



Toruń, 16.06.2015

dr hab. Jarosław Kobak  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Zakład Zoologii Bezkręgowców  
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Hegele-Drywy  
„Krabik amerykański *Rhithropanopeus harrisii* (Gould, 1841) z Zatoki Gdańskiej  
(południowy Bałtyk): rozmieszczenie, struktura populacji i podstawowe procesy  
fizjologiczne” (promotor: dr hab. Monika Normant, prof. UG)**

Recenzowana rozprawa składa się z czterech artykułów naukowych – trzech opublikowanych i jednego przyjętego do druku (z załączonym stosownym oświadczeniem redakcji) w czasopismach umieszczonych na liście Journal Citation Reports. Dwie prace ukazały się w czasopiśmie *Oceanologia* (IF 2013 = 0,927, 20 pkt MNiSW w roku 2014), a dwie kolejne – w *Oceanological and Hydrobiological Studies* (IF 2013 = 0,867, 15 pkt MNiSW w roku 2014). Artykuły opatrzone są odpowiednimi zaświadczeniami współautorów, informującymi o ich wkładzie ilościowym i jakościowym w przeprowadzone badania. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą i korespondencyjną autorką (spośród 2-4 autorów), a jej wkład w każdą z prac został oszacowany na 70%. Z całą pewnością można więc powiedzieć, że miała Ona dominujący udział w badaniach stanowiących podstawę niniejszej rozprawy. Rozprawa jest zaopatrzona w ogólne, 5-stronnicowe streszczenia w języku polskim i angielskim, ukazujące powiązania między poszczególnymi artykułami i łączące je w spójny cykl tematyczny.

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że nowa forma przedstawienia rozprawy doktorskiej w oparciu o cykl opublikowanych prac (możliwa na podstawie art. 13 ust. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14 marca 2003, Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), zasługuje na duże uznanie, jako podnosząca znaczenie wykonanych badań, zwiększająca ich dostępność dla badaczy z całego świata i umożliwiająca zaistnienie w międzynarodowym obiegu naukowym. Ponadto, taka forma pracy wskazuje na dodatkowy atut Doktorantki: umiejętność pracy w zespole, co jest niezbędnym elementem warsztatu współczesnego badacza. Doktorantka poddała się ocenie recenzentów czasopism naukowych o międzynarodowym zasięgu, zapewniając w ten sposób wysoką jakość rozprawy. W związku z tym, stronę formalną pracy oceniam bardzo wysoko.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat nastąpiło gwałtowne przyspieszenie i zwiększenie intensywności inwazji biologicznych, głównie ze względu na globalizację transportu i handlu oraz coraz większy wpływ człowieka na środowisko naturalne. Inwazje biologiczne są uważane za jedno z największych zagrożeń dla światowej bioróżnorodności, a także przyczynę znacznych strat ekonomicznych. Zagadnienia związane z rozprzestrzenianiem się obcych gatunków są szczególnie ważne dla Polski, przez którą przebiega jeden z głównych korytarzy ekologicznych, za pomocą których obce gatunki migrują na zachód Europy (tzw.

korytarz centralny, prowadzący przez Dniepr, Bug, Wisłę i Odrę aż do Renu). W kontekście znaczenia inwazji biologicznych dla Polski ważny jest również dostęp do Morza Bałtyckiego, które, ze względu na swój młody wiek, niską rodzimą bioróżnorodność i stosunkowo niskie zasolenie stanowi wyjątkowo dogodne miejsce dla rozwoju obcych organizmów. Pochodzący z Ameryki Północnej krabik amerykański *Rhithropanopeus harrisi* jest jednym z wielu obcych gatunków, jakie pojawiły się w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat w polskich wodach Bałtyku. Jak dotąd badania nad tym gatunkiem, zwłaszcza dotyczące jego nierodzimych populacji, były dosyć fragmentaryczne i dotyczyły tylko niektórych aspektów jego biologii. Tymczasem dokładne poznanie biologii obcego organizmu jest niezbędne dla określenia jego funkcjonowania w środowisku, potencjału inwazyjnego i wpływu na otoczenie. Należy zwrócić uwagę, że obcy gatunek może na nowym terenie funkcjonować w sposób odmienny od opisywanego dla jego rodzimego zasięgu, osiągając inne rozmiary i zagęszczenia, a także wykazując trudny do przewidzenia wpływ na środowisko. Dlatego tak ważne są podjęte przez Doktorantkę 5-letnie, kompleksowe i multidyscyplinarne badania nad nowo powstałymi populacjami *R. harrisi* w Zatoce Gdańskiej. Rozprawa łączy ze sobą ekologię, morfologię, fizjologię i genetykę tego gatunku, które były badane za pomocą różnorodnych metod, takich jak pobór tradycyjnych prób terenowych, eksperymenty laboratoryjne i analizy molekularne. Takie podejście, łączące ze sobą różne dziedziny wiedzy i wykorzystujące techniki molekularne oraz perspektywę fizjologiczną w badaniach ekologicznych, pozwala na pełne, wieloaspektowe poznanie rozpatrywanego zagadnienia i zdobycie pełnej wiedzy na temat funkcjonowania i roli badanego gatunku w środowisku. Dlatego zarówno wybór tematu, jak i warsztat badawczy Doktorantki oceniam bardzo wysoko.

