

Zielona Góra, 15.07.2021 r.

Dr hab. Bartłomiej Najbar
Zakład Zoologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Zielonogórski

Ocena rozprawy doktorskiej pana mgr Grzegorza Jana Skórzewskiego pt.:

**Status taksonomiczny i przebieg strefy hybrydyzacji padalca zwyczajnego
Anguis fragilis L. i kolchidzkiego *A. colchica incerta* (Nordmann, 1840)
(Anguidae; Squamata) na terenie Polski**

Dostępność nowych technik laboratoryjnych, w szczególności zaawansowanych analiz genetycznych, umożliwia identyfikację trudnych do rozpoznania kompleksów gatunkowych nawet w - jakby się wydawało – dotychczas dobrze faunistycznie poznanych obszarach np. w Europie. Przykładami takich kompleksów gatunków płazów i gadów, które w ostatnich latach były, i nadal są obiektami intensywnych badań zespołów naukowych to np.: traszka grzebieniasta *Triturus cristatus* (Wielstra i in. 2017; 2019), ropucha zielona *Bufo viridis* (Dufresnes i in. 2019), rzekotka drzewna *Hyla arborea* (Gvoždík i in. 2015; Dufresnes i in. 2020) czy zaskroniec zwyczajny *Natrix natrix* (Kindler et al. 2017). Poza nimi, badanie rozmieszczenia innych gatunków takich kompleksów pozostawało w tyle i słusznie należało je uznać za słabo poznane, zwłaszcza w rejonach utworzenia prawdopodobnych stref ich wtórnego kontaktu i niewyjaśnionych tras migracji z refugium postglacjalnych (Wielstra i in. 2014; 2018; Mizsei i in. 2018). Dobrym przykładem są tu bez wątpienia przedstawiciele rodziny padalcowatych (*Anguidae*), szczególnie należących do rodzaju padalec (*Anguis*), które jako kompleks taksonów były przez długi czas traktowane

jako jeden gatunek (*A. fragilis*) z dwoma lub trzema podgatunkami i słabo rozpoznanym rozmieszczeniem geograficznym rozciągającym się na długości ok. 5500 km, od Półwyspu Iberyjskiego po Nizinę Zachodniosyberyjską na wschodzie i na szerokości ok. 2500 km, od Wielkiej Brytanii na północy po Iran na południu (Wermuth 1950; Voipio 1962; Džukić 1987; Cabela i Grillitsch 1989). Intensywność badań nad padalcami wzrosła się z końcem XX w. Od czasu rozpoczęcia ich lepszego poznawania w sferze taksonomicznej (Grillitsch i Cabela 1990; Mayer i in. 1991), w pierwszej kolejności za odrębny gatunek został uznany padalec peloponeski (*A. cephallonica*), dawniej znany także jako podgatunek *A. fragilis* tj. *A. fragilis peloponnesiacus*. Był on także w Atlasie rozmieszczenia płazów i gadów w Europie jedynym taksonem zmapowanym oddzielnie (Gasc i in. 1997). Z kolei padalec zwyczajny *Anguis fragilis* (sensu lato) został wyróżniony przez Gvoždíka i in. 2013, na podstawie badań mitochondrialnego (mtDNA) i jądrowego (nDNA) DNA, jako kompleks gatunkowy. Wyróżniono wówczas trzy gatunki tj.: padalca zwyczajnego (*A. fragilis* sensu stricto) zasiedlającego zachodnią Europę i najczęściej charakteryzującego się 24–26 rzędami łusek wokół środkowej części ciała (Sos 2010; Gvoždík et al. 2013; Gvoždík i Moravec 2015), padalca kolchidzkiego (lub syn. wschodniego) *A. colchica*, zasiedlającego wschodnią Europę, Anatolię i regionie pontokaspjskim, i zazwyczaj z 28-30 rzędami łusek wokół środka ciała (Sos 2010; Gvoždík i Moravec 2015; Moravec i Gvoždík 2015) oraz bytującego w południowych Bałkanach padalca greckiego (*A. graeca*) z 24-26 rzędami łusek wokół środka ciała (Cabela i Grillitsch 1989; Grillitsch i Cabela, 1990). Nieco później na podstawie mtDNA, nDNA i danych morfologicznych rozpoznano także kolejny takson zasiedlający Półwysep Apeniński i południowo-wschodnią Francję. Był to padalec włoski (*A. veronensis*) również o 24-26 rzędach łusek wokół środka ciała (Gvoždík i in. 2013; Jablonski i in. w przygot.).

