

Autoreferat

1. Dane osobowe

Agnieszka Paulina Kijewska

Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej
Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk
Ul. Powstańców Warszawy 55
81-712 Sopot
e-mail: agnes@iopan.gda.pl

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

1999 - Tytuł magistra w zakresie biologia ogólna

Praca magisterska: Wpływ *Stenurus minor* (Pseudaliidae: Metasrongyloidea) na narząd słuchu morświna (*Phocoena phocoena*, L.).

Promotor: prof. dr hab. Antoni Jerzy Rokicki.

Jednostka: Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii

2004 - Stopień doktora w zakresie biologia

Rozprawa doktorska: Systematyka wybranych Ascaridoidea w oparciu o analizę rDNA.

Promotor: prof. dr hab. Antoni Jerzy Rokicki.

Jednostka: Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2003-2004 Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej, Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk (biolog)
- 2004-2011 Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej, Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk (adiunkt)
- 2012-2018 Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej, Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk (biolog)

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.)

- a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Struktura genetyczna populacji dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua* L.) w Morzu Bałtyckim jako efekt adaptacji do niskiego zasolenia

- b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

(przy publikacjach podano punkty MNiSW wg Komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 26-01-2017 r. oraz IF z roku wydania; dla publikacji z 2018 roku IF podano z 2017 r.; kolejność wg roku wydania)

- 1 Kijewska A., Burzyński A., Wenne R.** 2009. Variation in the copy number of tandem repeats of mitochondrial DNA in the North-East Atlantic cod populations. *Marine Biology Research* 5, 186-192.

25 pkt. MNiSW, IF: 1.000; IF₂₀₁₇: 0.901, liczba cytowań wg WoS: 3

- 2 Kijewska A., Więcaszek B., Kijewski T.** 2011. Analysis of population and taxonomical structure of Atlantic cod, *Gadus morhua* (Actinopterygii: Gadiformes: Gadidae) from the Baltic Sea with use of microsatellite DNA. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 41, 307-314.

20 pkt. MNiSW, IF: 0.547; IF₂₀₁₇: 0.708, liczba cytowań wg WoS: 4

- 3 Kijewska A., Kalamarz-Kubiak H., Arciszewski B., Guellard T., Wenne R.** 2016. Adaptation to salinity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from different regions of the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 478, 62-67.

30 pkt. MNiSW, IF: 1.937; IF₂₀₁₇: 1.990, liczba cytowań wg WoS: 3

- 4 Kijewska A., Małachowicz M., Wenne R.** 2018. Alternatively spliced variants in Atlantic cod (*Gadus morhua*) support response to variable salinity environment. *Scientific Reports* 8, #11607(2018)

40 pkt. MNiSW, IF: 4.122, liczba cytowań wg WoS: 3

Razem liczba punktów MNiSW = 115 pkt.

Szacunkowy sumaryczny IF = 7.606; IF₂₀₁₇ = 7.721

Oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu prac stanowiących szczególne osiągnięcie naukowe znajdują się w Załączniku nr 7

- c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

WPROWADZENIE

Dorsz Atlantycki (*Gadus morhua* L.) jest gatunkiem szeroko rozpowszechnionym w północnym Oceanie Atlantyckim i w znacznej części Arktyki. Jego występowanie sięga od wybrzeży Wirginii w Ameryce Północnej, przez Grenlandię, Svalbard i Islandię, aż do Zatoki Biskajskiej w Europie Północnej. Jako gatunek arktyczno-borealny, preferuje chłodne i słone wody oceaniczne, ale zasiedla również wody o niższym zasoleniu, np. fiordy norweskie (Berg i in. 2015). Dorsz zasiedla też część Morza Bałtyckiego, gdzie pełni rolę głównego drapieżnika (Köster i Möllmann, 2000) i stanowi jeden z najważniejszych obiektów połowów (Eero i in. 2012).

Morze Bałtyckie to geologicznie młody akwen, którego brakiczne wody są okresowo zasilane wlewami wody z Morza Północnego o wyższym zasoleniu (Tomkiewicz i in. 1998). W głębszych partiach Bałtyku (60-90 m), powierzchniowe warstwy wody cieplejszej i mniej słonej są oddzielone od chłodnej i bardziej słonej warstwy głębokiej przez haloklinę. Maksymalne zasolenie wynosi około 23‰ w Morzu Bełtów i obniża się stopniowo w kierunku wschodnim i północno-wschodnim do 2‰ w Zatoce Fińskiej i Botnickiej. Równocześnie w Morzu Bałtyckim istnieje stratyfikacja, gdzie obserwuje się wzrastający do 18-20‰ gradient zasolenia. Dorsz zasiedla rejony, w których zasolenie utrzymuje się powyżej 5-6‰.