Artykuły wchodzące w skład rozprawy dotyczą różnych aspektów biologii *R. harrisi*, a kolejne prace rozwijają i uzupełniają wątki podjęte w poprzednich badaniach, co wskazuje na dobrze przemyślany i konsekwentnie realizowany plan. W szczególności:

- Artykuł #1 omawia rozmieszczenie poziome i pionowe, a także fenologię *R. harrisi* w Zatoce Gdańskiej.
- Artykuł #2 dotyczy struktury wiekowo-płciowej populacji, kondycji fizycznej i morfologii *R. harrisi*, w tym zależności allometrycznych między cechami biometrycznymi.
- Artykuł #3 opisuje procesy fizjologiczne *R. harrisi* związane z odżywianiem się, wydalaniem, metabolizmem i produkcją w zależności od temperatury otoczenia.
- Artykuł #4 poświęcony jest analizie genetycznej struktury populacji *R. harrisi* oraz przepływu genów między sąsiadującymi populacjami.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy należy zaliczyć:

1. Określenie maksymalnej głębokości występowania *R. harrisi* w Zatoce Gdańskiej oraz zależności ich rozmieszczenia od temperatury i pory roku.
2. Stwierdzenie dobrej kondycji badanych populacji *R. harrisi*, przejawiającej się szybkim wzrostem, znacznym potencjałem rozrodczym i dużą liczebnością młodych osobników.
3. Opisanie maksymalnych rozmiarów i zależności allometrycznych między różnymi cechami mierzalnymi w nierodzimych populacjach *R. harrisi* w zależności od płci.

4. Wykazanie, że warunki termiczne panujące w Zatoce Gdańskiej są korzystne dla funkcjonowania *R. harrisii* z fizjologicznego punktu widzenia i umożliwiają wydajną asymilację pokarmu oraz wysokie tempo produkcji osobniczej.
5. Określenie wpływu zmian temperatury w zakresie obserwowanym w warunkach terenowych na bioenergetykę *R. harrisii*.
6. Wykazanie lokalnego źródła pochodzenia badanych populacji *R. harrisii* z pobliskich, wcześniej zasiedlonych rejonów – Zalewu Wiślanego i martwej Wisły, chociaż niewykluczony jest również dopływ propagul spoza Bałtyku.
7. Wykazanie ograniczonego przepływu genów między sąsiadującymi populacjami *R. harrisii* pomimo niewielkich odległości między nimi, co warunkuje duże zróżnicowanie genetyczne tego gatunku w małej skali przestrzennej.

Dzięki wynikom uzyskanym przez Doktorantkę stan poznania populacji *R. harrisii* z Zatoki Gdańskiej uległ znacznej poprawie, co z pewnością ułatwi prognozowanie jego dalszej ekspansji i określenie wpływu na otoczenie, a także dostarczy bogatego materiału porównawczego dla badaczy innych populacji tego i pokrewnych gatunków. Szczególnie ważny jest w tej sytuacji fakt, że wyniki badań są już dostępne w literaturze światowej, co umożliwia ich wykorzystanie przez innych badaczy.

