlorofilu **b** do antocyjanów

LITERATURA

1. Bach A., M. Kulig & Warchoł M., 1999. Wpływ światła niebieskiego na wybarwienie pędów i liści u hiacynta. Materiały z Konferencji Naukowej pt Postęp w rozmnażaniu roślin metodą kultur in vitro. Kraków AR
2. Duda J. i S. Gumiński, 1961. Fizjologia roślin. PWN Warszawa
3. Łomnicki A., 1995. Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. PWN Warszawa
4. Ptak A., M. Warchoł & Pindel Z., 1998. Rozwój liści u begonii (*Begonia x rex*) oraz ich wybarwienie pod wpływem światła niebieskiego, czerwonego i białego. Materiały z Konferencji Naukowej pt Rola światła w kulturach in vitro. Kraków AR
5. Szweykowska A. i J. Szweykowski, 1974. Botanika. PWN Warszawa

RECENZJE PROJEKTU BADAŃ

①

Adam Łomnicki



Ocena projektu badawczego: „Wpływ światła niebieskiego na stężenie barwników - chlorofilu i antocyjanów - w liściach trzykrotki (*Tradescantia sp.*)

Cel pracy nie jest jasny, ponieważ nie wiadomo dlaczego publiczne fundusze (KBN, europejskie lub fundacji prywatnej) miały by być użyte na uzyskanie trzykrotki o liściach niebieskich. Czy to ma być projekt stosowany? Jeśli tak, to jaki jest zysk z niebieskich liści i jak ten zysk w złotówkach ma się do ewentualnych nakładów, bo przecież każde pokolenie trzeba naświetlać? Bo autorki nic nie mówią, ani nie sugerują, że chcą drogą doboru lub genetycznej manipulacji niebieskie liście osiągnąć. Ja wiem, że w Ochothnicy nie dysponują one dokładnymi danymi kosztów hodowli i cen trzykrotek w hurcie, ale coś trzeba założyć, aby recenzentów przekonać o celowości finansowania takiego projektu.

Jeśli są to tylko badania mające na celu uzyskanie niebieskich liści, to po co eksperyment i kontrola, po co badanie stosunku chlorofilu a i b, oraz powierzchni asymilacyjnych liści? Co z tego porównania ma wynikać? Można się domyślać, że prowadzenie naświetlania przez 6 tygodni i sprawdzanie po każdym tygodniu pozwoli autorkom ustalić jak długo należy rośliny naświetlać, aby uzyskać pożądane efekty. Ale tego nigdzie w projekcie nie napisano. Dlaczego proponowane natężenie ma wynieść 325 jednostek na światła niebieskiego a 620 dla światła białego? Czy nie należałoby sprawdzić innych natężeń? A po co w takich stosowanych badaniach kontrola światła białego? Czyżby było możliwe, że w warunkach eksperymentalnych proponowanych przez autorki niebieskie liście pojawią się także przy świetle białym? A czy nie powinno być jakiegoś sposobu badania niebieskości? Na przykład badanie widma światła odbitego od liści?

Chcąc uzyskać trzykrotki o niebieskich liściach w szklarniach lub ogrodach, takie badania należy przeprowadzać w takich warunkach w jakich trzykrotki będziemy produkować na sprzedaż. Nawet jeśli paki będziemy przy produkcji naświetlać w kolbkach, to chyba nie będziemy używać tak skomplikowanych (i chyba drogich) używek i regulatorów wzrostu, jak proponowane w tym doświadczeniu. Dlatego po przeczytaniu projektu doświadczenia zaczynam wątpić czy chodzi tu o projekt badań stosowanych czy też badań teoretycznych. Jeśli tak jest, to autorki cel pracy głęboko ukryły, ponieważ nie powiedziały co zmieni się w naszej wiedzy o fizjologii roślin jeśli okaże się, że pod wpływem niebieskiego światła liście trzykrotki będą niebieskie, a co stanie się kiedy niebieskie staną się także te umieszczone w świetle białym lub niebieskie nie staną się w żadnym z tych światła.

No i rzecz podstawowa: w tej pracy brak hipotezy, brak hipotez alternatywnych brak opisu konsekwencji przyjęcia każdej z przedstawionych hipotez. Cytując Platta: *Drogi Panie jaką hipotezę mają Wasze badania obalić?*

Aby potraktować autorki uczciwie i szczerze. Ten projekt to typowy przykład niezrozumienia na czym polega uprawianie nauki. Niektórzy laicy sądzą, że nauka polega na tym iż wykonujemy czynności charakterystyczne dla uczonych: nosimy białe kitle, mieszamy coś w próbkach, oznaczamy różne chemiczne substancje i ich stężenie, oznaczamy gatunki roślin, zwierząt i mikroorganizmów, robimy eksperymenty, badania kontrolne i przeprowadzamy statystyczną analizę uzyskanych wyników. Otóż można to wszystko robić i nie będzie to miało nic wspólnego z nauką. To jest obraz nauki z żabiej perspektywy laboranta albo woźnego w zakładzie naukowym - tylko zewnętrzny pozór. Niestety niektórzy uczeni chcąc mieć sprawnych i posłusznych laborantów, a nie rzeczywistych partnerów, taki obraz nauki dają swym studentom

i doktorantom. Ale tak nie jest. Prowadząc jakiegokolwiek badania trzeba wiedzieć po co to robimy. Jakie zyski liczone w złotówkach może przynieść nasz projekt? Jak zmieni on nasz obraz świata, choćby w takiej dziedzinie jak fizjologia roślin.? Albo choćby jakie mamy szansę tej zmiany? Bez tego nie warto finansować ani projektu ani badacza taki projekt proponującego.

Do tego jeszcze dochodzi nieporadność w przygotowaniu maszynopisu. Tytuł główny używa mniejszych liter niż podtytuły. W streszczeniu są informacje (cel), których nie ma w głównym tekście. Zamiast o rodzaju światła należało powiedzieć o długości fali. Z akapitu drugiego we wstępie nic nie wynika - jest to wstęp przydługi do zdań następnego akapitu. A z badań na begonią i hiacyntem wcale nie wynika, że podobne badania trzeba zrobić na trzykrotce. Co to znaczy „little violet”? Dlaczego dużymi literami? Czy to nazwa angielska czy handlowa polska? Ten spis materiałów każdy od osobnej linii z ozdobnikiem po lewej stronie nie wiadomo po co? Czy nie lepiej ponumerować. Wiadomo że 24 kolbki, ale ile doniczek, ile trzykrotek, ile jednorazowych nożyczek?

A umieszczenie kolorowego rysunku na końcu świadczy, że autorki mają tendencje do wykorzystywania swego czasu (płaconego z pieniędzy podatników) oraz dostępnych urządzeń (komputery) i materiałów (także płaconych też przez podatników) do zabawy już przy pisaniu projektu. Tym bardziej będą się bawić, zamiast prowadzić badania, gdyby projekt sfinansowano.

