

1. Streszczenie

Relacje ekologiczne pomiędzy gatunkami, takie jak konkurencja, mogą ulec znacznemu skomplikowaniu, jeśli gatunki mają wspólnego konsumenta (drapieżnika/roślinożercę). Interakcje pośrednie znajdują się w centrum szerokiego obszaru badań związanych z interakcjami pomiędzy roślinami a roślinożercami, koncentrujących się na tzw. efektach sąsiedztwa. Przykładowo, obecność roślin wyposażonych w skuteczne przystosowania do odstraszenia roślinożerców może zmniejszać ich presję nie tylko na chronione rośliny, ale i na ich pozbawionych takich adaptacji sąsiadów (tzw. 'sąsiedzka odporność', ang. *associational resistance*). Z drugiej strony, nawet wyposażona w silne środki ochrony przed roślinożercami roślina może cierpieć z powodu zintensyfikowanego zaatakowania/zgryzania, jeśli jej otoczenie jest zdominowane przez gatunki pozbawione ochrony. Tego typu interakcje osłabiające efektywność adaptacji chroniących przed konsumentami określa się mianem 'sąsiedzkiego narażenia' (ang. *associational susceptibility*). W przypadku zwierząt, z licznych interakcji pomiędzy różnymi gatunkami pośredniczonych przez współdzielone drapieżniki szczególnie wyróżnia się zjawisko mimikry. Najbardziej znaną odmianą mimikry jest mimikra batesowska, w której sygnał ostrzegawczy (aposematyczny) organizmu posiadającego skuteczne adaptacje przeciwdrapieżnicze (modela) jest imitowany przez pozbawionego takich adaptacji naśladowcę. Zmniejszone ryzyko śmierci w wyniku ataku ze strony drapieżnika przekłada się na zwiększone dostosowanie u naśladowcy sygnału. Co ważne, eksperymenty mające na celu odzwierciedlenie wczesnych etapów ewolucji mimikry Batesowskiej wskazują, że jadalne ofiary napotymane przez drapieżniki w sąsiedztwie aposematycznych modeli mają zwiększone prawdopodobieństwo przeżycia, nawet jeśli nie imitują ich sygnału ostrzegawczego. Takie interakcje są analogiczne do wspomnianych wyżej efektów sąsiedztwa u roślin. Publikacje eksperymentalne dotyczące takich układów pozostają jednak nieliczne; w dalszym ciągu brakuje badań eksperymentalnych nad uwarunkowaniami i efektywnością interakcji na styku mimikry i 'efektów sąsiedztwa'.

Dobrym modelem do badań zarówno nad interakcjami pośrednimi dotyczącymi ofiar wykorzystujących różne strategie przeciwdrapieżnicze a ich współdzielonymi drapieżnikami są larwy płazów bezogonowych. Występowanie larw poszczególnych

gatunków europejskich płazów bezogonowych rozkłada się wzdłuż gradientu stałości siedliska: im bardziej efemeryczne jest siedlisko wodne, tym występujące w nim larwy płazów bezogonowych mają słabsze mechanizmy przeciwdrapieżnicze, wśród których dominują mechanizmy obrony indukowanej (behawioralne i morfologiczne). Z kolei larwy gatunków rozradzających się w zbiornikach stałych często korzystają z konstytutywnej obrony chemicznej. Segregacja siedliskowa nie jest jednak pełna: niektóre gatunki regularnie podchodzą do rozrodu w zbiornikach zasiedlonych przez ryby pomimo niskiego sukcesu rozrodczego mierzonego liczbą przeobrażonych osobników. Efektem niedoskonałej segregacji siedliskowej może być współwystępowanie zbliżonych do siebie morfologicznie ofiar (tj. larw różnych gatunków płazów bezogonowych) wykorzystujących diametralnie różne strategie przeciwdrapieżnicze (tj. wrodzona obrona chemiczna kontra indukowane strategie behawioralne i morfologiczne) w siedliskach zajętych przez ryby pełniące funkcję drapieżników. W takiej sytuacji pojawia się potencjał do wystąpienia oddziaływań pośrednich – larwy różnych gatunków mogą nie tylko bezpośrednio konkurować ze sobą o zasoby, ale i wpływać na siebie np. przez modyfikację zachowania współdzielonych drapieżników.