Intensywne prace nad tą grupą taksonów w ostatnich latach przyczyniły się także do podsumowania danych dotyczących całkowitych obszarów ich występowania i nakładania się. Największy rozpoznany zasięg obejmuje *A. colchica*, to dzisiaj szacowane ok. 3 300 000 km², z najbardziej wysuniętym na zachód zasięgiem w Europie środkowo-wschodniej, na wschód w Rosji, na północy w Finlandii oraz na południu w Turcji oraz północnym Iranie. *Anguis fragilis* z obszarem występowania ponad 2 000 000 km² ma wysunięty na zachód zasięg na Płw. Iberyjskim, najbardziej wysunięty na wschód i północ w krajach bałtyckich, Szwecji i na południu w Grecji. *Anguis veronensis* o zasięgu ponad 180 000 km² na zachodzie sięga południowej Francji, ale większość stanowisk znajduje się na Półwyspie Apenińskim. *Anguis graeca* zasiedla obszar ponad 60 000 km² z wysuniętym na zachód zasięgiem u wybrzeży Adriatyku, na wschodzie w Macedonii Północnej, na północy w Czarnogórze i Albanii, a na południu na Peloponezie. *Anguis cephallonica* ma zasięg ok. 15 000 km² ograniczony do Półwyspu Peloponeskiego.

Łącznie w ostatnich latach przeanalizowano niemal 30 000 stanowisk występowania padalców w Eurazji tj. na obszarach, które kiedyś uważano za obszerny zasięg występowania tylko *A. fragilis*. Dzięki tym badaniom zidentyfikowano nie tylko obszary występowania poszczególnych taksonów, a także, takie w których pożądane są dalsze badania, w szczególności dla zrozumienia charakteru funkcjonowania międzygatunkowych stref kontaktu, co ma szczególne znaczenie w świetle ostatnich publikacji filogeograficznych (Gvoždík et al. 2010, 2013; Szabó i Vörös 2014; Thanou, Giokas i Kornilios 2014; Jablonski i in. 2016; 2017; Jablonski i in. w przygot.).

Przedstawiona mi do recenzji praca przygotowana na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr hab. Jana Katusza i dr Bartosza Borczyka bardzo dobrze wpisuje się w zakres aktualnie prowadzonych w Europie badań obejmujących rodzaj *Anguis* - tu z uwzględnieniem terytorium Polski - które okazuje się interesującym obszarem występowania zarówno padalca zwyczajnego i kolchidzkiego, oraz długiej być może nawet na kilkaset i szerokiej na kilkadziesiąt kilometrów strefy mieszańcowej, z padalcami nierzadko trudnymi do zdiagnozowania, zwłaszcza w warunkach terenowych.

Pracę tradycyjnie podzielono jest na 6 głównych części: wstęp, materiały i metody, wyniki, dyskusja, diagnostyka taksonomiczna, wnioski, a ponadto umieszczono streszczenie w j. polskim i angielskim, bibliografię oraz tablice i załączniki. Praca liczy 129 stron, z czego tekst zajmuje 102 strony, tablice i załączniki 6 stron, bibliografia 12 stron. Układ pracy jest poprawny.

Badania były realizowane zgodnie w uzyskanym zezwoleniem GDOŚ i dziekana Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Tytuł rozprawy jest zgodny z zawartą w niej treścią, jakkolwiek pomiędzy założeniami etapu formułowania tytułu, a uzyskanymi wynikami badań istnieje duża rozbieżność, co wskazuje na bardzo ciekawą nieprzewidywalność wcześniej podjętych badań. Nazwa łacińska padalca zwyczajnego powinna być przytoczona w całości, a nie w formie skrótowej.