Mam nadzieje, że ta rzeczywiście nieprzyjemna recenzja uchroni Panie przed popełnianiem błędów przy pisaniu prawdziwego projektu.

②

Jan Rafiński

Recenzja projektu badawczego K. Hryniewieckiej i M. Kocianovej pt. „Wpływ światła niebieskiego na steżenie barwników, itd.”

1. Wstęp. Autorki projektu nie uzasadniają przekonująco potrzeby przeprowadzenia takich badań. Nie wiadomo jaki ma być ich cel teoretyczny lub/i praktyczny. Zaskakująca jest dla czytelnika informacja, że u różnych omawianych we wstępie gatunków (hiacynt i begonia) światło niebieskie powoduje różne zmiany w proporcji chlorofilów i antocjanów. Dlaczego, czy to wiadomo? Trudno wtedy przewidzieć jaka może być reakcja na światło niebieskie jeszcze innego gatunku, zupełnie z poprzednimi nie spokrewnionego. Pomyśl mało oryginalny jeśli u innych gatunków niebieskie światło indukuje zmiany barwy liścia na niebieska.

2. Metody badań.

Nie wyjaśniono dlaczego stosowane światło białe będzie miało 2x wyższą jasność, czy jedyna różnica między dwoma rodzajami światła jest brak innych długości fali świetlnej w przypadku „światła niebieskiego” (bo ‘niebieskie światło’ jest też składnikiem ‘białego’)?

Nie wyjaśniono jaka metoda analizowana będzie ilość barwników (‘analiza chromatograficzna’ to zbyt ogólnikowo), w jaki sposób będzie to ujmowane ilościowo (na jednostkę masy?). Dlaczego obliczana będzie proporcja antocjanów do chlorofilu b a nie, a?

Brak uzasadnienia dlaczego będzie badana powierzchnia asymilacyjna; jak, całej rośliny, średnio na liść?

W analizie zależności między zmiennymi trzeba zastosować analizę kowariancji.

3. Oczekiwania.

Dlaczego 'zawartosc chloroplastow' ma byc wyzsza w grupie eksperymentalnej? Co to jest 'zawartosc chloroplastow'? Zupelnie niezrozumiale.

Dlaczego oczekuje sie, iz powierzchnia asymilacyjna roslin uprawianych w niebieskim swietle ma byc wieksza? Brak uzasadnienia.

Dla czego oczekiwac mamy wzrostu stezenia antocjanow w grupie eksperymentalnej, jesli we wstepie przedstawiono dane swiadczace, ze u roznych gatunkow moze byc roznie?

Ogolna ocena.

Temat badan nieprzekonujaco przedstawiony. Metody zbyt ogolnikowo omowione. Duze zastrzezenia co do logiki w oczekiwaniach i wnioskowaniach.

③

Anna Dudek

Recenzja projektu badawczego „Wpływ światła niebieskiego na stężenie barwników - chlorofilu i antocjanów - w liściach trzykrotki (*Tradescantia sp.*)

Celem projektu badawczego K Hryniewicz i M. Kocianovej jest uzyskanie trzykrotki (*Tradescantia „Little violet”*) o liściach w kolorze niebieskim. Jest to projekt eksperymentalny o znaczeniu komercyjnym i użytkowym.

Uważam że podstawową słabą stroną tego projektu jest uzasadnienie jego znaczenia dla społeczeństwa. Dlaczego projekt ten ma być sponsorowany z pieniędzy publicznych skoro zyski ze sprzedaży takiego rodzaju kwiatów będą przedmiotem zysku ekonomicznego indywidualnych jednostek gospodarczych.

Poza tym, autorzy sami nie przedstawiają powodów dla których taki projekt mógłby być ważny dla społeczeństwa oraz nie dyskutuje ewentualnych negatywnych jego oddziaływań na ekonomię (np. obniżenie sprzedaży kwiatów „naturalnych”) i społecznych (filozoficzne przedstawienie ludzi na konsumpcję wytworów „industrialnych”, promowanie konsumpcji dóbr niezgodnych z naturą).

Projekt uważam za logicznie i jasno napisany, klarowny i jasny w założeniach. Język projektu nie sprawia trudności w zrozumieniu, nie posiada skrótów myślowych. Zaplecze teoretyczne jest jasno przedstawione.

Brakuje uwagi na temat czy badania te są całkowicie pionierskie, czy też wykonuje się je na zasadzie powtórzenia, brakuje również założeń pozwalających na ewentualną kontynuację badań.

Eksperyment wygląda na dobrze zaprojektowany, brakuje w nim niektórych danych, np.: czas napromieniowania (24 h na dobę ?) a także ewentualnych kosztów, w którym laboratorium zostanie przeprowadzony eksperyment, czy jest ono wystarczająco wyposażone, czy istnieje potrzeba zakupu dodatkowych urządzeń. Na końcu tytułu nie stawia się kropek.

Projekt uważam za dobry ale powinien być finansowany przez jednostkę zainteresowaną tym komercyjnie.

④

Hajnalka Szentgyörgyi

Review: Wpływ światła niebieskiego na stężenie barwników – chlorofilu i antocyjanów – w liściach trzykrotki (*Tradescantia sp.*)

Authors: Katarzyna Hryniecka, i Marcela Kocianova

The influence of the length of light (the color of light) during the development of the plant has an important meaning in cultures in vitro, changing the concentration of the chlorophyll a, b and antocyanins. These concentration differences can affect the color of the developing leaf, changing its original color. The effect of light on the developing organism is different depending on the species.

Authors of the project are interested in the effects of blue light on the leaves of developing *Tradescantia sp.* Their hypothesis is that using blue light (500nm) instead of white light during the first 6 weeks of development in this flower will probably change the color of the leaves into bright blue. Authors are planning to conduct the experiment through the first 6 weeks of development, analyzing the concentration changes in the amount of *Ca*, *Cb* and *A* in the leaves once in every passing week.

Cited literature shows that the authors have a widespread knowledge of the topic, though recent results are not emphasized.

There is no strong evidence that this effect is repeatable in all plants and even if it is, the indicator of this effect can be only blue light. There is no information about the effects of light on other longitudes on the color of the leaf. Also it's not clear if this effect occurs only during the first weeks of development or it can be repeatable in later phases of a plant's life.

There is no alternative hypothesis given in the proposal. What authors suggest if the color of the leaves of the tested plant will stay the same?

What is the correlation between the size of assimilation area on the leaf and the color of the leaf? There is no cited literature.

In analysis of concentrations also proportion of *Ca* to *A* should be taken into account. There is no evidence that proportion of *Ca* to *A* has no effect on the color of the leaves. Why do authors plan to use white light (as control) on different $\mu\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$ then for blue light?