Nasuwa się zatem pytanie, czy przynajmniej w niektórych okolicznościach u współwystępujących ze sobą larw europejskich płazów bezogonowych nie mogą pojawiać się interakcje pośrednie analogiczne do efektów sąsiedztwa u roślin, generujące efekty zbliżone do tych będących wynikiem klasycznej mimikry batesowskiej. Aby zbadać to zagadnienie, przeprowadzono serię doświadczeń w formie eksperymentów z wykorzystaniem zanurzonych w stawach eksperymentalnych zagród, w których utrzymywano, w różnych względnych i bezwzględnych zagęszczeniach, larwy płazów bezogonowych o różnych strategiach przeciwdrapieżniczych i różnej fenologii rozwoju w obecności lub pod nieobecność ryb pełniących funkcję współdzielonych drapieżników, mających dostęp do zróżnicowanej ilości alternatywnego pożywienia.

Głównym celem **Eksperymentu 1** (Kaczmarek et al., 2018) było sprawdzenie, czy w obecności ryb (karp, *Cyprinus carpio*) pomiędzy wyposażonymi w obronę chemiczną larwami ropuchy szarej *Bufo bufo* a pozbawionymi takiej strategii obronnej larwami żaby trawnej *Rana temporaria* wystąpi ‘sąsiedzka odporność’. W takim przypadku należałoby się spodziewać, że zwiększona przeżywalność larw żaby trawnej będzie zależna od występowania wysokich zagęszczeń larw ropuchy szarej. W

eksperymentcie wykorzystano zagrody z gradientem względnego zagęszczenia larw obu gatunków płazów (przy zachowaniu stałego bezwzględnego zagęszczenia, tj. 40 larw/zagrodę). W grupie eksperymentalnej w każdej z zagród wraz z larwami płazów przebywał pojedynczy osobnik karpia, mający dostęp do alternatywnego pożywienia (gotowa pasza dla ryb). Zagrody były zasiedlane larwami płazów w ok. 25 stadium Gosnera i funkcjonowały aż do przeobrażenia się larw. Wykazano, że obecność ryb redukowała przeżywalność zarówno larw żaby trawnej, jak i ropuchy szarej, przy czym efekt dla żaby trawnej był znacznie silniejszy. Co ważne, w obecności ryb przeżywalność obu gatunków była istotnie wyższa, gdy względne zagęszczenie larw ropuchy szarej rosło. Może to świadczyć o występowaniu ‘sąsiedzkiej odporności’ – będąc względnie nielicznymi pośród larw ropuchy szarej, larwy żaby trawnej były w stanie przetrwać pomimo teoretycznie bardzo intensywnej presji drapieżnika.

Głównym celem **Eksperymentu 2** (Kaczmarek et al., 2020) było przetestowanie, czy w podobnym układzie może wystąpić ‘sąsiedzkie narażenie’. W takiej sytuacji należałoby się spodziewać, że przeżywalność larw ropuchy szarej będzie obniżona w sytuacji, gdy występują one w niskim względnym zagęszczeniu w stosunku do larw żaby trawnej. Aby wyeliminować potencjalny efekt bezwzględnego zagęszczenia larw ropuchy szarej – wyższe zagęszczenia toksycznych ofiar z reguły przekładają się na wzrost efektywności tej formy obrony przeciwdrapieżniczej – w Eksperymentcie 2 wykorzystano gradient względnego zagęszczenia tego gatunku w stosunku do larw żaby trawnej przy utrzymaniu stałego zagęszczenia bezwzględnego: w zagrodach utrzymywano larwy ropuchy szarej w stałym zagęszczeniu 30 os./m², przy zmiennym zagęszczeniu larw żaby trawnej (0-60 os./m²). W innej części eksperymentu, aby zweryfikować hipotezę o zależności efektywności obrony chemicznej od zagęszczenia, wykorzystano również gradient bezwzględnego zagęszczenia larw ropuchy szarej w układach jednogatunkowych (5-80 os./m²). W przypadku obu gradientów z larwami płazów bezogonowych w zagrodach przebywały pojedyncze osobniki karpia, otrzymujące alternatywne pożywienie (pasza dla ryb) na dwóch różnych poziomach dostępności. Wykazano, że przeżywalność larw ropuchy szarej rośnie wraz ze wzrostem ich zagęszczenia – zarówno bezwzględnego w układach jednogatunkowych, jak i względnego w układach z pozbawionymi obrony chemicznej larwami żaby trawnej. Świadczy to z jednej strony o wpływie zagęszczenia toksycznych ofiar na skuteczność obrony chemicznej, a z drugiej strony – wskazuje na możliwość występowania „sąsiedzkiego narażenia”, gdy toksyczne ofiary występują stosunkowo

