

Załącznik Nr 2

**AUTOREFERAT**

**dr Jan Kotusz**

**Muzeum Przyrodnicze  
Wydział Nauk Biologicznych  
Uniwersytet Wrocławski**

**Wrocław, 2016 r.**

1. Imię i Nazwisko: **Jan Michał Kotusz**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

**1993 - tytuł zawodowy magistra biologii** – Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, kierunek biologia, specjalność: zoologia,. Promotor: prof. dr hab. Andrzej Witkowski

**2001 - stopień doktora nauk biologicznych** – Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, kierunek biologia, specjalność: biologia, ichtiologia. Tytuł rozprawy doktorskiej: "Zróżnicowanie morfologiczne rodzaju *Cobitis* (*Teleostei: Cobitidae*) w zlewisku południowego Bałtyku".  
Promotor: prof. dr hab. Andrzej Witkowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

**1993** - obecnie: Uniwersytet Wrocławski, Muzeum Przyrodnicze, stanowisko: adiunkt

4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Zgodnie z treścią w/w ustawy osiągnięciem naukowym jest wskazany poniżej cykl czterech powiązanych tematycznie prac naukowych, dołączony do dokumentacji, jako załącznik nr 5 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego. Cykl objęto wspólnym tytułem:

**Mechanizmy sterujące powstawaniem i utrzymywaniem  
zróżnicowania klonalnego w kompleksie hybrydowym kozy *Cobitis taenia*  
(*Teleostei, Cobitidae*).**

- a) Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 Ustawy (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1. **Kotusz J.**, Popiołek M., Drozd P., De Gelas K., Šlechtová V, Janko K. **2014**. Role of parasite load and differential habitat preferences in maintaining the coexistence of sexual and asexual competitors in fish of the *Cobitis taenia* hybrid complex. **Biological Journal of the Linnean Society**, 113 (1): 220-235  
IF= **2,264**, pkt MNiSW= **20**, liczba cytowań wg WoS=**0**.  
*Mój udział procentowy szacuję na 70 %*,
2. Janko K., **Kotusz J.**, De Gelas K., Šlechtová V, Opoldusová Z., Drozd P., Choleva L., Popiołek M and Baláž M. **2012**. Dynamic formation of asexual diploid and polyploid lineages: multilocus analysis of *Cobitis* reveals the mechanisms maintaining the diversity of clones. **PLoS ONE** 7(9): e45384.; doi:10.1371/journal.pone.0045384  
IF= **3,730**, pkt MNiSW = **40**, liczba cytowań **15**  
*Mój udział procentowy szacuję na 40 %, (autor korespondencyjny)*.
3. Maciak S., Janko K., **Kotusz J.**, Choleva L., Boroń A., Juchno D., Kujawa R., Kozłowski J., Konarzewski M. **2011**. Standard metabolic rate is inversely related to erythrocyte and genome size in allopolyploid fish of *Cobitis taenia* hybrid complex. **Functional Ecology** 25(5): 1072-1078; doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01870.x  
IF= **4,567**, pkt MNiSW=**40**, liczba cytowań **21**  
*Mój udział procentowy szacuję na 15 %*,
4. Popiołek M., **Kotusz J.** **2003**. Endoparasitic helminths of fishes of the genus *Cobitis* from Poland. **Folia biol.** (Kraków). 51 (Suppl.): 173-178,  
IF= **0,286**, pkt MNiSW= **20**, liczba cytowań **6**  
*Mój udział procentowy szacuję na 50 %*,

Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **10,847**, suma pkt MNiSW (2015r.) za ww. publikacje wynosi **120**.

Oświadczenia współautorów znajdują się w załączniku nr 6.

- b) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Badania organizmów tworzących mieszane systemy rozrodcze pozwalają na odniesienie się do najbardziej fundamentalnych zagadnień ekologii i biologii ewolucyjnej, takich jak **paradoks płci, czy rola hybrydyzacji i poliploidyzacji w ewolucji**. Rozważania takie wymagają skupienia aktywności badawczej na nieprzypadkowo wybranym obiekcie, który dostarczy rezultatów o odpowiednim potencjale interpretacyjnym.

Obiektem takim są występujące w faunie Polski ryby z rodzaju *Cobitis* (koza; piskorzowate), które wykazują zdolność do tworzenia kompleksów hybrydowych, złożonych z komponentu rozmnażającego się drogą płciową (gatunki) oraz z komponentu aseksualnego (linie klonalne). Ten ostatni tworzą formy jednopłciowe: linie ewolucyjne o hybrydowym pochodzeniu i klonalnej propagacji. Struktura genetyczna takiego kompleksu może być bardzo zróżnicowana i dotyczyć: 1) genotypów gatunków rodzicielskich wchodzących w skład kompleksów, 2) liczby i składu genotypów hybrydowych, 3) przynależności klonalnej hybrydów (mierzonej zmiennością markerów mikrosatelitarnego DNA), 4) zróżnicowania mitochondrialnego DNA oraz 5) aktywności transkrypcyjnej zespołów funkcjonalnych genów.

„Populacje” kompleksów *Cobitis* występujące w Europie tworzone są przez 4 gatunki, jednak w poszczególnych lokalizacjach występuje tylko jeden z nich, a towarzyszą mu formy o pochodzeniu hybrydowym, zazwyczaj o zwiokrotnionej liczbie chromosomów (tzw. biotypy) (Vasil'ev i wsp. 1989, Boroń 2003, Janko i wsp. 2007). Złożone z samych samic, stabilne biotypy rozmnażają się przez gynogenezę wykorzystując do własnej, klonalnej reprodukcji nasienie osobników rozmnażających się płciowo. Naturalnego impulsu do podziałów komórkowych oocyta dostarcza sam kontakt z męską gametą (bez zapłodnienia) pochodzącą od przedstawiciela rodzaju *Cobitis* (Saat 1991). Zazwyczaj osobniki klonalne występują syntopicznie z jednym z gatunków rodzicielskich, ale wykazano już, że hybrydy mają zdolność do dyspersji powiązaną ze zmianą populacji donatora spermy. Bywa, że zmiana taka połączona jest z zaadoptowaniem się do nie-rodzicielskiego gatunku *Cobitis* (Choleva i wsp. 2008).

Nie w pełni wykształcone prezygotyczne mechanizmy izolacji rozrodczej w rodzaju *Cobitis*, wraz z rzadko spotykanym w świecie zwierząt wielopoziomym zróżnicowaniem genetycznym mieszańców, implikują pytania o ekologiczne relacje między poszczególnymi komponentami kompleksu. U podstaw ich wzajemnych relacji znajduje się gynogenetyczny sposób reprodukcji form hybrydowych, który determinuje nierozzerwalny związek czasowo-przestrzenny kóz o klonalnej propagacji z męskimi przedstawicielami któregoś z gatunków. Kluczowymi relacjami ekologicznymi, które opisują ich koegzystencję są więc: pasożytnictwo

hybrydów na spermie form płciowych i międzyosobnicza konkurencja o limitowane zasoby środowiska wewnątrz kompleksu. Bardzo bliskie pokrewieństwo filogenetyczne gatunków i linii hybrydowych oznacza znaczne podobieństwo zajmowanych przez nie nisz ekologicznych (Ritterbusch i Bohlen 2000, Kotusz 2008), które determinuje silną zależność konkurencyjną. Wydaje się ona precyzyjnie zbalansowana, ponieważ wyparcie komponentu płciowego przez klony spowodowałoby załamanie się całego systemu i następczą ekstynkcję form aseksualnych. Tymczasem szacunki oparte o wskazania zegara molekularnego (kalibrowanego dla mtDNA *Cobitis*; Perdices i Doadrio 2001) określają wiek najstarszych z linii klonalnych na ponad 300 tysięcy lat (Janko i wsp. 2005), co pokazuje ich potencjalną i realną długowieczność. Długoterminowe trwanie linii klonalnych kóz sugeruje potrzebę rewizji jednego z ugruntowanych paradygmatów biologii ewolucyjnej o nieuchronnym i stosunkowo szybkim zanikaniu klonów (Maynard Smith 1978) na skutek negatywnych procesów jakie u nich zachodzą, jak gromadzenie niekorzystnych mutacji (Muller 1964), ich synergistyczne oddziaływanie (Kondrashov 1988), utrata zdolności adaptacyjnych (Weissman 1889), czy wzrastająca wrażliwość na patogeny (Hamilton 1980). Wysoki poziom konkurencji różnych form *Cobitis* dotyczy nie tylko interakcji wewnątrz kompleksu, ale i między gatunkami. Wskazuje na to współczesne rozsiadanie dwóch głównych gatunków rodzicielskich kompleksu hybrydowego w Europie. Koza *Cobitis taenia* i koza dunajska *C. elongatoides* zasiedlają różne rzeki (lub różne ich strefy), chociaż panujące w nich warunki ekologiczne są w miarę jednolite. Wzdłuż granic kontaktu dzielą tylko wąskie strefy parapatryczne (Janko i wsp. 2007). Sytuację tą można wyjaśnić teoretycznie na gruncie klasycznej reguły konkurencyjnego wypierania gatunków o podobnej niszy (Bobyrev i wsp. 2003), jednak brakuje empirycznej weryfikacji tej hipotezy dla tych organizmów.