There is no need to show the tables the authors will use to collect the data.

Generally the project is good, but used methods should be more precise and based on the results of earlier works, taking into account all the factors that can have a measurable effect.

⑤

Łukasz Sobczyk

Recenzja: Wpływ światła niebieskiego na stężenie barwników - chlorofilu i antocyjanów - w liściach trzykrotki (*Tradescantia sp.*)

Autorki pragną sprawdzić czy u trzykrotki wystawionej na działanie światła niebieskiego nastąpi zmiana barwy liści z zielonych na niebieskie oraz czy będzie miała miejsce zmiana stężenia chlorofilu i antocyjanów.

Nie ma jednak w projekcie wyraźnego sformułowania jaka hipoteza ma być testowana, ani jaki jest cel badań. Po co nam trzykrotki o niebieskich liściach?

Nie jest wyraźnie pokazane jak stosunek chlorofilu a do b oraz chlorofilu b do antocyjanów ma być powiązany z występowaniem niebieskiej barwy u liści. Dlaczego doświadczenie jest przeprowadzane na kulturach in vitro. Czemu ma służyć sprawdzanie zawartości barwników co tydzień przez sześć tygodni?

W projekcie nie jest powiedziane po co będą mierzone wielkości liści.

Na stronie 3 niepotrzebnie podano skład pożywki.

Doświadczenie kontrolne powinno być przeprowadzone w takich samych warunkach dlatego zatem natężenie światła białego jest prawie dwukrotnie wyższe niż niebieskiego.

Schemat na stronie 3 nie podpisany i nie wiadomo czego dotyczy.

Nie potrzebne tabele na str. 4

Drobne uwagi:

Natężenie światła mierzy się w luksach.

Forma zapisu jednostek nie odpowiada powszechnie przyjętym standardom.

Uważam, że projektu takiego nie można finansować z publicznych pieniędzy. Może autorki powinny zwrócić się z nim do komercyjnych firm ogrodniczych.

PROJEKT BADAŃ

(wersja ostateczna/poprawiona)



Przepływ genów pomiędzy miejskimi i pozamiejskimi populacjami kosa (*Turdus merula*) na tle zróżnicowania genetycznego gatunku w Europie

Wiesław Babik i Łukasz Sobczyk

Cel projektu:

Głównym celem naszego projektu jest stwierdzenie, czy istnieją ograniczenia w przepływie genów pomiędzy miejskimi, nie migrującymi populacjami kosa (*Turdus merula*), a migrującymi populacjami z otaczających je terenów niezurbanizowanych. Miejskie populacje kosa zaobserwowano po raz pierwszy w miastach angielskich i zachodnioniemieckich, a następnie pojawiały się one w coraz bardziej wysuniętych na wschód miastach. Ze względu na zaobserwowane różnice w tendencjach migracyjnych można przypuszczać, że istnieje ograniczenie przepływu genów pomiędzy tymi dwoma typami populacji. To sugerowałoby możliwość powstania izolacji rozrodowej wynikającej z różnic ekologicznych. Nasze badanie mają również na celu odpowiedzieć na pytanie czy miejskie populacje kosa powstały wielokrotnie i niezależnie z populacji leśnych, czy też wszystkie są potomkami kosów angielskich i/lub niemieckich. Dodatkowo chcemy odpowiedzieć na pytanie, czy w Europie istnieje geograficzny wzorzec zróżnicowania genetycznego populacji kosa. Wskazuje na to istnienie dwu różnych rejonów zimowania (w Płn. Afryce i Azji Mniejszej) będących prawdopodobnie pozostałościami refugium lodowcowych, gdzie grupy te mogły zróżnicować się w allopatrii. Obie hipotezy zamierzamy przetestować badając zmienność DNA mikrosatelitarnego.

Wstęp:

Proces specjacji znajduje się w centrum zainteresowania biologów ewolucyjnych od czasu wydania *On the origin of species...* Darwina (1859). W większości przypadków badania eksperymentalne nad mechanizmami lub bezpośrednie obserwacje tego procesu nie są jednak możliwe z powodu jego długotrwałości. Tym bardziej cenne dla badaczy są stosunkowo rzadkie przypadki kiedy specjacja zachodzi szybko w ewolucyjnej skali czasu. Najszerzej znanym przykładem są "roje gatunków" pielęgnic (*Cichlidae*) z Wielkich Jezior Afrykańskich (Steinhausen, 1999). Przypuszcza się, że gatunki te powstały sympatrycznie w wyniku zróżnicowanego wykorzystania zasobów środowiska lub działania doboru płciowego. Na taką możliwość wskazują również opublikowane ostatnio modele teoretyczne (Dieckmann i Doebeli, 1999; Kondrashov i Kondrashov, 1999). Jednym z powodów wybrania kosa jako obiektu naszych badań jest to, że dotychczasowe obserwacje populacji kosów z obszarów miejskich i nieurbanizowanych w Europie sugerują możliwość rozwoju izolacji rozrodowej pomiędzy tymi populacjami. Ewentualny rozwój takiej izolacji mógłby być związany ze zróżnicowaniem ekologicznym. Populacje miejskie, niemigrujące i przystępujące do rozrodu kilka tygodni wcześniej niż sąsiadujące z nimi populacje z terenów niezurbanizowanych pojawiały się stopniowo w miastach europejskich z zachodu na wschód. Pomiedzy tymi dwoma typami kosów stwierdzono również i inne różnice behawioralne (Walasz, 1988). Na podstawie danych ze stacji obrączkowania ptaków zamierzamy ponownie przeanalizować częstość wymiany osobników pomiędzy oboma typami populacji.

Ważna jest również odpowiedź na pytanie, jakie jest pochodzenie kosów miejskich. Istnieją przypuszczenia (Walasz, dane niepublikowane), że wszystkie miejskie populacje wywodzą się od kosów zachodnioeuropejskich. Wskazuje na to kierunek rozprzestrzeniania się populacji miejskich. Jednak może być również tak, że miejskie, niemigrujące populacje kosów powstały wielokrotnie i niezależnie z pobliskich populacji leśnych, a ich stopniowe pojawianie się coraz dalej na wschodzie wynikało z ocieplania się klimatu i powstawania "wysp ciepła" w miastach (M. Cichoń, inf. ustna).