rzadko w zgrupowaniu zdominowanym przez zbliżone pokrojem gatunki pozbawione takiej formy ochrony przeciwdrapieżniczej.

W ramach **Eksperymentu 3** (Kaczmarek et al., 2021) testowano, czy występująca pomiędzy larwami żaby trawnej a larwami ropuchy szarej „sąsiedzka odporność” może ulegać rozszerzeniu również na fenologicznie późniejsze larwy płazów, u których większość rozwoju przypada na okres już po opuszczeniu wody przez przeobrażone ropuchy szare. Wykorzystano zagrody eksperymentalne, które wcześniej w sezonie były używane w **Eksperymencie 1** lub **Eksperymencie 2** i zawierały larwy ropuchy szarej i żaby trawnej w zmiennym względnym i całkowitym zagęszczeniu oraz po pojedynczym osobniku karpia. Po zamknięciu poprzednich eksperymentów, do zagród zawierających te same osobniki karpia wpuszczano larwy żaby śmieszki *Pelophylax ridibundus* (rozmiarami nie przekraczające wielkością rozwiniętych larw ropuchy szarej). Po upływie 14 dni larwy odławiano i zliczano, następnie określano ich przeżywalność w odniesieniu do względnego i bezwzględnego zagęszczenia ropuchy szarej, a także przeżywalności larw żaby trawnej oraz ropuchy szarej, na wcześniejszym etapie eksperymentu. Nie stwierdzono jednak żadnych istotnych statystycznie zależności – śmiertelność larw żaby śmieszki w obecności ryb była bardzo wysoka. Nie wydaje się więc, by wpływ potencjalnego „parasola ochronnego” roztaczanego przez toksyczne larwy ropuchy szarej na larwy innych gatunków płazów był na tyle trwały, by wpływać na późniejsze fenologicznie gatunki.

Dodatkowo, w ramach Eksperymentu 1 i Eksperymentu 2 analizowano również masę ciała przeobrażonych osobników płazów. Masa ciała może być traktowana jako wskaźnik nasilenia konkurencji wewnątrz- i międzygatunkowej między larwami płazów bezogonowych. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniej publikowanymi pracami dotyczącymi konkurencji pomiędzy larwami obu wykorzystanych w eksperymentach gatunków płazów.

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doświadczenia wskazują, że efekty sąsiedztwa w interakcjach pomiędzy zwierzętami – ofiarami o różnych strategiach przeciwdrapieżniczych a zagrażającym im drapieżnikami – mogą dawać wymierne efekty ekologiczne, wpływając np. na skład gatunkowy kohorty przeobrażonych w danym roku płazów. Na przykładzie interakcji pomiędzy współwystępującymi gatunkami płazów wykazano, że skład gatunkowy zespołu ofiar może mieć istotny wpływ na przeżywalność poszczególnych gatunków nań się składających, nawet jeśli w układzie nie występują bardziej złożone zależności w

rodzaju mimikry batesowskiej. Skład gatunkowy zespołu ofiar może zarówno ułatwiać, jak i utrudniać ewolucję ubarwienia aposematycznego oraz różnych form mimikry. Pozornie nietrwały efekt względnego zagęszczenia różnych typów ofiar może mieć zatem poważne konsekwencje ekologiczne i ewolucyjne.