Odkrycie kompleksów *Cobitis* związane było pierwotnie z postępem w metodyce badań genetycznych (kariotyp i elektroforeza allozymów) (Vasil'ev i wsp. 1989, Rab i wsp. 2000, Slechtova i wsp. 2000, Mezhzherin i Chudakorova 2002, Boroń 2003). Zostało ono wsparte danymi morfologicznymi (Kotusz 2000) i potwierdzone ostatecznie na poziomie molekularnym (Bohlen i Rab 2001, Janko i wsp. 2007). Dynamiczny rozwój technik molekularnych i zaaplikowanie ich w studiach nad tymi rybami pozwolił na zaproponowanie precyzyjnych scenariuszy filogeograficznych *Cobitis* w Europie (Perdices i Doadrio 2001, Janko i wsp. 2005, Bohlen i wsp. 2006, Culling i wsp. 2006). Konkluzje tych prac znacząco posunęły wiedzę o genezie współczesnej dystrybucji kóz w Europie odnajdując potencjalne wyjaśnienia koegzystencji obu komponentów kompleksów na gruncie makroekologicznym

(Janko i wsp. 2005). Istotny wkład w poznanie kompleksów kozy wniosły też badania eksperymentalne nad rozrodem i rozwojem (Juchno i wsp. 2007, Choleva i wsp. 2012). W ostatnim dwudziestoleciu znacząco rozwinęły się też metody badań teoretycznych w biologii ewolucyjnej. Nowe modele matematyczne, bazujące głównie na wzorcu ewolucji molekularnej, znajdują zastosowanie w wyjaśnieniu stabilności trwania kompleksów hybrydowych, w tym kompleksu *Cobitis* (np. Hellriegel i Reyer 2000, Bobyrev i wsp. 2003, Kokko i wsp., 2008, Janko 2014, Janko i wsp. 2008, 2011, Lively 2010). Modele te pokazały, że obok mechanizmów selekcyjnych bardzo ważną rolę w ewolucji organizmów klonalnych mogą pełnić procesy neutralne (oparte na dryfcie). Zakładając krótki czas trwania pojedynczej linii klonalnej, mogą one nawet całkowicie kontrolować zróżnicowanie klonalne, bez udziału doboru naturalnego (Janko 2014).

Pełne wyjaśnienie procesów biologicznych wymaga zawsze weryfikacji teoretycznych przewidywań przez badania empiryczne. W przypadku kompleksu hybrydowego *Cobitis* szczególnie wyraźnie daje się odczuć niedostatek takich testów pochodzących z badań środowiskowych prowadzonych *in situ* na poziomie populacyjnym i biocenotycznym. Ten aspekt został podjęty w prowadzonych przeze mnie badaniach.

### **Podjęte badania zakładały realizację poniżej zestawionych celów:**

1. Identyfikacja i opis struktury genetycznej strefy hybrydowej *Cobitis* w dorzeczu Odry.
2. Wyjaśnienie roli hybrydyzacji i poliploidyzacji w genezie i utrzymywaniu się kompleksów hybrydowych kozy poprzez odpowiedź na następujące szczegółowe pytania:
  - 2.1. Czy powstawanie jedнопłciowości jest bezwzględnie związane z hybrydyzacją, czy też może ona powstać w wyniku innych procesów?
  - 2.2. Czy osobniki hybrydowe rozmnażają się zawsze drogą aseksualną, czy też są takie mieszańce, które zachowują zdolność do rozmnażania płciowego?
  - 2.3. Czy stabilne linie klonalne (aseksualne) należą do określonego poziomu ploidalności?
  - 2.4. Czy powstanie linii klonalnych jest następstwem wyjątkowych okoliczności w jakich zaszła hybrydyzacja w przeszłości, czy raczej zdarza się często i w sposób ciągły?
3. Weryfikacja hipotezy ewolucyjnej wskazującej na decydującą rolę zarażenia pasożytniczego we wspieraniu komponentu płciowego kompleksu (hipoteza Czerwonej Królowej *sensu* Hamilton 1980). Zagadnienie to zawiera dwa cele szczegółowe:
  - 3.1. Jakościowy i ilościowy opis fauny pasożytów kóz (bardzo słabo poznany żywiciel od strony parazytologicznej).

- 3.2. Określenie poziomu zarażenia pasożytniczego form płciowych i aseksualnych, w tym linii klonalnych o różnej frekwencji występowania w badanej próbie.
4. Weryfikacja hipotezy o utrzymywaniu się koegzystencji różnych komponentów kompleksu hybrydowego kóz dzięki rozsunięciu ich nisz ekologicznych, w tym:
  - 4.1. rozpoznanie preferencji siedliskowych gatunków i form aseksualnych *Cobitis*,
  - 4.2. ocena stabilności proporcji form płciowych i klonalnych występujących w stałych lokalizacjach, w czasie odniesionym do całej historii badań kompleksów *Cobitis*,
  - 4.3. porównanie tempa metabolizmu w kontekście wymagań ekologicznych form płciowych, hybrydowych, diploidalnych i poliploidalnych.

Interdyscyplinarny profil podjętego przeze mnie tematu wymagał zainteresowania i zaangażowania zespołu badaczy o odpowiednio wysokich kompetencjach i doświadczeniu w różnych dziedzinach (genetyka, ekologia, parazytologia, fizjologia, biostatystyka). Pozwoliło to na przeniesienie moich dotychczasowych zainteresowań i możliwości badawczych na wyższy poziom i przyczyniło się do mojego indywidualnego rozwoju.

### **Osiągnięte rezultaty**

Wyniki prowadzonych przez mnie badań nad kompleksem hybrydowym *Cobitis* zostały opublikowane w postaci serii współautorskich prac, w czterech czasopismach o profilu ogólnobiologicznym i ewolucyjnym o łącznym IF = 10,847.

Osiągnięcia naukowe odpowiadające celom 1 i 2 zostały zrealizowane w publikacji nr 2 przedstawionego do oceny cyklu. W latach 2005-2009 prowadzono intensywne poszukiwania stanowisk występowania kozy w dorzeczu górnej i środkowej Odry. Wcześniej, w kilku dopływach Odry odkryto nieznanego wówczas gatunek dla Polski - *C. elongatoides* (koza dunajska) oraz genotyp kolejnego (obecnego tylko w hybrydach), oznaczonego w dalszych badaniach jako *C. tanaitica* (Boroń i Kotusz 1999, 2000, Janko i wsp. 2007). Syntopiczne występowanie obu gatunków z formami hybrydowymi (zwykle poliploidalnymi) wskazywało na istnienie strefy hybrydyzacji gdzieś na tym obszarze. Badaniami objęto więc Odrę od 683 do 146 km biegu (licząc od ujścia) wraz ze wszystkimi dopływami. Stanowisk występowania kozy poszukiwano opierając się na danych z literatury oraz penetrując miejsca potencjalnie nadające się do zasiedlenia przez te ryby. Spośród ponad stu skontrolowanych stanowisk (dane niepublikowane) dwadzieścia siedem okazało się zasiedlonych przez kozę.

Kluczowym zadaniem warunkującym rozpoznanie struktury i dynamiki strefy hybrydyzacji była precyzyjna identyfikacja genetyczna każdego z 420 odłowionych osobników. Została

ona przeprowadzona na bazie tkanek z fragmentu płetwy i krwi pobranej z żyły ogonowej (bez uśmiercania ryb) kilkoma komplementarnymi metodami. Do oceny poziomu ploidalności, a następnie składu genotypowego zastosowano cytometrię obrazową (pomiary erytrocytów z rozmazów krwi) i elektroforezę czterech diagnostycznych *loci* enzymatycznych. Pomocniczo, w przypadku niejednoznacznych wyników, sekwencjonowano intron S7 jądrowego DNA. Badania dziesięciu *loci* mikrosatelitarnego DNA miały dostarczyć danych pozwalających na weryfikację wyników otrzymanych za pomocą w/w metod, ale przede wszystkim służyć miały bardziej szczegółowym analizom zróżnicowania genetycznego na poziomie MLG (*multilocus genotype*). Charakter wykazanej zmienności MLG zastosowano następnie do detekcji introgresji genetycznej u hybrydów, klasyfikacji poszczególnych osobników o rozmnażaniu aseksualnym do wspólnych linii klonalnych uznawanych za jednostki ewolucyjne (*multilocus lineage* – MLL), identyfikacji klonów ancestralnych i pochodnych (o wyższym poziomie ploidalności), oszacowania relatywnego wieku tych linii klonalnych (tj. dynamiki ich powstawania). Na dane te nałożone zostały wyniki analizy fragmentu genu mitochondrialnego DNA (sekwencja o długości 1190 bp cytochromu b), co pozwoliło na uzupełnienie interpretacji na poziomie ewolucji molekularnej hybrydowego kompleksu *Cobitis*.