Według Nisslinga i Westina (1997), dorsze bałtyckie przystosowały się do niskiego zasolenia wykorzystując plastyczność swojego fenotypu wykształconą wskutek selekcji genetycznej na przestrzeni wielu pokoleń. W Bałtyku tarło dorszy jest uzależnione w dużej mierze od czynników abiotycznych (zasolenie, zawartość tlenu, temperatura). W warunkach niskiego zasolenia dorsz z Morza Bałtyckiego wykształcił szereg adaptacji, które umożliwiają mu przystępowanie do tarła. Pelagiczne ziarna ikry mają większą średnicę (1.76mm) niż ziarna ikry dorsza z Oceanu Atlantyckiego (1.5mm) (Więcaszek 2010). Dzięki temu charakteryzują się neutralną pływalnością już przy zasoleniu 11-12‰. Spermata dorszy z Morza Bałtyckiego charakteryzuje się większą ruchliwością (Nissling i Westin, 1997, Støttrup i in. 2008). Odpowiednie do rozrodu warunki zasolenia występują w głębokich partiach Morza Bałtyckiego, poniżej poziomu halokliny, i stanowią w Morzu Bałtyckim naturalne miejsca tarła dorsza (Nissling i Westin, 1997). Podczas migracji sezonowych na tarło i dobowych, w poszukiwaniu

pokarmu, dorsz narażony jest na stopniowe bądź gwałtowne zmiany zasolenia (Neuenfeldt i in. 2007, 2009).

Odrębność genetyczna, cechy morfometryczne, preferencje środowiskowe oraz adaptacje gamet do niższego zasolenia sugerują, że dorsz ze wschodniego stada w Morzu Bałtyckim może reprezentować odrębny podgatunek *Gadus morhua callarias* L., podczas gdy zachodnie stado reprezentuje lokalną subpopulację dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua morhua* L.) zwaną „Belt Sea cod” (Więcaszek 2010). Subpopulacja zachodnia zasiedla rejon od Morza Bałtów po Bornholm (obszary ICES 22-24), a subpopulacja wschodnia część Bałtyku od Bornholmu do Zatoki Ryskiej (obszary ICES 25-32) (Aro 1989). W podobszarze ICES 24 obserwuje się natomiast mieszanie dorszy ze stad zachodniego i wschodniego podczas gdy strefa hybrydyzacji pomiędzy populacjami z Morza Bałtyckiego i dorsza z zachodniego Oceanu Atlantyckiego obejmuje cieśninę Sund i przyległe akweny (Nielsen i in. 2003, Więcaszek 2010, Antoszek i in. 2011, 2).

Utrzymywanie się blisko położonych, genetycznie rozdzielnych subpopulacji w Morzu Bałtyckim jest możliwe między innymi dzięki promocji izolacji reprodukcyjnej, to jest dzięki różnym terminom przystępowania do tarła i różnym lokalizacjom geograficznym tarlisk (Wieland i in. 2000). Sytuacja ta w ostatnich dekadach uległa zmianie ze względu na redukcję liczby tarlisk położonych na wschód od Bornholmu wskutek braku wlewów słonej wody morskiej z Morza Północnego do Morza Bałtyckiego (Cardinale and Svedäng, 2011) w okresie do 2014. Ze względu na zmiany klimatyczne takie jak zmiana temperatury wody i poziomu zasolenia, które dotyczą środowisko Morza Bałtyckiego, problem ten staje się coraz poważniejszy. W dalszej perspektywie zarówno przelówienie jak i ograniczenie wlewów i w efekcie wysładzanie wód Morza Bałtyckiego mogą negatywnie wpłynąć na biomasę stad dorszy z Morza Bałtyckiego (Thøgersen i in. 2015).

Wcześniejsze badania genetyczne struktury populacji dorsza atlantyckiego dotyczyły głównie populacji wschodnio- i zachodnioatlantyckiej, traktując Morze Bałtyckie jako siedlisko jednej ze skrajnych subpopulacji tego gatunku. Różnice pomiędzy populacjami z Morza Barentsa, Morza Północnego oraz Morza Bałtyckiego zostały udokumentowane m. in. za pomocą analizy DNA mikrosatelitarnego (Nielsen i in. 2001, 2). W mniejszej skali prowadzono też badania uwzględniające strukturę subpopulacji z Morza Bałtyckiego (Nielsen i in. 2003, **Kijewska** i in. 2011, Poćwierz-Kotus, **Kijewska** i in., **2015**) ze strefą przejściową, w której miesza się stada dorsza z Morza Północnego oraz Morza Bałtyckiego.