Rozdział 1. Wstęp podzielony został na cztery podrozdziały obejmujące: omówienie istotnej roli taksonomii w współczesnej nauce, opis rodzaju *Anguis* wraz z ich systematyką, występowaniem,

preferencjami siedliskowymi poszczególnych taksonów i dietą, zarysem historii badań nad przedstawicielami tego rodzaju i cechami diagnostycznymi gatunków typowych oraz mieszańców zasiedlających strefy hybrydyzacji. W części tej zaprezentowano również 7 hipotez badawczych zakładających wykazanie zgodności diagnoz molekularnych i morfologicznych przedstawicieli padalcowanych zasiedlających terytorium Polski, opis ich zróżnicowania na podstawie cech zewnętrznych oraz na podstawie dwóch diagnostycznych markerów molekularnych ND2 (mtDNA) i RAG1 (nDNA), identyfikację stanowisk i stref hybrydyzacji *A. fragilis* i *A. colchica*, oraz porównanie składu pokarmu obu tych taksonów.

Rozdział 2. Materiały i metody. Podzielono go na 5 części, w których szczegółowo opisano obszerny materiał wykorzystany w analizach morfologicznych, sposób określania przez Autora przynależności gatunkowej, metody molekularne, procedury laboratoryjne, analizy filogenetyczne, cechy metryczne, analizę ubarwienia i składu pokarmu 80 przedstawicieli obu wyróżnianych taksonów i ich hybryd.

Łącznie w latach 2015-2017 zebrano materiał pobrany od różnej liczby osobników pochodzących z 36 populacji zasiedlających terytorium Polski. Badania morfologiczne uzupełniano okazami pochodzącymi z Muzeum Przyrodniczego Uniwersytetu Wrocławskiego, Muzeum Instytutu Zoologii PAN i Muzeum Narodowego w Pradze.

Rozdział 3. Wyniki. Pierwsza część tego rozdziału poświęcona została analizom molekularnym (genomu mitochondrialnego ND2) uzyskanym od padalców pozyskanych łącznie z 31 stanowisk tj.: *A. fragilis* z 19 stanowisk, *A. colchica* z 10 stanowisk i hybryd z 2 stanowisk (Kędzierzyn-Koźle i Tarnowskie Góry). Badania te pozwoliły na stwierdzenie charakterystycznych dla *A. fragilis* i *A. colchica* markerów ND2 w obrębie analizowanych stanowisk i określenie jednego z ważnych stwierdzeń odnoszących się do niestanowienia przez linię Wisły granicy rozmieszczenia padalców. Skądinąd wiadomo, że padalce są słabymi i mało wytrzymałymi pływakami stroniącymi od pokonywania szczególnie głębszych partii wody, m. in. szerokich rzek, stąd można przypuszczać, że ich migracje mogą mieć znacznie bardziej skomplikowaną historię niż dotychczas przypuszczano. A tej części pracy wykazano ponadto, że strefa kontaktu pomiędzy gatunkami w różnych obszarach jest zróżnicowana i może wahać się pomiędzy 30 i 50 km.

Następnie Autor przeanalizował zróżnicowanie genetyczne 51 os. *A. fragilis* uwzględniając zarówno materiał własny jak również ten umieszczony w GenBanku, stwierdzając 12 haplotypów ND2 oraz 13 mutacji. Haplotypy te były typowe dla Illyrian – Central European haplogroup. Z kolei u *A. colchica* wykazano 10 haplotypów, z czego 5 nowych. Analiza haplotypów RAG1 pozwoliła na stwierdzenie 11

różnych haplotypów, z czego 8 u osobników *A. colchica* i 4 u *A. fragilis*. Na uwagę wg Autora zasługuje najrzadszy haplotyp 2 stwierdzony u *A. colchica* z Białowieży i Lutczy (tj. miejscowości oddalonych o 350 km), a także u 4 osobników z Celestynowa (tj. 180 km od Białowieży i 255 km od Lutczy), u których część sekwencji tworzy mocno podparte klady będące liniami siostrzanymi dla głównego haplotypu *A. fragilis*, a część jego potomne sekwencje.