Jednym z ważniejszych osiągnięć badawczych przedstawionych w tej publikacji jest mapa rozmieszczenia tego kompleksu hybrydowego w dorzeczu Odry wskazująca przebieg strefy hybrydyzacji. Ukazuje ona strukturę genetyczną „populacji” z różnych rzek uwzględniając poziom ploidalności, skład genotypowy i przynależność klonalną wchodzących w jej skład osobników (Fig. 1c). Pełną identyfikację genetyczną badanych osobników zestawiono w dwóch tabelach, które zamieszczono w materiałach dodatkowych (Table S2 i S3) dostępnych on-line na platformie cyfrowej czasopisma. Wykazano, że komponent płciowy kompleksu *Cobitis* ze zlewni Odry stanowią dwa gatunki kozy *C. taenia* i *C. elongatoides*, których jednak nigdy nie stwierdzono syntopicznie. Nie potwierdzono doniesienia o występowaniu *C. tanaitica* w formie diploidalnego gatunku na tym obszarze. Informacja taka pojawiła się w pracy Bohlen i Rab (2001) dla rzeki Stobrawy i była powtarzana w późniejszych opracowaniach (Janko i wsp. 2007, Choleva i wsp. 2008). Wśród form hybrydowych stwierdzono trzy poziomy ploidalności (2n, 3n, 4n) tworzone przez genotypy pochodzące od trzech w/w gatunków. Genotypy hybrydów diploidalnych nie pochodziły jednak nigdy od gatunku współcześnie nieobecnego w dorzeczu Odry tj. *C.*



*tanaitica*. Poliploidalne genotypy były zwykle zdominowane przez materiał genetyczny tego gatunku rodzicielskiego, który współwystępował z nimi w danej „populacji”, służąc im jako donator męskich gamet (w jednym przypadku odnotowano odstępstwo od tej reguły); nierzadkie były też osobniki trihybrydowe. Taki rozkład genotypów w „populacjach” kompleksu *Cobitis* wydaje się nie być efektem czysto stochastycznym, a raczej jest rezultatem działania mechanizmów selekcyjnych np. dobór płciowy (kozy reprezentują poligyniczny system reprodukcji, a preferencje samca mogą być zależne od ilości materiału genetycznego określonego gatunku w genotypie klonalnej partnerki), czy segregacja nisz ekologicznych zajmowanych przez gatunki i biotypy/klony.

Bazując na komputerowej symulacji rozkładu wartości dystansów między poszczególnymi MLG hybrydów wyodrębniono 124 linie klonalne (MLL) obejmujące wszystkie trzy poziomy ploidalności. Stabilne, zdolne do dyspersji geograficznej linie jednopłciowe rekrutowały się jednak tylko spośród hybrydów di- i triploidalnych (Fig. 2 i Text S1).

Kolejne osiągnięcie przyniosła interpretacja wzoru zmienności markera mtDNA. Analiza ta pozwoliła na stwierdzenie kilkudziesięciu haplotypów (w tym 22 nowych) i ich polifiletycznego pochodzenia od gatunków rodzicielskich *C. teania* i *C. elongatoides* (Fig. 3). Haplotypy pochodzące od obu gatunków stwierdzone w hybrydach diploidalnych dowodzą ich wielokrotnego powstawania poprzez wzajemną (obustronną względem płci) hybrydyzację. Zaobserwowano też wyraźny związek relacji filogenetycznych markera mtDNA z wyróżnionymi na bazie msDNA liniami klonalnymi, gdyż każda z nich posiada ten sam haplotyp, lub formuje monofiletyczny klaster powiązany z gatunkiem rodzicielskim.

Dalsze osiągnięcie to wykazanie, że wszystkie osobniki hybrydowe należą do pokolenia F1 gatunków rodzicielskich, co dowodzi tezy o braku dalszego kojarzenia mieszańców drogą płciową. Wynik ten ukazuje specyfikę kompleksu *Cobitis*, gdyż u poznanych w tym zakresie kompleksów hybrydowych tylko określone kombinacje genetyczne osobników rodzicielskich owocują założeniem linii klonalnej podczas gdy większość krzyżowań skutkuje powstawaniem mieszańców rozmnażających się płciowo (Hotz i wsp. 1985, Hernandez Chavez i Turgeon 2007). Rozród klonalny hybrydów potwierdzony został analitycznie przez negatywne wartości współczynnika wsobności (wyliczonego dla obu gatunków rodzicielskich i potencjalnego diploidalnego potomstwa mieszańcowego) oraz przez zaobserwowanie identyczności licznych genotypów hybrydowych na poziomie MLG. Jednocześnie, brak identycznych lub podobnych osobników

w puli zmienności msDNA *C. taenia* i *C. elongatides* zaprzecza tezie o spontanicznym, niezwiązanym z hybrydyzacją powstawaniu jednopłciowości u kóz. Podobną wymowę ma też brak odstępstw od reguły Hardego-Weinberga we frekwencji wszystkich dziesięciu badanych *loci* mikrosatelitarnych u obu gatunków, które mogłyby świadczyć o ich klonalnym rozrodzie.

Niewątpliwym osiągnięciem samym w sobie jest opracowanie metody analitycznej pozwalającej identyfikować linie klonalne (MLL). Dzięki niej ustalono zależności między hybrydami ancestralnymi i pochodzącymi od nich klonami o wzrastającym poziomie ploidalności. Analizując ich wzorzec rozmieszczenia wykazano też zróżnicowane zdolności dyspersji klonów. Delimitacja linii klonalnych stała się też podstawą opracowania kolejnej oryginalnej metody, która miała na celu określenie relatywnego wieku poszczególnych klonów. Przetestowanie jej założeń teoretycznych za pomocą symulacji komputerowej (stosując różne założenia) uwiarygodniło poprawność zastosowanego podejścia obliczeniowego i wykazało, że poszczególne linie klonalne powstawały w różnym czasie (Fig. 4, Fig. 5, Fig. S1). Zróżnicowanie klonalne „kompleksowych populacji” *Cobitis* jest więc wynikiem dynamicznej równowagi między ciągłym powstawaniem, dyspersją i wymieraniem linii klonalnych podlegających regułom dryftu i naturalnej selekcji. Dynamika tych procesów została wykazana po raz pierwszy w kompleksach hybrydowych.

**Publikacje 1 i 4** przedstawionego do oceny cyklu ilustrują efekty realizacji celu nr 3. **Publikacja nr 4**, realizowana w latach 2000-2003 pozwoliła na rozpoznanie fauny endopasożytów różnych gatunków i biotypów kóz z rodzaju *Cobitis*, z kilku populacji na obszarze Polski. Materiał żywicielski użyty do badań został dobrany zgodnie z aktualną wiedzą na temat rozszedlenia tych ryb w Polsce, obejmując rozległy obszar (107 osobników z prób pochodzących z głównych zlewni rzecznych Polski: Wisła, Odra, Niemen). Pobrano go tylko z takich populacji, w których wcześniej prowadzono badania cytogenetyczne kóz (bądź inne na poziomie molekularnym) i zidentyfikowano je pod względem genetycznym. Poziom infekcji pasożytniczej analizowano z uwzględnieniem ploidii żywicieli (co odpowiada w tych próbach podziałowi na osobniki płciowe i klonalne) różnicując je na podstawie wielkości erytrocytów. Takie podejście do przedstawicieli *Cobitidae* zastosowano po raz pierwszy w pracy parazytologicznej. Stwierdzono zarażenie pięcioma taksonami helmintów: dwa gatunki metacerkarii przywr pasyżujących w oczach (*Diplostomum* spp., *Tylodelphys clavata*; Digenea), jeden pasyżujący na skórze (*Posthodiplostomum cuticola*; Digenea) i jeden (dorosły) występujący w jelicie (*Allocreadium transversale*; Digenea). Ponadto odnotowano także jeden gatunek jelitowego nicienia (*Rhabdochoma ergensii*, Nematoda). Ostatni z

wymienionych pasożytów został stwierdzony na tym żywicielu po raz pierwszy. Analiza wartości wskaźników poziomu infekcji tymi pasożytami pozwoliła stwierdzić, że zazwyczaj nie różnicują one koegzystujących ze sobą form płciowych i klonalnych. W przypadku jednego gatunku pasożyta wyższe wartości tego parametru odnotowano u ryb rozmnażających się płciowo.