Opublikowane artykuły podlegały już recenzjom wydawniczym, przez co wolne są od większości uchybień i błędów technicznych, zwykle pojawiających się w pracach mających postać maszynopisu. Znacznie ułatwia to pracę recenzenta na obecnym etapie. Tym niemniej, moim obowiązkiem jest również wskazanie mankamentów ocenianej rozprawy. Podczas lektury prac wchodzących w jej skład, zauważyłem szereg drobnych niedociągnięć i spraw wymagających wyjaśnienia. Poniżej przedstawiam listę szczegółowych komentarzy do poszczególnych części recenzowanego tekstu, które mogą być potraktowane jako kwestie do dyskusji lub porady na przyszłość.

1. Artykuł 1. Dla stanowisk w Zatoce Puckiej i w Gdańsku podany jest typ podłoża, natomiast brakuje tej informacji dla stanowisk w Gdyni i Sopocie. Nie ma też wyników pomiarów zasolenia, które, według informacji podanej w opisie metod, było badane.
2. Artykuł #1. Występowanie innych gatunków bentosowych powinno być również określone na stanowiskach, na których krab nie występował i/lub korelowane z jego liczebnością. Bez tego trudno jest stwierdzić, czy ich obecność jest powiązana z rozmieszczeniem *R. harrisii*. Dlatego wniosek o braku negatywnego wpływu *R. harrisii* na lokalne zespoły fauny (strona 135, dyskusja) nie może być wyciągnięty na podstawie przedstawionych wyników.
3. Artykuł #1. Zbadane zostały liczebności krabów na dwóch profilach głębokościowych, ze stanowiskami na głębokościach 10, 14 i 17 m oraz 8, 10 i 15 m. Rys. 3 przedstawia dane dla obu profili łącznie, sumując wartości z obu stanowisk o głębokości 10 m. Należałoby uwzględnić fakt, że próba była tu dwukrotnie większa niż na pozostałych głębokościach.
4. Artykuł #1. Do pełnego obrazu rozmieszczenia pionowego *R. harrisii* brakuje prób zebranych na płytkich, przybrzeżnych stanowiskach, chociaż Autorka wspomina w dyskusji o możliwości występowania krabów w takich miejscach.



5. Artykuł #1 i 2. Prace zawierają informacje i wnioski na temat liczebności osobników juvenilnych oraz porównanie wyników Autorki w tym zakresie z innymi pracami naukowymi. W tej kwestii mam kilka wątpliwości:
  - a. Podział osobników na juvenilne i dorosłe został dokonany na podstawie rozmiarów ciała, przy czym osobniki o szerokości karapaksu poniżej 4,4 mm są kwalifikowane jako juvenilne. Metoda ta jest poparta stosowną literaturą (Turoboyski 1973), jednak wydaje mi się, że oczekiwanie, iż wszystkie osobniki juvenilne osiągną nagle dojrzałość po osiągnięciu określonego rozmiaru i że rozmiar ten będzie taki sam jak w innej populacji badanej 40 lat temu, jest mało realistyczne. Tak więc, jeżeli nie była określana dojrzałość narządów płciowych, za bardziej właściwy uważam podział na klasy wielkościowe – wyróżnienie osobników małych i dużych.
  - b. Czy można uznać wyniki dotyczące osobników juvenilnych za ilościowe, jeżeli rozmiar graniczny dla osobnika juvenilnego to 4,4 mm, a do poboru prób stosowana była draga o oczkach siatki 5 mm?
  - c. Czy można porównywać ze sobą wyniki różnych badań, w których stosowano odmienne kryteria podziału na osobniki juvenilne i dorosłe (różne rozmiary graniczne) i różne metody poboru prób (w tym bardzo selektywne pod tym względem narzędzia pułapkowe)?
  - d. Jeżeli osobników juvenilnych jest 31% (str. 134 Artykułu #1), to nie można twierdzić, że dominowały one w próbach. Mogło być ich stosunkowo więcej niż na innych stanowiskach, w innych terminach lub w innych, porównywalnych badaniach, ale to nie to samo.
6. Artykuł #1. W pracy brakuje mi analizy wielowymiarowej (np. regresji wielorakiej) korelującej występowanie *R. harrisii* z badanymi czynnikami środowiskowymi (temperatura, głębokość, zasolenie, inne organizmy, typ podłoża). Moim zdaniem pozwoliłoby na lepsze wykorzystanie bardzo wartościowych danych.
7. Artykuł #2. Na stronie 808 (opis metod) znajduje się informacja o badaniu występowania u badanych krabów pasożyta z gromady Rhizocephala. Natomiast nie ma w pracy ani słowa na temat wyników tych badań. Skoro jest o tym mowa w opisie metod, powinny zostać również przedstawione wyniki, nawet jeżeli są negatywne (tzn. pasożyty nie zostały stwierdzone u żadnego osobnika).
8. Artykuł #2. Na str. 809 (opis metod) i 810-812 (wyniki) podane są informacje na temat przeprowadzonej analizy zależności allometrycznych między mierzonymi cechami morfologicznymi. Mam kilka uwag i pytań do tej części:
  - a. Wzór funkcji potęgowej (str. 809) jest podany w postaci „ $y = axb$ ” – nie jest zaznaczone, że  $b$  jest wykładnikiem potęgi (powinno być „ $y = ax^{b''}$ ”).
  - b. Określenie „istotność statystyczna  $b$ ” („statistical significance of  $b$ ”) (str. 809) jest niejasne. Jaka dokładnie hipoteza zerowa była testowana:  $b = 0$ ,  $b = 1$ , czy jeszcze coś innego? Z kontekstu wynika, że chyba chodzi o drugą opcję, jednak powinno to być jasno przedstawione.
  - c. W analizie zależności allometrycznych między pomiarami biometrycznymi mamy do czynienia z dwiema zmiennymi losowymi o rozkładzie normalnym, mierzonymi przez badacza. Nie da się tu wyróżnić zmiennej niezależnej, której wartości są ustalone przez badacza i która wpływa na drugą zmienną – zależną (losową). W takiej sytuacji