W dalszej części Autor porównał zmienność haplotypów RAG1 u krajowych *A. fragilis* z osobnikami pochodzącymi z innych obszarów Europy (Hiszpanii, Słowenii, Czech, Rumunii), a także u *A. colchica* z południowej części Polski (z obszaru Górnego Śląska) oraz Węgier wykazując duży związek pomiędzy tymi haplotypami.

Bardzo dużo miejsca doktorant poświęcił morfometrii padalców (rozmiarom ciała i wymiarom i charakterowi wzrostu głowy, allometrii głowy, zróżnicowaniu kształtów głowy), ponadto otarczowaniu wokół - istotnej w tym przypadku - centralnej części ciała, brzusznej strony ciała, liczbie łusek wargowych dolnych oraz górnych i ich specyficznemu ubarwieniu na grzbietowej i brzusznej stronie ciała oraz na ich styku. Analizował on także obecność lub całkowity albo jednostronny brak otworu słuchowego i rodzaj kontaktu między tarczkami przedczołowymi.

Poświęcenie tak dużej uwagi tym zagadnieniom jest zupełnie zrozumiałe, gdyż poza analizami molekularnymi, uważanymi przez wielu badaczy za podstawowe informacje określające przynależność gatunkową, niewątpliwie stanowią one także podstawową wiedzę umożliwiającą odróżnienie poszczególnych osobników w terenie na podstawie cech fenotypowych. Tu dużym ułatwieniem może być zwłaszcza analiza ukształtowania tarcz wierzchniej części głowy i rodzaj kontaktu między tarczami przedczołowymi, oraz obecność lub nieobecność, jednostronność lub obustronność położenia otworu słuchowego. Ważnym elementem charakteryzującym poszczególne populacje jest ich ubarwienie. Tu Autor analizował obecność plam na grzbiecie, kolorystykę spodniej części ciała, kontrast grzbietowo-brzuszny, obecność linii centralnej i plam za głową. Na uwagę zasługuje opis formy jasnopopielatej występującej w brzusznej partii ciała zaledwie u kilku osobników. Osobiście wielokrotnie widywałem tak ubarwione padalce, ale zawsze tego rodzaju zabarwienie związane było z specyfiką procesów fizjologicznych uwidaczniających się podczas jednej z faz linienia, a nie było stałą cechą poszczególnych osobników. Chciałbym zobaczyć tak ubarwione padalce, podobnie jak te zwane turkusowymi, niegdyś przedstawionymi w jednym z atlasów płazów i gadów Polski.

W końcowej części tego rozdziału doktorant przedstawił analizę składu pokarmu zawartości żołądków 28 *A. fragilis*, 13 os. *A. colchica* i 2 os. hybryd, nie wykazując dużych różnic wśród ofiar tych padalców. Tu

zapewne przydało by się przeanalizowanie nieco większej partii materiału pochodzącego z obszerniejszego terytorium prowadzenia badań.

Rozdział 4. Dyskusja. To obszerne omówienie rozmieszczenia i zróżnicowania genetycznego padalców zasiedlających obszar Polski, i nawiązujące do historii europejskich badań nad tą grupą gadów, rozpoczynającą się w latach 60. XX w. Jak widać dyskusja ta trwa do dzisiaj i nierzadko brak w niej jednomyślności wśród badaczy, co nadal czyni ten temat bardzo ciekawym. Ponadto w części tej Autor na podstawie badań własnych i danych z literatury ustosunkował się do analizy możliwości powstania lokalnych stref hybrydyzacji, przydatności analiz osobniczych cech morfologicznych takich jak: wielkość i kształt głowy, ukształtowanie poszczególnych tarczki pileusa, obecność lub całkowity lub jednostronny brak otworu słuchowego, indywidualność ubarwienia oraz liczba i zmienność liczby łusek w środkowej części tułowia tj. cech wykorzystywanych w tzw. tradycyjnej taksonomii, oraz podczas rozważań nad ewolucją zróżnicowania cech diagnostycznych w całej podrodzinie *Anguinae*.