Dalsze dane o parazytofaunie rodzaju *Cobitis* przedstawiono w **publikacji 1** (lata realizacji: 2006-2014), jednak jej głównym celem było zweryfikowanie dwóch mechanizmów, potencjalnie odpowiedzialnych za utrzymywanie się hybrydowego kompleksu w naturze. Pierwszy z nich to zwiększona podatność niezróżnicowanych genetycznie form klonalnych na czynniki patogenne, rekompensująca koszt utrzymania dwóch płci u form gonochorycznych (hipoteza Czerwonej Królowej – RQ); drugi – rozsuniecie niszy ekologicznych umożliwiające obu komponentom uniknięcie wzajemnego konkurencyjnego wyparcia. Praca ta ma charakter szczegółowego studium przypadku – jej obiektem jest „populacja” kozy dunajskiej w jednej z rzek w centrum odrzańskiej strefy hybrydowej (Budkowiczanka, dopływ Stobrawy). Pozyskane przez elektropułowy kozy (782 osobniki) były identyfikowane genetycznie za pomocą co najmniej jednej z trzech metod: pomiary erytrocytów w celu oceny ploidalności, elektroforeza allozymów diagnostycznych dla genotypów środkowoeuropejskich gatunków *Cobitis* i analiza 10 markerów mikrosatelitarnych zakończona delimitacją linii klonalnych (MLL), zgodnie z metodyką opisaną w publikacji 2 (Figs 2, 3, Tables S1, S2).

Dla poznania fauny pasożytów wewnętrznych i zewnętrznych, 205 kóz z Budkowiczanki poddano pełnym sekcjom parazytologicznym, uwzględniając w ocenie skórę, oczy, skrzela i wszystkie organy wewnętrzne. Materiał pobierano w latach 2006 – 2007, 2010 w aspekcie sezonowym (6 terminów pobierania prób) i mezohabitatowym (próby z górnego, środkowego i dolnego biegu rzeki).

W latach 2008-2009 prowadzono badania dotyczące zmienności lokalnych parametrów ekologicznych (abiotycznych i biotycznych) opisujących mikrosiedliska kóz zasiedlających Budkowiczankę (morfometria koryta rzecznoego, cechy fizykochemiczne wody, struktura substratu dna, pokrycie roślinnością, zacienienie/ekspozycja słoneczna) (Tabela S3).

Zbierano też dane o rozmiarach odławianych kóz w celu obliczenia współczynnika kondycji (indeksu masy) i analizy jego relacji z parametrami genetycznymi, środowiskowymi oraz z intensywnością zarażenia pasożytami.

Ponadto, zebrano dane o zmianach struktury zespołów gatunkowych ryb wzdłuż biegu rzeki, które posłużyły jako wskaźnik zróżnicowania siedlisk wykorzystywanych przez różne formy *Cobitis* (Fig. 1). Preferencje siedliskowe kóz badane były z uwzględnieniem zmienności sezonowej czynników ekologicznych i dynamiki zmian w lokalnych zespołach ichtiofauny.

Jednym z pośrednich celów badań opisanych w publikacji 1 była odpowiedź na pytanie czy proporcje form płciowych i klonalnych w mieszanych „populacjach” *Cobitis* z centralnej Europy są stabilne na poszczególnych stanowiskach występowania (dostępne dane obejmują okres około dwóch dekad badań). Do rozstrzygnięcia tej kwestii przeprowadzono kwerendę danych literaturowych i na nich przeprowadzono odpowiednią analizę statystyczną (włączając dane prezentowane w niniejszym studium) (Table S4). Wyjaśnienie tego zagadnienia wzmacnia konkluzje dotyczące roli pasożytów i czynników ekologicznych w utrzymywaniu się kompleksów hybrydowych w naturze.

Najbardziej podstawowym osiągnięciem przedstawionym **w publikacji 1** jest wzbogacenie wiedzy o parazytofaunie rodzaju *Cobitis* (Table 1). W rzece Budkowiczance stwierdzono dwa dominujące gatunki helmintów: larwalna postać nicienia *Raphidascaris acus* (Nematoda) izolowana ze ścian jelita lub krezki i *Gyrodactylus latus* (Monogenea) – ektopasożytnicza przywra monogeniczna stwierdzana na płetwach. Wykazywały one najwyższe wartości prewalencji i intensywności zarażenia we wszystkich terminach badań, w okresie 2006-2010, na całej długości rzeki. W jelitach ryb stwierdzono też trzy taksony pasożytów o niższych wartościach infekcji: przywra *Allocreadium transversale* (Digenea), nicien *Pseudocapillaria tomentosa* (Nematoda) i kolcogłów *Acanthocephalus anguillae* (Acanthocephala). Odnotowano też przywrę (metacercaria) *Metorchis xanthosomus* (Digenea) pasożytującą na płetwach. Poza przywrami digenetycznymi wszystkie wymienione gatunki zostały po raz pierwszy stwierdzone dla tego żywiciela w Polsce, a *G. latus* okazał się nowym taksonem dla fauny Polski, czemu poświęcono osobną współautorską publikację w formie notatki (Popiołek i wsp. 2009).

Jednym z dwóch głównych osiągnięć pracy jest konkluzja wskazująca na to, że mechanizm Czerwonej Królowej (RQ) nie pełni decydującej roli w stabilizacji koegzystencji form płciowych i klonalnych. Brak potwierdzenia dla RQ powtórzył się w trzech testowanych predykcjach: 1/ na stanowiskach sympatrycznego występowania formy klonalne nie wykazywały wyższego poziomu zarażenia pasożytniczego od form płciowych, pomimo swej ograniczonej plastyczności fenotypowej, 2/ osobniki należące do najczęściej występującego

genotypu w „populacji” (tu: dominująca linia klonalna) nie były najdotkliwiej zarażone pasożytami (choć zgodnie z oczekiwaniami RQ poziom zmienności w zarażeniu był u nich najmniejszy). 3/nie stwierdzono aby zarażenie pasożytnicze wzrastało wraz z rosnącym udziałem form płciowych w „populacji” (Fig. 4).

Analiza rozmieszczenia kompleksu hybrydowego *Cobitis* w Budkowiczance jednoznacznie pokazała, że udział komponentu płciowego gradientowo maleje wzdłuż podłużnego profilu cieku (Fig. 1). Wzorzec ten okazał się stabilny w perspektywie czterech lat. Stabilnymi w proporcjach okazały się też „populacje” kompleksów hybrydowych opartych o genotypy *C. taenia*, *C. elongatoides* i *C. tanaitica* z innych lokalizacji środkowoeuropejskich, analizowanych w okresach od dziesięciu do dwudziestu lat (Table S4).

W tym kontekście, statystycznie istotne korelacje względnej liczebności form klonalnych i płciowych z niektórymi parametrami mikrosiedliskowymi (struktura materiału dennego koryta rzecznej, przewodność elektrolityczna wody, zacielenie lustra wody) jakie stwierdzone zostały w Budkowiczance (Tables 2, S3) nabierają większej wagi, gdyż nie są prawdopodobnie efektem stochastycznym. Wzmacniają je jeszcze gradientowe zmiany w strukturze gildii ekologicznych i rozrodczych ichtiofauny wzdłuż cieku (Fig. 1). Zróżnicowanie warunków siedliskowych oferowanych przez tą rzekę determinuje skład i wzajemne relacje ilościowe zasiedlających ją zespołów ryb w poszczególnych strefach rzecznych. Pozwala to przypuszczać, że czynniki środowiskowe regulujące skład zespołów ryb mają też istotne znaczenie w przestrzennym zróżnicowaniu kóz o płciowym i aseksualnym typie rozrodu. Konkluzja ta stanowi drugi z głównych osiągnięć tej pracy. W zgodzie z nią pozostaje jeszcze jedna (dodatkowa) obserwacja. Osobniki należące do płciowego komponentu „populacji” kozy dunajskiej cechowały się istotnie wyższymi wartościami współczynnika kondycji (indeksu masy ciała) (Figure S2). Wynik ten można zinterpretować jako indykator różnic fizjologicznych u porównywanych grup ryb. Jakkolwiek korelacja nie musi mieć charakteru przyczynowo skutkowego, mechanizm rozsunięcia nisz (tu: mikrosiedlisk) wydaje się wysoce prawdopodobnym wyjaśnieniem stabilnego współwystępowania konkurujących ze sobą form *Cobitis*.

Na różnice w niszy ekologicznej zajmowanej przez płciowe i klonalne formy *Cobitis* wskazują też rezultaty opublikowane w **publikacji nr 3**. Zasadniczy jej cel nie zmierzał do dyskusji mechanizmów stojących za funkcjonowaniem kompleksów hybrydowych, a kozy posłużyły tym razem za modelowy organizm, na którym przetestowano inną fundamentalną

hipotezę biologiczną – sformułowaną pod koniec ubiegłego wieku–, „metaboliczną teorię ekologii” (MTE) (West i wsp. 1997).