Zasadnicze znaczenie dla ukształtowania współczesnej fauny europejskiej miały zlodowacenia plejstoceny. Spowodowały one podział zasięgów wielu gatunków w wyniku zepchnięcia ich do różnych refugium. Najważniejsze z nich znajdowały się na Półwyspie Iberyjskim, na Bałkanach, a także na Półwyspie Apenińskim (Hewitt, 1996). W warunkach izolacji geograficznej prawdopodobnie gromadziły się pomiędzy nimi różnice genetyczne. Po ustąpieniu lodowca populacje z tych refugium kolonizowały ponownie obszary polodowcowe. Na podstawie badań genetycznych stwierdzono występowanie stref "styku" takich populacji, głównie wśród ssaków i niektórych bezkręgowców w Europie Środkowej i w Skandynawii (Hewitt, 1996; Tautz i in., 1998). W przeciwieństwie do wymienionych grup ptaki są organizmami o dużo większych możliwościach migracji. Jednak jak dotychczas niewiele jest podobnych badań dotyczących ptaków, a te które są wskazują na możliwość wyraźnego zróżnicowania genetycznego populacji europejskich (Merila i in., 1996). Również struktura genetyczna populacji europejskich kosów nie była dotychczas badana.

Uważa się, że obecne miejsca zimowania europejskich ptaków migrujących są zlokalizowane na obszarach bliskich refugium lodowcowym tych gatunków (M. Cichoń, inf. ustna). Populacje kosa zamieszkujące Europę Zachodnią (mniej więcej po środkowe Niemcy) mają zimowiska w Afryce Pn., natomiast te zamieszkujące bardziej na wschodzie zimują w Azji Mniejszej. Spodziewamy się zatem, że te dwie grupy mogą być, przynajmniej do pewnego stopnia, genetycznie różne. W takim przypadku winny być one traktowane jako odrębne, znaczące ewolucyjnie jednostki (ang. *Evolutionary Significant Units*) (Ryder, 1986).

Ponieważ badania tego typu wymagają zastosowania bardzo czułych i neutralnych markerów genetycznych, zdecydowaliśmy się na użycie loci mikrosatelitarnych, (Tautz, 1989). Mikrosatelity od około 10 lat używane są w badaniu zróżnicowania genetycznego; wykazano, że przy ich użyciu można wykryć bardzo subtelne różnice pomiędzy populacjami (Jarne i Lagoda, 1996). Zastosowano je do badań bardzo licznych gatunków z różnych grup systematycznych (Tautz i in., 1998). Sekwencje primerów umożliwiających namnożenie 10 takich loci, zostały opublikowane, a poziom zmienności genetycznej zaobserwowany w tych loci (Deriglassoff i in., 1999), jest odpowiedni dla zastosowania w naszych badaniach.

Niniejszy projekt ma odpowiedzieć na następujące pytania:

1. Czy populacje miejskie i sąsiadujące z nimi populacje pozamiejskie różnią się genetycznie bardziej niż dwie populacje pozamiejskie z tego samego rejonu.
2. Czy populacja europejska jest zróżnicowana genetycznie na dwie grupy odpowiadające różnym miejscom zimowania (Pn. Afryka i Azja Mniejsza).
3. Populacje miejskie w całej Europie powstały z populacji angielskich i/lub niemieckich, czy też powstały wielokrotnie i niezależnie przez wchodzenie pozamiejskich populacji kosów do miast.

Metody:

Zamierzamy pobrać próby z dwudziestu czterech populacji w sześciu rejonach Europy, rozmieszczonych w przybliżeniu równomiernie: Półwyspie Iberyjskim, Bałkanach, Wielkiej Brytanii, Niemczech, Polsce, oraz Krajach Nadbałtyckich. W każdym z rejonów zostaną pobrane próby z dwu populacji zamieszkujących miasta oddalone od siebie o około 200-300 km oraz z dwu populacji pozamiejskich znajdujących się maksymalnie 30 km od wybranych miast i pochodzących z terenów znajdujących się pod możliwie najmniejszym wpływem człowieka.

Z każdej populacji w okresie lęgowym zmiierzamy pobrać od 20 piskląt z różnych gniazd po 10 μ l krwi. Dotychczasowe badania wykazały, że taka liczebność prób jest zazwyczaj wystarczająca do uzyskania wiarygodnego oszacowania zmienności i zróżnicowania genetycznego (Jarne i Lagoda, 1996). Próbki zostaną umieszczone w alkoholu. Z krwinek zostanie wyizolowane DNA metodą fenolowo-chloroformową. Następnie zostaną przeprowadzone reakcje PCR w celu namnożenia 10 loci mikrosatelitarnych. Allele zostaną rozdzielone na żelach polakrylamidowych i uwidocznione metodą srebrną. Wielkość alleli (mierzona liczbą par zasad) zostanie określona przez każdorazowe porównanie ze standardową "drabiną" wielkości DNA. Dla każdej populacji zostaną obliczone częstości alleli. Obliczone zostaną również standardowe miary zmienności genetycznej, liczba alleli na locus i średnia heterozygotyczność. Przetestujemy też różnice w częstościach alleli pomiędzy populacjami za pomocą testów permutacyjnych. Następnie obliczymy odległości genetyczne pomiędzy populacjami (Nei, 1978). Z macierzy częstości alleli oraz z macierzy odległości genetycznych zostaną skonstruowane kilkoma metodami drzewa filogenetyczne (Hillis i in., 1996); wiarygodność otrzymanych topologii zostanie oceniona techniką bootstrap (Felsenstein, 1985). Te same macierze odległości genetycznych zostaną wykorzystane do przedstawienia związków pomiędzy populacjami metodą niemetrycznego skalowania dwuwymiarowego. W odróżnieniu od metod konstrukcji drzew filogenetycznych skalowanie nie narzuca *a priori* hierarchicznej struktury danych.

Hierarchiczna analiza statystyk F (Wright, 1978) zostanie zastosowana do oceny stopnia zróżnicowania genetycznego populacji na różnych poziomach hierarchii. Za najwyższy stopień hierarchii zostanie uznany podział na dwa obszary geograficzne w zależności od miejsca zimowania, kolejnym poziomem będzie podział na rejony w obrębie obu obszarów (patrz wyżej), następnym stopniem będzie podział na populacje miejskie i pozamiejskie, zaś najniższy stopień hierarchii stanowiąc będą poszczególne populacje.

Z wartości statystyk F można wnioskować o istotności zróżnicowania genetycznego na poszczególnych poziomach hierarchii, a więc również o wielkości przepływu genów na tych poziomach. Istotność statystyczną statystyk F zostanie sprawdzona metodą bootstrap.

Przewidywane wyniki:

Spodziewamy się, że wszystkie trzy hipotezy postawione we wstępie będzie można testować analizując topologie drzew filogenetycznych i układ populacji na wykresie skalowania dwuwymiarowego odległości genetycznych.

Gdy sąsiadujące ze sobą populacje miejskie i pozamiejskie będą tworzyły najbliższe sobie pary, będzie to przemawiało przeciw hipotezie 1) i jednocześnie przeciw hipotezie 3).