Zapewne do ciekawszych spostrzeżeń należy wykazanie istnienia osobników, których cechy wskazują na możliwość obecności w Polsce co najmniej dwóch oddzielnych stref hybrydyzacji. Jedna z nich ma znajdować się na Górnym Śląsku, gdzie najprawdopodobniej jest ona naturalnym przedłużeniem tej strefy przebiegającej przez Bramę Morawską na teren Czech, a kolejna na Pojezierzu Mazurskim, które może być obszarem migracji i mieszania się osobników ze wschodniej Europy, na co już w 1962 r. wskazywał Voipio. Analogiczne zjawisko dotyczy innych gatunków, np. żółwia błotnego *Emys orbicularis*, którego populacje zasiedlające wschodnią, północną i centralną Polskę (migrujące w holocenie z historycznego refugium znajdującego się w rejonie Morza Kaspijskiego) genetycznie znacznie różnią się od osobników zasiedlających zachodnią Polskę (które migrowały południem Europy właśnie m. in. przez Bramę Morawską na północ i zachód Europy). Populacje te rozdzieliły się już ok. 1,5 miliona lat temu, w związku z czym żółwie z zachodniej Polski są genetycznie bardziej podobne do tych z Francji niż z Poleskiego Parku Narodowego czy okolic Radomia.

Wydawałoby się, że herpetofauna Polski licząca w sumie niewiele gatunków została dość dobrze poznana pod wieloma względami. Jednak na podstawie badań przeprowadzonych w ostatnich latach obejmujących np. traszki (*Lissotriton* sp.), rzekotki (*Hyla* sp.) ropuchy zielone (*Bufo* sp.), salamandry płamiste (*Salamandra salamandra*), wynika, że jest wręcz odwrotnie. Wiele jest jeszcze do zbadania, poczynając - wydawałoby się od najprostszych i zaniedbanych badań faunistycznych - poprzez wykazywanie nowych stanowisk nie tylko rzadkich taksonów, ale też gatunków dynamicznie zmieniających zasięgi swego występowania w wyniku np. zachodzących zmian klimatycznych, a kończąc

na zaawansowanych badaniach laboratoryjnych. W te badania, jak już powyżej wspominałem, wpisuje się recenzowana praca.

Rozdział 5. Rozdział ten dotyczy diagnozy taksonomicznej badanych taksonów oparty o materiały własne oraz dane literaturowe, w których Autor niniejszego opracowania oraz badacze z innych krajów opisują cechy charakterystyczne europejskich przedstawicieli rodzaju *Anguis* i wykazują ich nierzadko bardzo rozległe strefy mieszańcowe, w związku z czym zastanawiają się nad poprawnością wykazywania odrębności gatunkowej *A. fragilis* i *A. colchica*. Rozważania te obejmują między innymi padalce pochodzące z obszaru Węgier (Szabó i Vörös 2014), Czech (Šifrová 2017) oraz północnych Włoch, gdzie podobna sytuacja obejmuje *A. fragilis* i *A. veronensis* (Gvoždik i in. 2013). W zdaniu kończącym tę część Autor, w związku z wykazaniem niewykształcenia się skutecznych mechanizmów izolacji rozrodczej, proponuje rozważenie przywrócenia wcześniej powszechnie funkcjonującej taksonomii obu badanych przez siebie taksonów do podgatunków tj. do *A. fragilis fragilis* i *A. fragilis colchica*.

Rozdział 6. Wnioski. Dysertację kończy 7 wniosków. Spośród nich najważniejszy jest pierwszy, nawiązujący do przedstawionego w poprzedniej części rozważania nad zasadnością wyróżniania dwóch odrębnych gatunków padalców występujących w Polsce. Ku formułowaniu tego wniosku ma przekonywać przede wszystkim obecność osobników o hybrydowym genomie starszych niż pokolenie F1. Ponadto we wniosku 6 analogiczny skład pokarmu obu taksonów (brak różnic jakościowych) ma prawdopodobnie wskazywać na ich podobne preferencje siedliskowe. Pozostałe wnioski o mniejszym znaczeniu, ale istotne z punktu widzenia naukowego i praktycznego dotyczą cech morfologicznych, jakościowych, widoczności otworu słuchowego i allometrii wzrostu w obrębie głowy.