Podstawowy cel pracy, realizowany zwłaszcza przez jej głównych autorów (SM, MK, JKoz), został osiągnięty poprzez wykazanie pozytywnego związku między wielkością komórek ciała (erytrocytów) kóz należących do trzech gatunków *Cobitis* i ich hybrydów, a wielkością ich jąder oraz genomu (ploidalnością), przy ujemnej korelacji tych zmiennych z tempem metabolizmu (mierzonego jako poziom konsumpcji tlenu; SMR). Wykazano też, że wykładnik potęgowy równania allometrycznego skalującego tempo metabolizmu względem masy badanych ryb wynosi ok. 1, a więc jest daleki od przewidywanej przez MTE uniwersalnej dla wszystkich zwierząt wartości  $\frac{3}{4}$ .

Konkluzje płynące z tej pracy wspierają alternatywną hipotezę „metabolizmu komórkowego”, zgodnie z którą architektura komórkowa organizmu, tj. wielkość i liczba komórek jego ciała mają istotny wpływ na skalowanie procesu przemiany materii i energii względem rozmiarów ciała. Badania poziomu konsumpcji tlenu oparto o materiał zebrany w latach 2008-2009, liczący 105 osobników kóz należących do trzech gatunków: *C. taenia*, *C. elongatoides*, *C. strumicae* (40% osobników) i czterech hybrydowych biotypów (20% diploidalnych i 40% triploidalnych). Te ostatnie wyhodowane zostały w warunkach laboratoryjnych na drodze międzygatunkowego krzyżowania lub gynogenetycznego rozmnożenia osobników hybrydowych z dzikiej „populacji”.

Bardzo ważną prawidłowością odkrytą w tej pracy, z punktu widzenia relacji wewnątrz mieszanych „populacji” kóz jest istotnie niższe tempo przemiany materii ryb triploidalnych niż diploidalnych (Fig. 1.). Różnica ta może wskazywać na odmienne możliwości adaptacyjne wykorzystywane przez obie formy we wspólnie zasiedlanych akwenach (Metcalf i wsp. 2016). Zważywszy że triploidy są zawsze aseksualne i są najczęściej stwierdzanymi formami hybrydowymi *Cobitis* w Europie (Boroń 2003, Janko i wsp. 2007), odkrycie to wydaje się mieć uniwersalne zastosowanie do wyjaśnienia powszechnej koegzystencji form płciowych i klonalnych. Ponadto, zauważalna część całkowitej wariancji obliczonej w ogólnym modelu liniowym, zastosowanym do analizy SMR (10%), wyjaśniona została przez wpływ genetycznej afiliacji poszczególnych form (na poziomie gatunków i biotypów). Wyniki te są zgodne z intuicyjnie spodziewanym zróżnicowaniem ekologicznym gatunków i pochodzących od nich form aseksualnych. Odmienne wymagania tlenowe, czy też inna forma różnic na poziomie metabolicznym między

osobnikami płciowymi i klonalnymi sugerują stabilizującą rolę mechanizmu rozsunięcia ich nisz w ramach wspólnie wykorzystywanych zasobów środowiska.

**Najważniejsze osiągnięcia opublikowane w pracach 1 - 4 to:**

- zidentyfikowano strefę hybrydyzacji dwóch gatunków kóz *C. taenia* i *C. elongatoides* w dorzeczu Odry i opisano strukturę genetyczną (na kilku poziomach zróżnicowania) mieszanych „populacji”.
- wykazano, że powstawanie form aseksualnych jest nierozzerwalnie związane z poprzedzającą je hybrydyzacją, a dalsze utrzymywanie się form jednopłciowych jest skutkiem propagacji klonalnej (bez możliwości powrotu do rozmnażania płciowego).
- stwierdzono, że linie klonalne zdolne do dyspersji rekrutują się z puli hybrydów di- lub triploidalnych.
- zróżnicowany wiek klonów wskazuje na powszechność i ciągłość procesu ich powstawania w strefach hybrydyzacji.
- uzyskano negatywny wynik testu hipotezy Czerwonej Królowej (RQ). Poziom zarażenia pasożytami u kóz klonalnych i płciowych nie wykazywał istotnych różnic, lub wykazywał tendencje odwrotne do oczekiwań teoretycznych modelu. Zależność ta powtórzyła się zarówno w całej puli badanych osobników jak i w odniesieniu do linii klonalnej o najwyższej frekwencji występowania. Nie stwierdzono aby „populacje” o potencjalnie wyższym poziomie odporności na pasożyty (o większym udziale form płciowych) różniły się istotnie we wskaźnikach infekcji od „populacji” zdominowanych przez osobniki aseksualne.
- zaobserwowano malejący udział komponentu płciowego kompleksowej „populacji” *C. elongatoides* wzdłuż biegu rzeki, w której badano mechanizm RQ.
- wykazano gradientowy (typowo rzeczny) charakter zmienności czynników abiotycznych i biotycznych. Odmienne proporcje liczebności form płciowych i klonalnych w różnych strefach rzecznych, wskazują na ich zróżnicowane preferencje siedliskowe, dając asumpt do wsparcia hipotezy rozsunięcia nisz jako decydującego mechanizmu w stabilizacji kompleksów hybrydowych *Cobitis*.
- wykazano różnice na poziomie metabolicznym u form płciowych i klonalnych (zapotrzebowanie na tlen, wskaźnik kondycji) co wspiera powyższą hipotezę.

Badanie procesów biologicznych w warunkach naturalnych jest rzeczą niełatwą, głównie ze względu na mnogość i nieoznaczoność czynników, od których mogą one zależeć. Powoduje to określone trudności metodyczne i interpretacyjne, jednak dla weryfikacji

predykcji teoretycznych są one niezbędne, nawet jeśli nie spełniają perfekcyjnie wszystkich założeń modeli matematycznych. Dopiero skonfrontowanie obydwu podejść badawczych daje rezultaty zbliżające naukę do prawidłowych interpretacji biologicznej rzeczywistości.

Wątki stanowiące merytoryczną zawartość tematu osiągnięcia badawczego są aktualnie rozwijane w oparciu o dwa kierowane przeze mnie **granty**:

**-projekt NCN nr 2011/03/B/NZ8/02095** z zakresu badań podstawowych OPUS zatytułowany: "Poziom zarażenia pasożytami u ryb z rodzaju *Cobitis* (Teleostei: Cypriniformes) o płciowym i klonalnym systemie rozrodu w zróżnicowanych siedliskach", **przyznany na lata realizacji 2012-2016**,

**-projekt Polsko-Słowackiego programu wykonawczego** w ramach umowy między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej a Rządem Republiki Słowackiej o współpracy naukowo-technicznej pt.: „Wybór mikrosiedlisk u płciowych i klonalnych form ryb z rodzaju *Cobitis* (Cypriniformes) w dorzeczach Odry i Dunaju”, **przyznany na lata 2016-2017**.

Cytowana literatura:

- Bobyrev A., Burmensky V., Vasil'ev V. P., Kriksunov E. & Lebedeva E. 2003. Coexistence of triploid and diploid forms of spined loach, *Cobitis taenia*: a modelbased approach. *Folia Biologica (Krakow)* 51 (Suppl.): 55–60.
- Bohlen J. & Ráb P. 2001. Species and hybrid richness in spined loaches (of the genus *Cobitis* L. (Teleostei: Cobitidae), with a checklist of European forms and suggestions for their conservation. *Journal of Fish Biology* 59 (Suppl. A): 79–85.
- Bohlen J., Perdices A., Doadrio I. & Economidis P. S. 2006. Vicariance, colonization and fast local speciation in Asia Minor and the Balcans as revealed from the phylogeny of spined loaches (Osteichthyes; Cobitidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution* 39: 552–561.
- Boroń A. 2003. Karyotypes and cytogenetic diversity of the genus *Cobitis* (Pisces, Cobitidae) in Poland: a review. Cytogenetic evidence for a hybrid origin of some *Cobitis* triploids. *Folia Biologica (Krakow)* 51 (Suppl.): 49–54.
- Butlin R.K., Schön I., Martens K. 1999. Origin, age and diversity of clones. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 1020–1022. doi:10.1046/j.1420–9101.1999.00126.x.
- Choleva L., Apostolou A., Ráb P., Janko K. 2008. Making it on their own: sperm-dependent hybrid fishes (*Cobitis*) switch the sexual hosts and expand beyond the ranges of their



original sperm donors. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 2911.