Jeżeli na drzewie nie będzie można wyróżnić dwu wyraźnych grup: 1) obejmującej populacje środkowo- i wschodnioeuropejskie (a przynajmniej populacje leśne z tych obszarów), 2) obejmującej populacje zachodnioeuropejskie (oraz ewentualnie kosa z miast środkowej i wsch. Europy), trzeba będzie odrzucić hipotezę 2).

Gdy wschodnie populacje miejskie będą bliższe wschodnim populacjom pozamiejskim niż kosom zachodnioeuropejskim z miast odrzucimy hipotezę 3).

W przypadku, gdy uzyskane topologie nie pozwolą na przyjęcie lub odrzucenie postawionych hipotez, należało będzie rozpatrzyć dwie możliwości:

1. Gdy stwierdzimy wyraźne zróżnicowanie genetyczne, nie odpowiadające jednak żadnemu z przewidywań, sugerować to będzie, że za zróżnicowanie genetyczne populacji kosa w Europie odpowiadają inne czynniki niż podział na populacje miejskie/pozamiejskie i występowanie dwu rejonów zimowania.

2. Gdy nie stwierdzimy wyraźnego zróżnicowania, będzie to najprawdopodobniej wynikiem tego, że zastosowane markery mają nieodpowiednią czułość dla wykrycia różnic międzypopulacyjnych. W takim przypadku trzeba będzie rozważyć zastosowanie innych markerów molekularnych (sekwencje mt DNA, badanie mutacji punktowych metodą SSCP (ang. *Single Strand Conformation Polymorphism*). Możliwość taka wydaje się jednak być

bardzo mało prawdopodobna, gdyż przeczą jej wyniki dotychczasowych badań na ptakach europejskich i północnoamerykańskich (Green i in., 1998)

Wnioskowanie na podstawie topologii drzew filogenetycznych będzie dodatkowo sprawdzone testami różnic w częstości alleli pomiędzy populacjami i analizą statystyk F (Wright, 1978)

W przypadku stwierdzenia ograniczeń w przepływie genów wskazane są dalsze badania molekularne przy zastosowaniu mtDNA. Pozwolą one stwierdzić czy bardziej ograniczony jest przepływ genów matczynych. Wskazane byłoby również przeprowadzenie badań nad behawioralnymi przyczynami ewentualnego ograniczenia kojarzeń pomiędzy ptakami z obu typów populacji.

Materialy:

Thermocycler, aparat do poliakrylamidowych żeli do sekwencjonowania, zasilacz prądu stałego 3000 V, komputer + skaner umożliwiający skanowanie materiałów przezroczystych, pipety automatyczne, lodówka z zamrażarką, eppendorfy, odczynniki do reakcji PCR, odczynniki do izolacji DNA, akrylamid i bis-akrylamid, odczynniki do wybarwiania DNA metodą srebrową, oprogramowanie do analiz genetyczno-populacyjnych i filogenetycznych: PAUP* (pozostałe oprogramowanie darmowe, dostępne przez Internet). Łączny koszt: ok. 100 000 PLN.

Środki finansowe na delegacje do miejsc zbierania prób: 30 000 PLN; pensje dla 2 osób pomagających zebrać materiał w terenie (łącznie 120 dni roboczych): 10 000 PLN.

Formy rozpowszechniania wyników:

Publikacje w międzynarodowych czasopismach naukowych (Molecular Ecology, Conservation Biology). Prezentacja wyników na kongresie Europejskiego Towarzystwa Biologii Ewolucyjnej, oraz na krajowych konferencjach naukowych i na Warsztatach Biologii Ewolucyjnej.

Literatura:

- Darwin C. 1859. *The Origin of Species by Means of Natural Selection*. John Murray, London.
- Deriglassoff A. i in. 1999. *Mol. Ecol.*, 9: 987-989.
- Dieckmann U. i Doebeli M. 1999. *Nature*, 400: 354-357.
- Felsenstein J. 1985. *Evolution*, 39: 783-791.
- Green M. i in. 1998. *Evolution*, 53: 129-137.
- Hewitt G. 1996. *Biol. J. Linn. Soc.*, 252: 1-20.
- Jarne P. i Lagoda J. 1996. *TREE*, 11: 424-429.
- Kondrasvov A.G. i Kondrashov. A.S. 1999. *Nature*, 400: 351-354.
- Merila J. i in. 1996. *Evolution*, 51: 1200-1204.
- Nei M. 1978. *Genetics*: 583-590.
- Ryder O. 1986. *TREE*, 1: 9-10.
- Hillis D.M. i in. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer, New York
- Tautz D. i in. 1998. *PNAS*, 390: 5678-5683.
- Walasz K. 1988. *Acta Zool. Crac*, 31
- Wright S. 1978. *Population Genetics*. Vol. 4. Univ Chicago Press, Chicago

PROJEKT BADAŃ

(wersja ostateczna/poprawiona)



Influence of forest fragmentation on population density of *Cryptullerus obsoletus*.

Anna Dudek i Maciej Konopiński

1. INTRODUCTION

1.1 Aim of the study

Unsustainable management of the tropical forests has led to severe losses in the forest cover in tropical regions (about 40% of the previous state). Such decrease has been reported to trigger biodiversity loss of tropical species especially rare, endemic and highly specialised species. This situation has forced many countries to change the policy towards pristine tropical regions and develop new logging strategies to prevent further damage. New alternative logging includes selective logging and logging in patches to maintain islands and create transition corridors for the species.

Present state of the knowledge suggests that low mobility birds are highly susceptible to negative consequences of fragmentation due to changes in biotic and abiotic factors of the environment (e.g. change of radiation pattern, temperature and microclimate, increase in predation rate on eggs and chickens, change in the vegetation composition and following loss of food availability, loss of the habitat critical size, creation of gaps and isolation, genetic depauperation of the species). Therefore, logging strategy based on fragmentation, has not application for conservation of low mobility species.

Mathematical model suggest that the number of individuals is linearly dependent on patch size. However biological circumstances like those associated with fragmentation can diverge density from that obtained from simple mathematical calculations.

The aim of this research is to study influence of fragmentation on population density of *Crypturellus obsoletus*. We will investigate whether population density is correlated to the patch size and therefore applies to the fragmentation impact on population density.

1.2 Description of the species

Crypturellus obsoletus belongs to the family *Tinamidae*. It is the low mobile bird, living in the lowest layer of the lowland tropical forest formations. It is a specialist all over the year foraging on fruits of *Alnus acuminata* which is dependant on *C. obsoletus* because fruits before germination have to be digested by this species (Cortez D., 1978). *C. obsoletus* is restricted to forest habitat of climax conditions, not willing to pass gaps. In open spaces it is vulnerable to predators therefore even little gaps are a strong barriers for migration in this species. Both males and females are strongly territorial. Territories of males and females overlap but does not overlap with territories of individuals of the same sex.