- do określenia zależności między zmiennymi lepiej jest zastosować model regresji osi głównej zredukowanej, zamiast zwykłej metody najmniejszych kwadratów.
- d. W tekście są informacje na temat izometryczności lub jej braku w poszczególnych przypadkach (str. 810), jednak nie ma wyników testów statystycznych, które to potwierdzają.
  - e. Brakuje porównań współczynników allometrycznych (czyli nachyleń prostych regresji dla danych zlogarytmowanych) między poszczególnymi grupami (samcami i samicami). Takie porównania dostarczają precyzyjniejszych informacji niż badania zwykłych stosunków między różnymi zmiennymi. Warto zwrócić uwagę, że jeśli w poszczególnych grupach stwierdzone zostaną różne zależności allometryczne dla tej cechy (tzn. współczynniki allometryczne  $b$  różnią się istotnie między sobą), proste porównanie wartości cechy między grupami traci sens. Wtedy linie regresji dla obu grup krzyżują się i nie można mówić, że w jednej z tych grup wartości cechy są większe niż w drugiej, albo że grupy nie różnią się między sobą. Prawdopodobnie z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku długości szczypiec (Rys. 4) (duże samce mają stosunkowo dłuższe szczypce od dużych samic, a wśród małych osobników zależność ta zanika).
  - f. Równanie na górze strony 812 (zależność między szerokością karapaksu CW i mokrą masą WW) wydaje się błędnie napisane (zamienione są obie zmienne). Pomiar liniowy (CW) powinien zależeć od masy (WW) podniesionej do potęgi  $\approx 1/3$ , a nie  $\approx 3$ . Poza tym, jeżeli zależności allometryczne między tymi zmiennymi są różne dla obu płci, to obliczanie wspólnego równania dla wszystkich osobników nie jest potrzebne.
9. Artykuł #2-3. Raportując wyniki testów statystycznych, należy podać nazwę testu, odpowiednią statystykę (zwykle z liczbą stopni swobody lub wielkością próby) i wartość poziomu istotności – samo „p” nie wystarczy. Proponowałbym również podawanie dokładnych wartości poziomu istotności zamiast zakresów (takich jak np. „ $p < 0,05$ ”).
  10. Artykuł #2. Odstępstwo stosunku płci od układu 1:1 (wyniki, str. 809) powinno zostać wykazane za pomocą testu statystycznego (np.  $\chi^2$  zgodności rozkładu). Bez tego nie można wyciągać wniosku o przewadze samców nad samicami (dyskusja, str. 813).
  11. Artykuł #2. Na str. 813 (dyskusja) podana jest informacja, że badany gatunek nie wpływa na miejscowe zespoły organizmów. Na potwierdzenie zacytowana jest publikacja, która wchodzi w skład niniejszej rozprawy jako Artykuł #1. Jednak moim zdaniem w tamtej pracy nie ma wyników pozwalających na wyciągnięcie takiego wniosku (cf. moja uwaga #2).
  12. Artykuł #3. W jaki sposób badana była aktywność lokomotoryczna (metody, str. 220)? Czy były to tylko jakościowe obserwacje czy bardziej formalna analiza?
  13. Artykuł #3. Metody, str. 221. Jaka była ilość pożywienia podawanego krabom w badaniach nad tempem pobierania pokarmu?
  14. Artykuł #3. Nie wiadomo, jakie procesy były testowane za pomocą analizy regresji, o której jest mowa w opisie zastosowanych metod statystycznych (str. 221). W rozdziale Wyniki nie ma żadnych wyników takiej analizy.
  15. Artykuł #3. Test Wilcoxon mógł być zastosowany do porównania reakcji krabów w obu temperaturach, o ile te same osobniki były badane kolejno w poszczególnych wariantach