- Choleva L., Janko K., De Gelas K., Bohlen J., Šlechtová V., Rábova M., Ráb P. 2012. Synthesis of clonality and polyploidy in vertebrate animals by hybridization between two sexual species. *Evolution* 66–7: 2191–2203.
- Culling M., Janko K., Boroń A., Vasil'ev V. P., Coté I. M. & Hewitt G.M. 2006. European colonisation of the spined loach *Cobitis taenia* from Ponto-Caspian refugia based on mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 15: 173–190.
- Hamilton W.D. 1980. Sex versus non-sex versus parasite. *Oikos* 35: 282–290.
- 48. Hernández Chávez C., Turgeon J. 2007. Asexual and sexual hybrids between *Fundulus diaphanus* and *F. heteroclitus* in the Canadian Atlantic region. *Molecular Ecology* 16: 1467–1480. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03239.x.
- Hellriegel B., Reyer H.-U. 2000. Factors influencing the composition of mixed populations of a hemiclinal hybrid and its sexual host. *Journal of Evolutionary Biology* 13: 906–918.
- Hotz H., Mancino G., Bucciinnocenti S., Raghianti M., Berger L., et al. 1985. *Rana ridibunda* varies geographically in inducing clonal gametogenesis in interspecies hybrids. *Journal of Experimental Zoology* 236: 199–210.
- Janko K. 2014. Let us not be unfair to asexuals: their ephemerality may be explained by neutral models without invoking any evolutionary constraints of asexuality. *Evolution* 68, 2: 569–576.
- Janko K., Kotlik P., Culling M.A. & Ráb P. 2005. Ice age cloning – comparison of Quaternary evolutionary histories of sexual and clonal forms of European loaches (*Cobitis*; Teleostei) using the analysis of mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 14: 2991–3004.
- Janko K., Flajšhans M., Choleva L., Bohlen J., Šlechtová V., et al. 2007. Diversity of European spined loaches (genus *Cobitis* L.): an update of the geographic distribution of the *Cobitis taenia* hybrid complex with a description of new molecular tools for species and hybrid determination. *Journal of Fish Biology* 71: 387–408.
- Janko K., Drozd P., Flegr J., Pannell J.R. 2008. Clonal turnover versus clonal decay: a null model for observed patterns of asexual longevity, diversity and distribution. *Evolution* 62: 1264–1270.
- Janko K., Drozd P., Eisner J. 2011. Do clones degenerate over time? Explaining the genetic variability of asexuals through population genetic models. *Biology Direct* 6: 17.
- Juchno D., Boroń A., Gołaszewski J. 2007. Comparative morphology and histology of the ovaries of the spined loach *Cobitis taenia* L. and natural allopolyploids of *Cobitis* (Cobitidae). *Journal of Fish Biology* 70: 1392–1411.

- Kokko H., Heubel K.U., Rankin D.J. 2008. How populations persist when asexuality requires sex: the spatial dynamics of coping with sperm parasites. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 817–825.
- Kondrashov A.S. 1988. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336: 435–440.
- Kotusz J. 2000. Intra- and interpopulation morphological variability in diploid and varied-ploidy *Cobitis* from Poland. *Folia Zoologica* 49 (Suppl. 1): 219–226.
- Kotusz J. 2008. Morphological relationships between polyploid hybrid spined loaches of the genus *Cobitis* (Teleostei: Cobitidae) and their parental species. *Annales Zoologici* 58: 891–905.
- Lively C.M. 2010. Parasite virulence, host life history, and the costs and benefits of sex. *Ecology* 91: 3–6.
- Maynard Smith J. 1978. *The evolution of sex*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Metcalfe N.B., Van Leeuwen T.E., Killen S.S. 2016. Does individual variation in metabolic phenotype predict fish behaviour and performance? *Journal of Fish Biology* 88: 298–321.
- Mezhzherin S.V. & Chudakorova T.Yu. 2002. The genetic structure of the diploid-polyploid complex of the spined loach *Cobitis taenia* (Cypriniformes: Cobitidae) from the Middle Dnieper Basin. *Russian Journal of Genetics* 38: 70–75.
- Muller H.J. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* 1: 2–9.
- Perdices A., Doadrio I. 2001. The molecular systematics and biogeography of the European cobitids based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19: 468–478.
- Popiołek M., Łuczyński T., Jarnecki H., Kotusz J. 2009. The first record of *Gyrodactylus latus* Bychowsky, 1933 (Monogenea, Gyrodactylidae) from *Cobitis elongatoides* Bacescu et Maier, 1969 (Teleostei, Cobitidae) in Poland. *Wiad. Parazyt.* 55(4): 441–403.
- Ráb P., Rábová M., Bohlen J. & Lusk S. 2000. Genetic differentiation of the two hybrid diploid-polyploid complexes of loaches, genus *Cobitis* (Cobitidae) involving *C. taenia*, *C. elongatoides* and *C. spp.* in the Czech Republic: karyotypes and cytogenetic diversity. *Folia Zoologica* 49 (Suppl.): 55–66.
- Saat T.V. 1991. Reproduction of the diploid and polyploid spinous loach (*Cobitis*, Teleostei). Oocyte maturation and fertilization in the triploid form. *Soviet Journal of Developmental Biology* 22: 332–338.
- Ritterbusch D., Bohlen J. 2000. On the ecology of spined loach in Lake Müggelsee. *Folia Zool.* 49 (Suppl. 1): 187-192.

- Šlechtová V., Lusková V., Šlechta V., Lusk S., Halačka K., Bohlen J. 2000. Genetic differentiation of two diploid-polyploid complexes of spined loach, genus *Cobitis* (Cobitidae), in the Czech Republic, involving *C. taenia*, *C. elongatoides* and *C. spp.*: allozyme interpopulation and interspecific differences. *Folia Zoologica* 49 (Suppl.): 67–78.
- Vasil'ev V.P., Vasil'eva E.D., Osinov A.G. 1989. Evolution of diploid-triploid-tetraploid complex of fishes genus *Cobitis*. In *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*, Bulletin 446 (Dawley, R. M. & Bogart, J. P., eds), pp. 153–169. Albany, NY: New York State Museum.
- Weismann A. 1889. *Essays on Heredity and Kindred Biological Subjects*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- West G.B., Brown J.H., Enquist B.J. (1997) A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science*, 276: 122–126.

#### 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Moje zainteresowania naukowe od początku kariery koncentrowały się wokół zagadnień związanych z systematyką, ekologią i biologią ewolucyjną oraz faunistyką ryb. Wybór obiektu badań jakim są ryby słodkowodne wymagał ode mnie najpierw włączenia się w zespół badawczy, który taką tematykę realizował (pozyskanie materiału do badań jest zadaniem dla ekipy kilkusobowej), a w dalszym etapie samodzielne budowanie takich zespołów i kierowanie nimi. Kolektywny charakter badań ekologii ryb znajduje odzwierciedlenie w tym, że większość publikacji stanowiących mój dorobek naukowy ma kilku autorów.

Mój indywidualny rozwój zaowocował:

- pewnymi dokonaniem na gruncie wiedzy o ewolucji płci na przykładach zaczerpniętych z ryb (wybrane prace z tego zagadnienia opisano powyżej jako osiągnięcie naukowe);

- opublikowaniem kilkunastu prac z zakresu systematyki ryb słodkowodnych;

- wykonaniem kilku studiów nad wędrówkami ryb w rzekach i wodach stojących;

- zgromadzeniem znaczącej wiedzy na temat dystrybucji ryb słodkowodnych Polski i Europy;

- wprowadzeniem do praktyki ochrony przyrody pewnych standardów monitoringu gatunków i siedlisk;

- opublikowaniem szeregu prac podstawowych i wykonaniem licznych prac aplikacyjnych o statusie ekspertyzy, które miały zapewnić ochronę zasobów ryb w warunkach narastającej antropopresji;
- opracowaniem wybranych zagadnień związanych z inwazjami biologicznymi i przedstawieniem ich w postaci kilkunastu rozdziałów w monografiach oraz jako artykuły problemowe;
- pewnymi dokonaniem w dziedzinie ichtioparazytologii.

### 5.1. Badania systematyki ryb.

Spośród całej biosfery, kręgowce należą do grupy organizmów o najwyższym stopniu zbadania (Weiner 2012). Współczesne prace taksonomiczne, dotyczące tej grupy zwierząt, rzadko służą więc odkrywaniu nowych form, czy dużym rewizjom filogenetycznym, a częściej koncentrują się na zróżnicowaniu wewnątrzgatunkowym na poziomie wybranych markerów. Taki cel miały też moje opracowania morfologiczne, wykonane jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora, dotyczące trzech gatunków kielbi: *Gobio gobio*, *G. albiginnatus* i *G. kessleri* (82<sup>1</sup>), piskorza *Misgurnus fossilis* (21), czebaczka amurskiego *Pseudorasbora parva* (20), kozy i kozy dunajskiej (wraz ze specyfiką klonalną kompleksu hybrydowego jaki te gatunki tworzą). Prace dotyczące kóz zostały wsparte badaniami cytogenetycznymi we współpracy z prof. Alicją Boroń z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Ich głównym osiągnięciem było najpierw odkrycie kozy dunajskiej (*C. elongatoides*) w wodach Polski, a następnie sporządzenie różnicującego opisu morfologicznego obu gatunków i form hybrydowych jakie tworzą (9, 17, 18, 19). Dalsze moje osiągnięcia na tym polu związane są ze współpracą z dr. Karem Janko z Czeskiej Akademii Nauk, dzięki której jestem współautorem kilku publikacji włączonych w cykl osiągnięcia naukowego, a także pracy o rozmieszczeniu rodzaju *Cobitis* w Europie oraz o ewolucji chromosomowej w tej grupie ryb (5, 13). Wiele podejmowanych przez siebie aspektów badawczych miałem okazję podsumować we współautorskiej monografii dotyczącej krajowych przedstawicieli rodziny piskorzowatych (Cobitidae) (22).