2. Summary

Ecological interactions between species, like interspecific competition, may become additionally complicated when a shared consumer (predator/herbivore) is present in the system. Such indirect interactions are in focus of a broad research area concentrating on interactions between plants and herbivores – the so-called associational, or neighbour, effects. For example, the mere presence of well-defended plants may reduce herbivore pressure not only on themselves, but also on their neighbours lacking defences, in the process known as associational resistance. On the other hand, even a well-defended plant may suffer from increased consumption if it is surrounded by palatable neighbours. Such interactions, weakening the efficacy of defences are coined under the term of associational susceptibility. In case of animals, mimicry is one of the best known examples of indirect interactions between two or more prey species sharing a common predator. In Batesian mimicry, the aposematic signal of the defended species (the model) is imitated by a species lacking defences (the mimic). The reduced risk of lethal attack from the shared predator leads to increased fitness in the mimic. Importantly, experiments investigating the early stages of evolution of Batesian mimicry suggest that prey lacking defences may enjoy increased survival when spatially close to the defended models, even if they do not imitate their aposematic signal. Such interactions would be analogous to the associational effects described above. However, the amount of research on such systems remain limited; we are still lacking data on the conditions and efficacy of interactions at the intersection of associational effects and mimicry frameworks.

Anuran larvae are a good model for investigating indirect effects emerging when prey with varying defences share common predators. In European anurans, species habitat preferences are distributed along the hydroperiod gradient: the more ephemeral the aquatic habitat is, the more likely it is for larval anurans to have weaker antipredator defences, dominated by induced behavioural and morphological defences. In contrast, larvae of species reproducing in permanent habitats more often rely on constitutive chemical defences. However, the habitat and defence segregation is not absolute: some species regularly breed in ponds containing fish despite very low breeding success in such habitats (i.e. low number of offspring surviving to metamorphosis). As a consequence, it is possible that morphologically similar anuran larvae from different species, possessing entirely different antipredator defences (i.e. constitutive chemical

defences vs. induced behavioural and morphological defences), develop in the same pond, sharing the same fish predators. In such a situation, there is a potential for emergence of indirect effects – anuran larvae of different species may not only compete directly, but also indirectly affect each other, e.g. by modifying the behaviour of their shared predators.

Therefore, it seemed interesting to answer the question if, at least in some circumstances, indirect interactions analogous to associational effects in plants may emerge in the communities of larvae of European anurans, generating the consequences analogous to classical Batesian mimicry. To investigate that question, we performed a series of experiments using enclosures placed in experimental ponds. The enclosures hosted experimental communities of anuran larvae with varying absolute and relative densities of species possessing various antipredator strategies as well as different phenology of development, in presence (or absence) of fish acting as shared predators, with access to varying levels of alternative, non-tadpole food.

The main objective of Experiment 1 (Kaczmarek et al., 2018) was to investigate if associational resistance between tadpoles of the common toad *Bufo bufo* possessing chemical defences and tadpoles of the common frog *Rana temporaria* may emerge in presence of a shared fish predator (common carp, *Cyprinus carpio*). In such case, one should expect that increased survival of *R. temporaria* tadpoles will depend on the presence of high densities of *B. bufo* tadpoles. In the experiment, enclosures holding a gradient of relative density of the two species, with the absolute initial density of larval anurans (40 individuals/enclosure) remaining the same throughout all treatments. In the experimental treatments, anuran larvae were accompanied by one carp individual per enclosure. The fish had access also to alternative, non-tadpole food (commercial fish feed). The tadpoles were introduced into the enclosures after reaching 25th Gosner stage, and remained there until metamorphosis. The results have shown that the fish reduced tadpole survival both in *B. bufo* and *R. temporaria*, albeit the negative effect in *R. temporaria* was much stronger. Importantly, in the presence of fish the survival of tadpoles from both species increased with the relative abundance *B. bufo* tadpoles. This may point to the emergence of associational resistance – when being relatively rare among the defended *B. bufo* larvae, tadpoles of *R. temporaria* were able to survive despite the predation pressure that was theoretically very strong.