1.3 Description of the study area

Research will be performed in the tropical lowland rainforest in the northern part of Bolivia, South America, in the National Park and Area of Natural Management „Amoro”, province Rurenabaque. The forest is a climax forest which is managed as a part of the project „Towards needs of sustainable forestry” financed by the Dutch governmental organisation ALOEFE (Inti, 1997). As the effect of activities of this organisation in the beginning of 90’ the

pristine forest has been fragmented in several patches of different size. The succession progress is very slow therefore deforested areas are still a strong barrier for individuals' migration.

2. METHODS

Study area will consist of 30 patches of forest fragmented in the same period. The patches will be chosen randomly and the size will range from 1 to 20 km². They will be mapped with use of GPS signal receiver (Garmin™ 12 XP) and the area will be calculated with GIS method using ArcInfo™ package (available in Institute of Nature Conservation). Differential GPS with reference station will be used to overcome problems with signal disturbances.

Individuals occupying given patch will be counted according to recorded voices. The transects will be designed to cover whole patch. Counting will be performed 3 times on each patch during 3 consecutive days. The map of vocalising individuals will be prepared.

In order to test the correlation between the patch size and population density we are going to use the Spearman rank order correlation coefficient (Łomnicki, 1995). Following hypotheses will be tested:

Ho - population density is independent of patch size

Ha - population density changes with patch size.

Estimated costs

Airplain tickets: 2 x 4500 PLZ

Lada Niva: 45 000 PLZ

Camping equipment: 2000 PLZ

Garmin GPS Signal Receiver: 2 x 2000 PLZ

3. PREDICTED RESULTS

Null hypothesis is that number of individuals is linearly dependent on patch size because the density is independent of patch size. We expect that the biological conditions in fragmented forest will alter the density. It is also possible that in smallest patches the population could be extinct because of random events and the very low probability of reoccurrence. Those patches will not be taken into account so that they will not have influence on variation - we assume that density in occupied patches is at equilibrium. Two result are possible:

1. Ho will not be disproved - we cannot state that there is influence of fragmentation on population density, therefore fragmentation might not have an impact on population health.

2. Ha is proved - there is correlation between patch size and population density. Several explanations are possible:

- if the population density increases with the patch size, it might mean that fragmentation is in favourable to the species. This could be a result of one of the following:
 - a. fragmentation has larger impact on the predators or competitive species then on the studied one,
 - b. changes in abiotic factors are profitable.
- if the population density decreases with the patch size, it means that fragmentation is unprofitable for the population of *C. obsoletus*. Possible explanations are:
 - c. higher rate of predation
 - d. problems with hatching of eggs
 - e. negative consequences of inbreeding and loss of genetic variability.
 - f. unprofitable influence of abiotic factors associated with fragmentation (radiation, temperature)

4. PRACTICAL MEANING OF THE PROJECT

Tropical forests play a crucial role in the biosphere processes such as climate regulation, water regulation, soil retention and bioenergy fixation. They provide goods that have direct reflection in commercial markets like raw materials (minor forest products), fuel, food and ornamental resources. Tropical forest formations contain 70% of the world biodiversity which is possible source of medicines and cures for various diseases. Besides the economical reasons it is important for variety of aesthetic and cultural resources, recreation possibility and scientific information. The tropical rainforest is very fragile ecosystem with complex relations between its elements. However, it is difficult to follow all the relationships among species we are able to point out key-stone species that are crucial for functioning of the system.

Crypturellus obsoletus is important species as it is foraging on fruits of climax tree species - *Alnus acuminata*. It is also an important component of the diet of predator species like small canids (*Canis culpaeus andinus*), felids (*Herpailurus yaguarondi* and *Leopardus pardalis*) and snakes (*Bothriopsis bilineatus*). Removal of this species from an ecosystem would have severe consequences for predators and *A. acuminata* populations. The protection of this species is not only important for conservation reasons but it is of crucial importance for the forest industry and maintenance health of forests.

The results obtained during this project will provide scientific basis for improvement of logging methods. They will help to take into account critical habitat size of low mobility species necessary for maintenance of the viable population and will help to establish conservation strategy for this species. Experiences gained will be used to work out guidelines for forthcoming projects on other species crucial to existence of tropical rainforest.

5. PRESENTATION OF RESULTS

Results obtained in this project are novel to science and we expect to meet large interest from ecological and conservation journals. We expect to publish at least two papers in international journals (e.g. Conservation Biology, Molecular Ecology). Results will also contribute to the projects targeted at development management strategies for sustainable use of tropical regions.

REFERENCES

- Cortez D, 1978. La diversidad de la vida. *Annu. Ecol* 12:345-351
Inti, A. 1997. The influence of intensive forest exploitation on genetic composition of tropical avifauna. *Proc. Bolivian Ac. Sci.* 8:1025-1043
Łomnicki, A 1995. Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. PWN. Warszawa

PROJEKT BADAŃ

(wersja ostateczna/poprawiona)

Comparative study of delivery methods in humans based on the level of stress hormone in the mother and newborn.



Maria Sandell, Tomasz Błasiak & Hajnalka Szentgyörgyi

Environmental Science Fiction Group™, Jagiellonian University, Kraków

INTRODUCTION

Delivering a child is an enormous stress for both the mother and the baby. During the last forty years alternative methods of delivering a child are emerging and getting more and more common all over the world. Some after-delivery psychological tests conducted on mothers, having babies born, both traditionally in hospital or by one of these alternative ways, suggest, that alternative methods are less stressing for the mother, and according to the mother, also for the baby (see Delaxrois, 2002). To our knowledge no stress level tests were performed on the mothers and/or newborns to compare these methods.

The aim of our study is to compare these different methods of delivery using a blood hormone level test to study stress level before, during and after the delivery process. As it is shown in earlier studies conducted on animals (Microtus and Neomys, 2001) and humans (Sapiens, 2001), the level of adrenalin in the blood can be used as a good indicator of stress in the tested subject. As shown by Fellini (in 2005) the level of adrenalin in human blood in normal conditions differs between individuals. To achieve comparable data, it is necessary to compare, not the actual level, but the changes in the level of these stress hormones for every tested individual. Bigger changes in the level of adrenalin suggest higher stress condition in the tested subject.

We expect that alternative delivery methods can reduce the stress of the mother and the child and this difference can be measured by means of stress hormone levels.

The results should point out the least stressful way of giving birth, and give a chance to develop the optimal method of conducting a delivery process by medical staff.

If no significant stress hormone level differences between the tested groups will be detected, we expect, that psychological tests performed before and after delivery can point out the methods mostly preferred by women and reliable in their long term psychological effect.