Typową pracą taksonomiczną, wykonaną w ramach zespołu kierowanego przez prof. Andrzeja Witkowskiego, jest opis morfologii mieszańca jelca i uklei (*Leuciscus leuciscus* x *Alburnus alburnus*), który po raz pierwszy został odnotowany w Polsce (6).

---

<sup>1</sup> Numeracja publikacji zgodna z załącznikiem 4.

Kolejna praca dotycząca zróżnicowania morfologicznego ryb jest owocem uczestnictwa w XVIII Naukowej Wyprawie Polarnej Uniwersytetu Wrocławskiego na Spitsbergen i dotyczy palii alpejskiej *Slavelinus alpinus*. Jej główne osiągnięcie ma implikacje bardziej ekologiczne niż taksonomiczne, a dotyczy charakterystyki trzech morfotypów tego gatunku: formy anadromicznej, stacjonarnej - rzecznej i stacjonarnej - jeziornej (10).

Inna współautorska praca dotycząca systematyki ryb miała na celu uporządkowanie naukowego i polskiego nazewnictwa ryb i minogów krajowych. Powstała ona w okresie „rewolucji” w systematyce ryb wywołanej licznymi rewizjami taksonomicznymi opartymi o, wchodzące wówczas do praktyki badawczej, metody molekularne. Wiele tradycyjnie stosowanych wówczas w Polsce nazw taksonów ryb wymagało uaktualnienia podążającego za światową literaturą (59).

## 5.2. Badania ekologii wędrówek ryb.

Zainteresowania badawcze ekologią wędrówek ryb zostały zrealizowane poprzez 1/ dwuletnie studium populacji głowacza przęgopłetwego *Cottus poecilopus* w jeziorze Hańcza, 2/obserwacje migracji ryb rzecznych w przepławce przy pierwszej (od morza) tamie przegradzającej Odrę oraz 3/ badania sezonowej dynamiki liczebności form wędrownych i stacjonarnych palii alpejskiej w jednym z cieków arktycznych.

Pierwsze z powyższych zagadnień zrealizowano w oparciu o subwencję finansową (grant) rządu Republiki Federalnej Niemiec na rzecz programu reintrodukcji *C. poecilopus* w jeziorach regionu Feldberg w Meklemburgii–Pomorzu Przednim (umowa międzynarodowa na poziomie rządowym). Naukowa część tego projektu zakładała m.in. precyzyjne rozpoznanie kluczowych parametrów środowiskowych zapewniających trwałe funkcjonowanie naturalnej populacji tego gatunku. Za najbliższą filogenetycznie i ekologicznie, do wymarłych populacji niemieckich uważana jest właśnie ta zasiedlająca jezioro Hańcza. Uzyskane we współpracy z partnerami z Niemiec dane o podstawowych parametrach populacji *C. poecilopus* w Hańczy, tj. dystrybucji, sezonowej i dobowej dynamice liczebności, a przede wszystkim o wykorzystywanych mikrosiedliskach w różnych sezonach, posłużyły jako wzorzec dla przeprowadzonego w kolejnych etapach projektu uzdatnienia siedlisk pod kątem reintrodukcji tego gatunku do dwóch jezior w Niemczech (Schmaler Luzin i Breiter Luzin). Poza aspektem użytkowym tych badań, ich wartością na poziomie nauk podstawowych jest odkrycie nieznannej dotąd cechy behawioralnej głowacza przęgopłetwego jakim jest wiosenna migracja pionowa do strefy litoralnej jeziora w celu odbycia tarła. Od

kwietnia do końca czerwca w litholitoralu odnajdywane były tarlaki, a pod koniec tego okresu również gniazda ze złożami ikry. Pozostałą część roku głowacze spędzają w znacznym rozproszeniu, w chłodnych strefach sublitoralu i profundalu jeziora (27, 28, 62).

Całoroczne odłowy ryb prowadzone w przepławce towarzyszącej pierwszej odrzańskej tamie – Wały Śląskie (w aspekcie sezonowym i dobowym) pozwoliły udokumentować dynamikę wędrówek dwudziestu dwóch gatunków ryb w celach rozrodczych, pokarmowych, bądź w poszukiwaniu refugium zimowych. Analiza aktywności migracyjnej tych gatunków wskazała na związek jej intensywności ze zmiennymi wartościami parametrów hydrologicznych rzeki takimi jak temperatura wody i poziom jej przepływu. Uzyskane wyniki potwierdziły informacje o dramatycznym załamaniu się stanu populacji gatunków diadromicznych w tej rzece (minóg rzeczny, węgorz, certa, troć) i niektórych gatunków reofilnych (piekielnica, brzana, świnka), przy zdominowaniu zespołu ichtiofauny przez gatunki ubikwistyczne, takie jak ukleja, kiełb i płoć. Badania te dały też obraz ilościowych relacji w zespole ichtiofauny zasiedlającym środkową Odrę. Rezultat ten jest o tyle wartościowy, że metodyka obiektywnych badań ilościowych ryb w tak dużej rzece ma wiele fizycznych ograniczeń, dlatego też należą one do rzadkości (14). Aplikacyjna wartość tej pracy to wskazanie błędów konstrukcyjnych przepławki oraz sformułowanie zaleceń odnośnie jej przebudowy, opublikowane w osobnym artykule (65).

Badania z zastosowaniem elektropólów ryb w rzece Ariebekken na Spitsbergenie i analiza sezonowych zmian w strukturze wiekowej populacji palii alpejskiej – jedyne gatunku ryby w wodach śródlądowych Svalbardu – pozwoliły na opis „timingu” smoltyfikacji u formy anadromicznej tego gatunku (11).

5.3. Badania ichtiofaunistyczne i ich implikacje w praktyce ochrony przyrody i zarządzania środowiskiem przyrodniczym.

Znaczna część mojej aktywności badawczej, od początku kariery została poświęcona na realizację zespołowych projektów związanych z ichtiofaunistyką, które od niemal półwiecza stanowią statutowe zadanie mojej macierzystej instytucji badawczej, tj. Muzeum Przyrodniczego Uniwersytetu Wrocławskiego. Zainicjowane i do dziś kierowane przez prof. Andrzeja Witkowskiego badania, zaowocowały opracowaniem struktury zespołów ryb w wodach śródlądowych, w różnych regionach Polski (głównie na Śląsku). Standardowo odnoszą się one do rozsiedlenia ryb wzdłuż podłużnych profili cieków, do liczebności ich

populacji (względne zagęszczenie, biomasa) i do wskaźników biocenotycznych (zróżnicowanie gatunkowe, stałość występowania i dominacja). W pracach prowadzonych wielokrotnie na tych samych rzekach dodatkowo uwzględniają aspekt czasowy w zmianach ichtiofauny (indeks wymiany fauny, trendy liczebności itp.). Ponadto zawierają one konkluzje na temat ochrony, bądź zarządzania tymi zasobami przyrodniczymi (**40, 44, 48, 55, 57, 71, 75, 78, 81**).

Pochodną aktywności terenowej mojego zespołu badawczego są też korekty i uzupełnienia wiedzy o zasięgach występowania niektórych rodzimych gatunków (**46, 58, 76, 82**). Jakkolwiek tego typu działalność badawcza jest konsekwentnie deprecjonowana w polskim systemie ewaluacji prac naukowych, dostarcza ona absolutnie niezbędnej, podstawowej wiedzy dla nauk środowiskowych, a także danych o bezpośredniej wartości użytkowej nt. zasobów przyrodniczych naszej planety.

Dzięki zaangażowaniu w te projekty (finansowane częściowo z funduszy zewnętrznych) mogłem uczestniczyć w syntetycznych opracowaniach w celu sporządzenia czerwonych list gatunków ryb Polski (**42, 49, 73**), czy w celu przedyskutowania tendencji statusu gatunków, zagrożeń antropogenicznych, czy zarządzania tymi zasobami. Zostały one zrealizowane jako artykuły oryginalne i/lub przeglądowe w czasopismach naukowych (**52, 60, 61, 68, 70, 79**), bądź jako rozdziały w monografiach (**30, 38**). Pozwoliło mi ono też uczestniczyć w projekcie międzynarodowym dotyczącym rozszedlenia ryb z rodziny piskorzowatych (Cobitidae) na Węgrzech (**15**). Jedną z ciekawszych prac przeglądowych przedstawia stan współczesnej ichtiofauny głównych systemów rzecznych południowego Bałtyku w kontekście zoogeograficznym, stanowiąc pierwsze takie studium w Polsce (**61**).