The main objective of the Experiment 2 (Kaczmarek et al., 2020) was to investigate whether associational susceptibility could emerge in tadpole communities

analogous to those described above. In such case, one should expect *B. bufo* survival to be reduced when its larvae are present in low relative densities among the undefended *R. temporaria* tadpoles. To eliminate the potential effect of *B. bufo* absolute density – high densities of defended prey often lead to increased defence efficacy – in Experiment 2 we created a gradient of relative density of *B. bufo* in relation to *R. temporaria*, but (initial) absolute density of *B. bufo* remained constant. The enclosures contained *B. bufo* tadpoles in constant density of 30 individuals/m², accompanied by a gradient of *R. temporaria* density (0-60 individuals/m²). In another part of the experiment, we additionally tested if absolute density translates to antipredator protection in *B. bufo*, using a gradient of *B. bufo* density (5-80 individuals/m²) in single-species enclosures. In case of both gradients, anuran larvae were accompanied by one individual of common carp per enclosure, receiving alternative non-tadpole food (commercial fish feed) at one of two levels (low- and high food availability). Survival of *B. bufo* tadpoles increased with their density – both in case of absolute density in single-species treatments and relative density in two-species treatments with undefended *R. temporaria* tadpoles. As a consequence, the results not only show that increased density of the defended prey translate to higher survival, but also suggest the possibility of associational susceptibility emerging when the defended prey are relatively rare in a community dominated by undefended heterospecifics.

In Experiment 3 (Kaczmarek et al., 2021) we tested if associational resistance between the larvae of *R. temporaria* and *B. bufo* may be extended towards phenologically later anuran larvae, in which the majority of development takes place after *R. temporaria* and *B. bufo* leave the water. In the experiment we used the enclosures that were used for performing Experiment 1 or Experiment 2 earlier in season and originally contained *B. bufo* and *R. temporaria* larvae in various absolute and relative densities as well as one carp individual per enclosure. After the previous experiments were finished, we introduced tadpoles of the marsh frog *Pelophylax ridibundus* (tadpole size did not exceed the size of well-developed *B. bufo* larvae) into enclosures that still contained the same individuals of common carp. After 14 days, the remaining larvae were collected and counted. Their survival was investigated in relation to absolute and relative density of *B. bufo* in the previous stages of experiment, as well as to earlier survival of *B. bufo* and *R. temporaria*. However, no statistically significant relationships were found – the larvae of *P. ridibundus* experienced high mortality in the presence of fish regardless of the earlier context. Therefore, even if the presence of *B.*

bufo tadpoles provides some survival advantages to the undefended tadpoles, it seems too weak to affect the species whose larvae appear later in the season.

Additionally to the analyses described above, during Experiment 1 and Experiment 2 we also investigated mass of freshly metamorphosed individuals. The metamorph mass may be treated as an indicator of intensity of intra- and interspecific competition in larval anurans. The results obtained were in line with the data published in existing literature in the subject of competition between the larvae of *B. bufo* and *R. temporaria*.

Experiments performed for the purpose of this dissertation indicate that associational effects in animal communities containing prey with various antipredator strategies and their shared predators may have measurable ecological effects, for example influencing the species composition within the cohort of metamorphosing anurans. On the example of interactions between the syntopic anuran species we have shown that the species composition of the prey community may significantly affect the survival of the individual species, even if more complex interactions, like Batesian mimicry, are absent from the system. The species composition of the prey community may then either facilitate or impede the evolution of aposematic colouration or various forms of mimicry. As a consequence, the apparently ephemeral effects of relative density of different prey types may have serious evolutionary and ecological consequences.