MATERIALS AND METHODS

The subjects of this study will be pregnant women and their newborn children. We will restrict our samples to women between the age of 25 to 35 years, healthy from medical point of view, with no complications during pregnancy, having their and second child (but not twin) by one of the tested methods. Birth mass of the tested children should be between 3000-4000 gr., reach at least 7 points on Apgar grade. Subjects will be informed about the project and necessary permissions obtained after the mother decides in what way she would like to deliver the baby. Data will be collected by the members of the European Association of Gynecologists and provided to the laboratory of the Environmental Science Fiction Group at the Jagiellonian University, in Kraków, Poland. Blood samples will be taken and analyzed in situ, by Prince Dracula Two Marks Method (Dracula et al., 1768) for adrenalin level. From preliminary and unpublished data we know that there is no significant correlation between the high androgen level during delivery and the level of adrenalin concentration in the blood, but to clearly exclude eventual influence of androgens, in our case mainly oxytocin, also the concentration of this hormone will be measured. The psychological picture of mothers (individual expectations and

feelings about the method and also the opinion after birth) before and after delivery will be drawn by group of independent psychologists, using the Universal Stress Test Questionnaire, sent to every cooperating gynecologist (see Freak, 2002).

Subjects will be divided into the following experimental groups, consisting of 100 mothers:

1. conventional delivery group (delivery without the father, standard hospital conditions)
2. family delivery group (delivery with the father present, standard hospital conditions)
3. home delivery group (delivery with members of family present, at least a qualified midwife present)
4. water delivery group (delivery in specially prepared pools, at least a qualified midwife present)
5. water delivery group with father (delivery in specially prepared pools, the father and at least a qualified midwife present)

Blood samples from the mothers will be taken two weeks to a month before the expected delivery and at the final stage of delivery process. First blood samples of the child will be taken from the umbilical cord as soon as possible (Nero, 2003), the second blood sample should be taken a day after birth.

Questionnaires will be provided to the cooperating gynecologist and handled to the mothers first, two weeks before the expected delivery and second, two weeks after delivery.

STATISTICAL ANALYSIS

To exclude eventual correlation of androgen level in the organism of the mother, correlation test between the level of oxytocin and adrenalin will be done. If any correlation will be found also influence of this hormone will be taken in account in later analysis. The changes in stress hormone levels in the mothers before and during delivery will be analyzed using ANOVA followed by post-hoc comparison across groups if ANOVA is significant. Similarly the data from the newborn right after birth and in their first day of life will be performed.

Questionnaires will be analyzed and graded according to the changes in stress level of the every tested individual using the Hitchcock Stress Scale (Hitchcock, 2003).

EXPECTED RESULTS

We expect significant differences in the adrenalin concentration changes during delivery process in the blood of the mothers in each experimental group. This would confirm the results of studies conducted on stressed animals. Expected differences in the changes of adrenalin level would confirm our hypothesis, that alternative or at least some alternative methods of delivery can lower the impact of stress on the mother and the newborn.

There is a high probability that no differences will be observed in the level of stress hormone in the newborn child, between tested groups. If any statistical differences will occur, one can assume, that psychological state of the mother can influence the stress level of the child.

On the other hand results showing no biological differences between the tested groups, are not negating the possible psychological effects not measurable by these methods.

In both cases data collected in our study will help to point out the possibly optimal delivery method for women.

EXPECTED COSTS

Equipment:

- Blood Sample Kits – 5000pcs.,
- Office materials,
- BMW motorbike, Volvo X-Country, Ferrari F 40 - for collecting data all over Europe,
- Silicon Graphics Workstation equipped with latest version of STATISTICA – storage and analysis of data,

- Three California Access laptops – for collecting data,

Salaries:

- Travel expenses,
- Payment for Psychologists Commission,
- salaries for the members of Environmental Science Fiction Group involved in the project.

PROJEKT BADAŃ

(wersja ostateczna/poprawiona)

Wpływ światła niebieskiego na szybkość regeneracji z kalusa i stężenie barwników – chlorofilu i antocyanów – w liściach trzykrotki (*Tradescantia sp*)



Katarzyna Hryniewiecka¹ i Marcela Kocianova²

¹Institut Botaniki UJ, Zakład Cytologii i Embriologii Roślin

²Institut Nauk o Środowisku UJ, Zakład Ekologii Zwierząt, kocian@eko.uj.edu.pl.

STRESZCZENIE

Długość fali świetlnej, czyli barwa światła ma istotny wpływ na wiele procesów fizjologicznych, szczególnie dla roślin rozmnażanych metodą kultur in vitro, ponieważ komórki w początkowym stadium regeneracji są szczególnie wrażliwe na działanie czynników fizycznych.

Badania nad hiacyntem (*Hyacinthus sp.*) i begonią (*Begonia x rex*) wykazały, że światło niebieskie ma znaczenie dla zawartości chlorofilu a, b i antocyjanów, a w konsekwencji ma wpływ na zmianę barwy liści na niebieską. Na podstawie tych badań planowane jest doświadczenie na trzykrotce (*Tradescantia* 'Little Violet'). Celem badań jest stwierdzenie wpływu światła niebieskiego na regenerację z kalusa i zmianę stężenia chlorofilu i antocyjanów w liściach.

WSTĘP

Światło w kulturach in vitro ma duże znaczenie. Wpływ światła o różnej długości fali ma zróżnicowane znaczenie nie tylko dla gatunków, ale też dla stopnia rozwoju czy pobranych eksplantatów. Np. światło czerwone sprzyja ukorzenianiu mikrosadzonek jabłoni, a hamuje regenerację liści sałaty z kalusa. Światło niebieskie sprzyja inicjowaniu różnicowania pędów oraz powoduje zwiększone wytwarzanie antocyjanów u hiacynta, a zmniejszone u begonii (Zenksteller M., 1995).

Przeprowadzono badania dotyczące stężenia chlorofilu i antocyjanów w liściach hiacynta (*Hyacinthus sp.*) i begonii (*Begonia x rex*) rozmnażanych w kulturach in vitro pod wpływem światła niebieskiego. Stwierdzono na podstawie analizy chromatograficznej i spektrofotometrycznej, że u hiacynta, który na świetle białym zawiera głównie chlorofil, na świetle niebieskim wzrastał poziom antocyjanów, a malał – chlorofilu, w wyniku czego liście uzyskiwały kolor niebieski (Bach et al., 1999). Natomiast u begonii, która w warunkach normalnych wykazuje wysoką zawartość antocyjanów, na świetle niebieskim wykazała wzrost zawartości chlorofilu, w wyniku czego jej liście przybrały barwę niebieską (Ptak et al., 1998). Efekt niebieskiej barwy liści utrzymywał się przez 2 tygodnie.