Ten wieloletni projekt prowadzony przez Muzeum Przyrodnicze U. Wr. ma ważne zastosowanie w warstwie aplikacyjnej. Rozpoznanie stanu zasobów przyrodniczych Polski stanowi bowiem podstawę do stanowienia prawa rozumianego jako obejmowanie ochroną gatunków zagrożonych, wyznaczenie obszarów chronionych, czy formułowanie decyzji środowiskowych na etapie planowania przestrzennego. W ten aspekt mojej działalności naukowej wpisuje się opracowanie dwóch rozdziałów Polskiej Czerwonej Księgi Zwierząt (piskorz, koza złotawa) (**31, 32**), 41 projektów raportów dla Komisji Europejskiej o stanie ochrony gatunków ryb słodkowodnych Polski (wraz z dr. Janem Kusznierelem z Instytutu Biologii Środowiskowej U. Wr.) oraz opinia dla Państwowej Rady Ochrony Przyrody w sprawie ochrony gatunkowej ryb Polski, na potrzeby przygotowania Ustawy o Ochronie Przyrody z 16 kwietnia 2004 roku (**E16**).

Pochodną moich zainteresowań w zakresie rozmieszczenia ryb była praca na rzecz konsorcjum FAME, dla którego zebrałem i przetworzyłem dane o dystrybucji krajowych gatunków pod kątem zastosowania ich do wypracowania metodyki Europejskiego Indeksu Rybnego (EFI). Kompletna baza danych została następnie wykorzystana w pracach koordynowanych przez Główny Inspektorat Ochrony Środowiska (**E14**).

Być może najważniejszym osiągnięciem z tego obszaru działalności jest jednak sporządzenie zestawu danych o ichtiofaunie Polski obejmującego 41 400 rekordów (stwierdzeń gatunków). Każdy rekord został zaczerpnięty z rezultatów prac ichtiofaunistycznych prowadzonych w Polsce od połowy dwudziestego wieku, a następnie zidentyfikowany geograficznie i odpowiednio sparametryzowany do formatu cyfrowej bazy danych. W efekcie tych prac, prowadzonych w ramach kierowanego przez mnie zadania Siódmego Programu Ramowego UE (projekt BioFresh), powstała jedna z najbogatszych tego typu kolekcji w Europie. Przekazana do otwartego użytkowania w bazie: „Global Biodiversity Information Facility”, stanowi fragment dokumentacji światowego dziedzictwa przyrodniczego i może być wykorzystywana w modelowaniu zjawisk przyrodniczych bądź gospodarczych o charakterze lokalnym i globalnym (**K5**).

Indywidualnie i współautorsko wykonane ekspertyzy dla organów państwowych, organizacji pozarządowych i podmiotów gospodarczych wnoszą do wiedzy dane natury inwentaryzacyjnej, wskazują kierunki w zarządzaniu zasobami ryb dziko żyjących lub zawierają zestawy praktycznych zaleceń (często nowatorskich) zmierzających do ochrony naturalnych populacji ryb podczas prowadzenia inwestycji jak i po jej zakończeniu.

Do najważniejszych sukcesów wprowadzonych przeze mnie zaleceń budowlanych zaliczam wykonanie „schronisk dla ryb” zaprojektowanych według mojej koncepcji (dla zwiększenia powierzchni tarlisk ryb litofilnych) w korycie Odry na obszarze „Wrocławskiego Węzła Wodnego” (**E10**), rozebranie zbędnego progu piętrzącego wody Dzikiej Orlicy, który istotnie ograniczał kontakt reprodukcyjny pofragmentowanej populacji głowacza białopłetwego (**E7**) i przyjęcie do wdrożenia (zawarcie w decyzji środowiskowej) konstrukcji wskazanego przeze mnie typu przepławki dla ryb o charakterze bystrotoku, która towarzyszyć będzie małej elektrowni wodnej na jednym z potoków należących do systemu rzecznej Nysy Kłodzkiej (**E5**). Na wdrożenie oczekują też moje autorskie koncepcje budowli różnicujących przepływ wody w urządzeniach spustowych suchych zbiorników wodnych „Szalejów Górny” i „Krosnowice” (oba w dorzeczu Nysy Kłodzkiej) (**E2**, **E3**). Niewątpliwą wartość aplikacyjną mają też ekspertyzy polegające na opracowaniu strategii ochrony



zasobów ryb różnych obszarów, jednak ich realizacja pozostaje w rękach wykonawców moich zaleceń czy sugestii (**E1, E6, E13, E14**).

Ważna część mojej aktywności zawodowej poświęcona została naukowemu opracowaniu metodyki „Monitoringu gatunków i siedlisk przyrodniczych ze szczególnym uwzględnieniem specjalnych obszarów ochrony siedlisk Natura 2000” w zakresie ryb i minogów. Projekt ten, realizowany dwuetapowo pod kierunkiem Instytutu Ochrony Przyrody PAN, zakończył się opracowaniem szczegółowych procedur prowadzenia monitoringu, w którym uczestniczyło kilkunastu specjalistów. Moje indywidualne autorstwo dotyczyło rozdziału o głowaczu białopłetwym *Cottus gobio* (**24**). Zanim jednak doszło do publikacji poradnika metodycznego, koordynowałem pilotażowym programem monitoringu głowacza białopłetwego, w latach 2006-2010, a moje doświadczenia zostały wykorzystane do sformułowania finalnej, przyjętej przez Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, metodyki monitoringu ryb i minogów słodkowodnych. W latach 2002-2004 uczestniczyłem też w pracach, których celem było wskazanie głównych zagrożeń, zaproponowanie działań ochronnych i monitoringu ryb rzecznych (**60**).

Równolegle do powyżej opisanych projektów, uczestniczyłem także w badaniach ichtiologicznych w dwóch dolnośląskich parkach narodowych: Karkonoski PN, i PN Gór Stołowych. Opublikowane prace dotyczyły nie tylko podstawowych wskaźników rozmieszczenia gatunków, ale też tempa wzrostu, struktury populacji oraz biomasy dominującego elementu tamtejszej ichtiofauny – pstrąga potokowego *Salmo trutta fario* (**39, 41, 45, 50, 69**). Wyniki tych prac weszły w skład rozdziałów w obszernych monografiach obu parków narodowych (**23, 29**).

#### 5.4. Studia nad inwazjami biologicznymi wśród ryb i badania parazytologiczne.

Zjawiska introdukcji i inwazji biologicznej ryb są kolejnym obszarem moich zainteresowań badawczych. Prace naukowe jakie poświęciłem tym zagadnieniom można podzielić na trzy kategorie. Pierwsza z nich to artykuły bazujące na własnych danych, donoszące o odkryciu, bądź o dyspersji nowych gatunków obcych w faunie Polski (czebaczek amurski, pirapitinga, tilapia nilowa, muławka wschodnioamerykańska; **66, 67, 72, 80**). Druga to rozdziały w książkach o charakterze monograficznym traktujące o gatunkach obcych w faunie Polski (sumik karłowaty, karaś srebrzysty, czebaczek amurski, bufalo czarny, tilapia nilowa, muławka wschodnioamerykańska, babka łyśa; **25, 26, 33-37**). Trzecią kategorię

stanowi pojedyncza, współautorska praca problemowa podsumowująca zagadnienie inwazji ryb w wodach śródlądowych w skali całej Polski (7).

Dyscyplina naukowa, która stale zyskuje na znaczeniu w moich badaniach to ichtioparazytologia. Wszystkie prace z tego zakresu są realizowane we współpracy z dr. hab. Marcinem Popiołkiem z Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Dwie z nich mają znaczącą wagę w wyodrębnionym osiągnięciu naukowym (1, 4). Trzy prace o charakterze doniesień opisują stwierdzenia nowych pasożytów (generalnie, lub dla Polski) dla rodzaju *Cobitis*: *Allocreadium transversale* (Digenea), *Gyrodactylus latus* (Monogenea) (16, 47, 63). Jedna z prac przedstawia listę pasożytów ryb stwierdzoną w jednym z parków narodowych (64), a inna wykracza poza standardowy zakres moich obiektów badawczych, ponieważ traktuje o populacji reniferów Spitsbergenu w układzie żywicielsko-pasożytniczym (12). Dwie prace przeglądowe z zakresu ichtioparazytologii mają na celu podsumowanie wiedzy na temat wybranych gatunków ryb i ich fauny pasożytniczej (piskorz, głowacica) (8, 43), a kolejna – krytyczne przedyskutowanie stanu wiedzy o poziomie zbadania ryb pod kątem parazytologicznym w Polsce (54).

Data i podpis:

24-05-2016