OMÓWIENIE NAJWAŻNIEJSZYCH WYNIKÓW BADAŃ

Przedmiotem moich badań była genetyczna struktura populacji dorsza z Morza Bałtyckiego, zarówno w odniesieniu do populacji z innych akwenów, jak i w obrębie Morza Bałtyckiego. Kolejnym celem było znalezienie odpowiedzi na pytanie, jak zmiany adaptacyjne we wschodniej subpopulacji dorsza z Morza Bałtyckiego wpływają na strukturę populacji. Utrwalone na poziomie genetycznym kompleksowe zmiany adaptacyjne mogą kształtować strukturę populacji dorsza wpływając na zróżnicowanie genetyczne. Możemy mieć również do czynienia z gatunkiem, który swoje zdolności adaptacyjne zawdzięcza plastyczności fenotypowej mieszczącej się w zakresie gatunkowej tolerancji na zmienne warunki środowiska. W takim przypadku zróżnicowanie genetyczne może być efektem utrwalenia przez izolację rozrodczą dystrybucji fenotypów sprzyjających zasiedleniu wód o niższym zasoleniu. W związku z tym jednym z celów moich badań było zbadanie, w jaki sposób poziom zasolenia indukuje unikalne zmiany adaptacyjne zarówno na poziomie DNA, RNA jak i fizjologicznym.

Pierwszym etapem w moich badaniach było określenie stopnia zróżnicowania genetycznego w populacji dorsza z Morza Bałtyckiego. Mitochondrialne DNA jest dziedziczone uniparentalnie, po linii żeńskiej. Co za tym idzie, efektywna wielkość populacji mierzona przez zmienność mtDNA jest niższa niż w przypadku DNA jądrowego i w efekcie bardziej wrażliwa na ewentualne zmiany wywołane np. przez dryf genetyczny. Jedną z cech genomu mitochondrialnego jest występowanie u niektórych gatunków heteroplazmii (obecności różnych wariantów mtDNA u jednego osobnika) spowodowanej różną liczbą wariantów długości mtDNA. U dorsza, w obrębie niekodującego rejonu kontrolnego mtDNA, znajdują się powtórzenia tandemowe o długości 40 par zasad (VNTR – variable numbers of tandem repeats). U pojedynczego osobnika można zaobserwować nawet 5 wariantów długości mtDNA. Celem moich badań (1) było sprawdzenie, czy powtórzenia tandemowe zlokalizowane w rejonie niekodującym mtDNA mogą być przydatne do badań populacyjnych dorsza oraz czy ich wzorzec jest stabilny w tkankach somatycznych i rozrodczych. Przeanalizowałam wzory heteroplazmii mtDNA u osobników z trzech obszarów geograficznych obejmujących wschodni Atlantyk: Morza Barentsa, Morza Północnego i wschodniego Morza Bałtyckiego oraz dane literaturowe dla dorsza atlantyckiego z rejonu Islandii (Árnason i Rand 1992). Zbadałam także powtarzalność osobniczego wzoru heteroplazmii mtDNA w tkankach pochodzących z różnych listków zarodkowych oraz gamet. Obliczenia wskazały na nielosowy charakter dystrybucji wariantów długości mtDNA, co jest istotne w przypadku analizy struktury populacyjnej. **W efekcie wykazałam, że zmienna liczba powtórzeń tandemowych mtDNA (VNTR) pozwala na określenie zmienności wewnątrzgatunkowej, szczególnie wtedy kiedy zmienność sekwencji nie jest wystarczająca by umożliwić analizę kladystyczną.** Liczba powtórzeń i wzór heteroplazmii mtDNA nie były też skorelowane ze zmiennością sekwencji

mtDNA (cytochrom b, GenBank; EF211100 i EF211090). Poziomy zróżnicowania heteroplazmii mtDNA mogą charakteryzować populacje jako zupełnie rozdzielne jednostki, bez zachowania ciągłości nawet między sąsiadującymi populacjami. Istotną obserwacją był brak generacji lub utraty powtórzeń tandemowych zarówno w procesie gametogenezy jak i w rozwoju zygot. **Niezmienność powtórzeń tandemowych w procesie rozwoju osobniczego i przekazywanie ich do gamet w niezmienionym układzie pozwala na użycie analizy heteroplazmii mtDNA do szacowania różnorodności genetycznej osobników przystępujących do tarła.**

Prace nad opisem zróżnicowania populacji dorsza bałtyckiego kontynuowałam opierając się również na analizie populacji za pomocą DNA mikrosatelitarnego (2). Do badań użyłam prób pochodzących od osobników z Zatoki Puckiej, Zatoki Gdańskiej, Zatoki Pomorskiej, Cieśniny Sund, Morza Północnego oraz Morza Barentsa. W efekcie przeprowadzonej analizy wykazałam, że całkowite zróżnicowanie pomiędzy populacjami jest niskie ($F_{ST} = 0,044$, $p < 0,001$), ale różnice pomiędzy parami subpopulacji osiągają średnie wartości zróżnicowania ($F_{ST} = 0,2467 - 0,0707$). Wszystkie próby pozostawały w równowadze Hardy'ego-Weinberga, z tendencją do niedoboru heterozygot. Wyniki skalowania wielowymiarowego (MDS) wskazały na rozdzielność populacji dorsza z Zatoki Pomorskiej oraz z Cieśniny Sund, oraz pomiędzy subpopulacjami z zachodniego i wschodniego Morza Bałtyckiego. Uzyskane wyniki dotyczące dorsza z Cieśniny Sund wskazały, że jest to hybrydowe stado powstałe na skutek mieszania się osobników z Morza Bałtyckiego oraz z Morza Północnego, co wyłączało to stado z dalszych badań dotyczących lokalnych populacji bałtyckich.