Na podstawie powyższych badań zostanie przeprowadzony eksperyment, który będzie miał na celu stwierdzenie, czy trzykrotka rozmnażana w kulturach in vitro pod wpływem światła niebieskiego będzie miała liście wybarwione na niebiesko oraz jak będzie kształtował się stosunek chlorofilu a do b oraz zawartość antocyjanów. Interesuje nas również, jak będzie kształtowała się zmiana stężeń barwników po obu różniących się od siebie zabarwieniem stronach liści. Badanie powierzchni asymilacyjnej liści dla obu rodzajów światła da nam obraz tego, jaki ma wpływ światło niebieskie na rozwój i szybkość regeneracji trzykrotki (światło białe

jest traktowane jako normalne warunki wzrostu). Literatura mówi, że światło niebieskie ma zróżnicowany wpływ na różne gatunki roślin, ich rozwój i wytwarzanie barwników (Bach, 1999, Szweykowska, 1974, Zenkteller, 1995). Istotny będzie także czas ekspozycji na światło niebieskie, dlatego kontrola zmian stężeń barwników i powierzchni asymilacyjnej liści będzie przeprowadzana co tydzień. Natężenie światła jest zastosowane zgodnie z zaleceniami autorów badań nad begonią i hiacyntem (Bach 1999, Ptak 1998).

Wyniki tego eksperymentu wzbogacą wiedzę teoretyczną, dotyczącą oddziaływania światła niebieskiego na formowanie roślin z kalusa, pozwolą stwierdzić, czy światło niebieskie ma korzystny wpływ na regenerację trzykrotki z kalusa i pomogą przy innych badaniach nad trzykrotką, poprzez ustalenie optymalnych warunków wzrostu i rozwoju tej rośliny w kulturach *in vitro*. Zmiana barwy liści lub jej brak będzie miała znaczenie dla hodowli nowych odmian.

Niniejszy projekt ma przetestować następujące hipotezy:

1. Pod wpływem światła niebieskiego lepsza jest regeneracja rośliny z kalusa mierzona wytworzeniem większej powierzchni asymilacyjnej liści i szybszym tempem regeneracji
2. Stosunek stężenia chlorofilu a do b i zawartość antocyjanów nie zmieni się w całej masie liści ze względu na zróżnicowanie dominacji chlorofilu po jednej, a antocyjanów po drugiej stronie liści

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

OBIEKT BADAŃ

Obiektem badań będzie trzykrotka (*Tradescantia*) odmiany 'Little Violet', której cechą typową jest silne wybarwienie liści przez antocyjany. Badana odmiana charakteryzuje się tym, że górna strona liścia jest bordowa, co związane jest z wysokim stężeniem antocyjanów, a dolna jest zielono – fioletowa, co wiąże się z większym stężeniem chlorofilu.

DOŚWIADCZENIE

Doświadczenie zostanie przeprowadzone w laboratorium kultur *in vitro* w Zakładzie Cytologii i Embriologii UJ.

Eksplantatem inicjalnym będą pąki liściowe *Tradescantia* 'Little Violet'. Po odkażeniu w Chloraminie T fragmety pąków zostaną przeniesione w warunkach sterylnych na pożywkę zalecaną dla begonii ze względu na podobną intensywność regeneracji (Ptak et al., 1998).

Następnie kalus trzykrotki zostanie wystawiony na działanie światła niebieskiego o długości fali 500 nm emitowanego przez świetlówkę Philips o natężeniu 400 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, światło białe, które będzie stanowiło kontrolę, o natężeniu 400 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ przez 12 godzin na dobę.

Przez 6 tygodni raz w tygodniu będzie pobierane po jednej kolbce wystawionej na działanie światła niebieskiego i białego. Najpierw zostanie wykonany pomiar powierzchni asymilacyjnej liści spod obu rodzajów światła za pomocą urządzenia Area LI Meter. Na materiale z tych kolbek będzie wykonana analiza chromatograficzna antocyjanów i spektrofotometryczna chlorofilu a i b metodą polecaną przez B. Samotusa (Samotus, 1997). Następnie otrzymane stężenie chlorofilu a dla każdej rośliny podzielimy przez stężenie chlorofilu b oraz obliczymy sumę antocyjanów w materiale roślinnym. Takie dane otrzymamy raz w tygodniu dla 5 roślin pozostających pod wpływem światła niebieskiego i 5 spod światła białego (w kolbkach będzie po 10 roślin w celu wyeliminowania strat związanych np. z zakażeniem).

ANALIZA STATYSTYCZNA DANYCH

Otrzymane w wyniku analiz chemicznych dane dotyczące stężenia chlorofilu a i b zostaną przedstawione jako stosunek chlorofilu a do b. Ponadto zostanie zbadane stężenie antocyjanów. Czynnikiem pierwszym będzie stanowiło światło niebieskie, czynnikiem drugim – czas ekspozycji na

światło w tygodniach. Zostanie przeprowadzona dwukrotna analiza wariancji dwuczynnikowa oraz zostaną obliczone korelacje między stężeniami chlorofilu i antocyjanów, między powierzchnią liści a barwą światła i powierzchnią a czasem ekspozycji na światło (Łomnicki 1995).

MATERIAŁY

1. kolbki o pojemności 50 ml
2. zestaw mikro- i makroelementów z witaminami wg Murashige i Skooga
3. agar
4. sacharoza
5. regulatory wzrostu: IBA, BAP
6. świetlówki Philips emitujące światło niebieskie i białe
7. odczynniki do ekstrakcji barwników
8. jednorazowe nożyki do cięcia materiału
9. materiał wyjściowy – trzykrotka doniczkowana
10. Area LI Meter – urządzenie do pomiaru powierzchni asymilacyjnej liści

Oczekiwane wyniki

1. Trzykrotka nie zmieni barwy liści pod wpływem światła niebieskiego.
2. Będzie lepiej regenerowała z kalusa pod światłem niebieskim, tzn pod tym światłem w każdym tygodniu powierzchnia asymilacyjna liści będzie większa niż pod światłem białym.

Literatura

1. Bach a., M. Kulig & Warchoń M., 1999. Wpływ światła niebieskiego na wybarwienie pędów i liści u hiacynta. Materiały z Konferencji Naukowej pt Postęp w rozmnażaniu roślin metodą kultur in vitro. Kraków AR
2. Łomnicki A., 1995. Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników. PWN Warszawa
3. Ptak A., M. Warchoń & Pindel Z., 1998. Rozwój liści u begonii oraz ich wybarwienie pod wpływem światła niebieskiego, czerwonego i białego. Materiały z Konferencji Naukowej pt Rola światła w kulturach in vitro. Kraków AR
4. Samotus B., 1997. Biochemia dla rolników cz. II. Skrypt AR
5. Szweykowska A i J. Szweykowski, 1974. Botanika PWN Warszawa
6. Zenkteller M., 1995. Kultury tkankowe roślin PWN Warszawa