Uwagi

Z dużym zainteresowaniem zapoznałem się z treścią przedstawionej mi pracy opisującej stan specjacji dwóch ciekawych taksonów, prowadzących skryty tryb życia. Jak się okazało, charakteryzują się one niepełną izolacją reprodukcyjną, kontynuują historyczną wymianę genów m. in. dzięki nieskutecznemu oddziaływniu barier geograficznych, a może też dzięki ekologicznej roli gradientów środowiskowych oraz przejawom specyficznych zachowań. Kontakty te muszą zachodzić losowo, a poszczególne populacje istnieją w stałych lub nieciągłych kontaktach. Na styku takich populacji powstają zazwyczaj interesujące strefy hybrydowe, z osobnikami ciekawymi do badań, ale trudnymi do zidentyfikowania, dzięki którym

część z naukowców dąży do wydzielenia w ten sposób funkcjonujących taksonów, podczas gdy inni na gruncie swoich badań i przemyśleń wnoszą o powrót do wyróżniania wśród nich podgatunków.

Nie znalazłem w pracy tej uchybień zarówno w odniesieniu do analizy już historycznej literatury naukowej poświęconej rodzinie padalcowatych, ani do przeprowadzonych badań własnego materiału i skonfrontowaniu go z najbardziej aktualnymi wynikami badań innych naukowców. Doktorant nie uniknął drobnych błędów językowych, stylistycznych, stosowania poprawności cytowania prac i przypisywania do nich konkretnych autorów (zmieniając je nawet kilkakrotnie), ale w mojej ocenie, w żadnym stopniu nie wpływa to na ogólną i ostateczną ocenę tej pracy.

Ewentualne pytania do Doktoranta

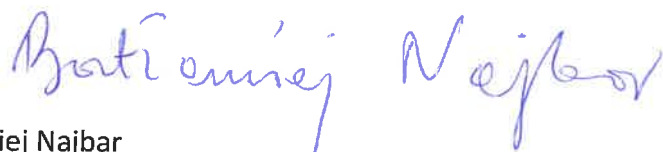
- 1) Jakie badania Pana zdaniem powinny być najpilniej kontynuowane w celu bardziej dogłębnego rozpoznania stanu "czystych i mieszanych" populacji badanych taksonów w Polsce ?
- 2) W jakim kierunku może rozwijać się współistnienie obu badanych taksonów w ich strefach powszechnego kontaktu, uwzględniając przewagę fizyczną samców formy *colchica* nad *fragilis* ?
- 3) Czy badane taksony, w świetle wykazanych przez Doktoranta podobieństw i różnic pomiędzy nimi, mogą "wymagać" odmiennych sposobów ich ochrony w środowisku naturalnym ?

Ocena końcowa

Wartość merytoryczna rozprawy jest dobra, prace terenowe i laboratoryjne zostały dobrze zaplanowane i wykonane, a analiza statystyczna obszerna i prawidłowa. Cele postawione w rozprawie zostały osiągnięte zaś wyniki szczegółowo przedyskutowane.

Praca ta ma znaczącą wartość naukową i przedstawia wyniki oryginalnych badań. Temat pracy bardzo dobrze wpisuje się w badanie zagadnień taksonomicznych szeroko prowadzonych m. in. w Europie, zwłaszcza nad przedstawicielami rodzaju *Anguis*. Uzyskane wyniki z pewnością będą szeroko dyskutowane i przydatne w dalszych badaniach nad tymi ciekawymi przedstawicielami gadów.

Stwierdzam, że recenzowana przeze mnie praca doktorska pana mgr Grzegorza Jana Skórzewskiego spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie pana mgr Grzegorza Jana Skórzewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Bartłomiej Najbar
Zakład Zoologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Zielonogórski
65-001 Zielona Góra, ul. prof. Z. Szafrana 1