- temperaturowych. Nie wiadomo natomiast, jaki test został wykorzystany do porównania krabów sytych i głodzonych – to musiały być różne osobniki, więc test Wilcoxon dla danych sparowanych nie ma tu zastosowania.
16. Artykuł #3. Dyskusja, str. 225. Na podstawie przedstawionych wyników nie można stwierdzić, że temperatura 20 °C jest optymalna dla *R. harrisii*, ponieważ nie wiemy, jak wyglądałyby jego reakcje przy jeszcze wyższych wartościach temperatury. Można tylko powiedzieć, że temperatura 20 °C jest dla tego gatunku lepsza niż 15 °C.
  17. Artykuł #4. Wstęp, str. 5. Hipoteza mówiąca o retencji larw jako przyczynie zróżnicowania genetycznego badanego gatunku nie była testowana w pracy. Należałoby się tutaj ograniczyć do hipotezy o zróżnicowaniu genetycznym między sąsiednimi populacjami, bez wnikania w konkretne przyczyny tego zjawiska.
  18. Artykuł #4. Wyniki, str. 10. Co oznacza zdanie, że wynik dla zmienności wewnątrz populacji jest nieistotny statystycznie (i co oznaczałoby istotność takiego wyniku)?
  19. Artykuł #4. Podział populacji na regiony powinien być wprowadzony i uzasadniony w opisie analizy AMOVA w rozdziale Materiały i metody, a nie dopiero tutaj.
  20. Artykuł #4. Dyskusja, str. 15. Autorka pisze: “Among other adaptations, this is manifested in inter-population genetic differentiation.” Adaptacją jest cecha wykształcona w procesie doboru naturalnego, która zwiększa dostosowanie osobnika do warunków środowiskowych. W związku z tym, zróżnicowanie genetyczne samo w sobie nie może być uznane za adaptację (przystosowanie), chociaż może sprzyjać powstawaniu adaptacji.

Powyższe uwagi krytyczne dotyczą głównie kwestii szczegółowych i nie zmieniają mojej ogólnej wysokiej oceny całej rozprawy, która stanowi cenny wkład w literaturę światową dotyczącą inwazji biologicznych, funkcjonowania ekosystemów morskich i zoologii bezkręgowców.

Stwierdzam, że rozprawa Pani mgr Joanny Hegele-Drywy spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawie doktorskiej przez ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (z 14 marca 2003, Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Doktorantka zaprezentowała dużą wiedzę teoretyczną, wysoki poziom warsztatu naukowego oraz znajomość różnorodnych metod badawczych, co świadczy o jej dojrzałości naukowej i umiejętności samodzielnego prowadzenia badań. Dzięki temu, przedstawiona do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. W związku z tym, wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jarosław Kobak