Analiza pozostałych prób wskazała, że subpopulację z zachodniego Morza Bałtyckiego (*Gadus morhua morhua* L.) reprezentują osobniki z Zatoki Pomorskiej. **Obserwowana genetyczna izolacja subpopulacji ze wschodniego i zachodniego Morza Bałtyckiego wsparła założenie, że reprezentują one różne podgatunki/rasy dorsza bałtyckiego. Przewaga homozygot w subpopulacjach z Morza Bałtyckiego świadczy o wysokim poziomie izolacji subpopulacji dorsza i obecności czynników izolujących badane subpopulacje. Wysoki współczynnik inbredu wskazywał też na zubożenie puli genetycznej populacji dorsza, co może być efektem przełowienia stad dorsza.**

Kontynuując pracę dotyczącą różnicowania stada wschodniego dorsza z Morza Bałtyckiego wyszłam z założenia, że utrzymanie homeostazy w zmieniających się warunkach zasolenia może wymagać modyfikacji mechanizmu wychwytu jonów, w tym sodu i chlorków. Ekspozycja ryb na fluktuacje zasolenia, podobnie jak w Morzu Bałtyckim, może wpływać na ekspresję genów zaangażowanych w transport jonów sodu i potasu oraz w reakcję na stres fizjologiczny. W pracy poświęconej analizie mechanizmu adaptacji do zmiennego zasolenia (3) wykorzystałam osobniki

pochodzące ze wschodniej i zachodniej subpopulacji dorsza, które zostały pozyskane z Zatoki Kilońskiej (zasolenie 18‰) i z Zatoki Gdańskiej (zasolenie 8‰) w 2012 roku. Obydwie grupy zostały zidentyfikowane jako odrębne genetycznie populacje (Poćwierz-Kotus, **Kijewska** i in. **2015**). Za pomocą analizy ekspresji genów *hsp70* i *atp1a* określiłam profile reakcji dorsza na zmiany zasolenia. Białko szoku termicznego (*hsp70*) jest związane z ochroną komórek przed uszkodzeniem na skutek stresu osmotycznego. Podjednostka alfa Na⁺, K⁺-ATPazy (*atp1a1*) jest zaangażowana w procesy osmoregulacji i wymiany jonowej (Deane i Woo, 2004). Dodatkowym wyznacznikiem poziomu stresu u ryb był poziom kortyzolu w osoczu, jako że hormon ten wydaje się być kluczowym mediatorem reakcji związanych ze stresem regulując osmolalność, metabolizm i odpowiedź immunologiczną u ryb (Mommsen i wsp., 1999). Kortyzol wpływa także na ekspresję genu *hsp70* (Celi i wsp., 2012) oraz ekspresję genu *atp1* (Dang i in., 2000). Grupy eksperymentalne były eksponowane na wzrastające i malejące zasolenie. Profil reakcji każdej z grup, został określony czterema parametrami: poziomem ekspresji dwóch genów, poziomem kortyzolu oraz osmolalnością osocza. Pomiedzy dorszem ze wschodniej i zachodniej subpopulacji różnicę stanowiły przede wszystkim poziom kortyzolu w osoczu i ekspresja Na⁺,K⁺-ATPazy. Różnice te utrzymywały się niezależnie od kierunku zmiany zasolenia. W grupach eksperymentalnych z Zatoki Kilońskiej reakcja na zmiany zasolenia wiązała się ze stałym wzrostem poziomu kortyzolu w osoczu i niezmiennym poziomem ekspresji *atp1a*. Tymczasem w grupach eksperymentalnych dorsza z Zatoki Gdańskiej, po zakończeniu zmiany zasolenia obserwowałam wzrost poziomu ekspresji *atp1a* i zmienny poziom kortyzolu w osoczu. Z kolei osmolalność osocza w grupach eksperymentalnych osobników ze wschodniego Morza Bałtyckiego była stabilna niezależnie od stężenia soli w wodzie, podczas gdy w grupie z Zatoki Kilońskiej obserwowałam statystycznie istotne różnice. Może to świadczyć o zaburzeniach homeostazy na skutek ekspozycji na fluktuacje zasolenia. **Powyższe obserwacje wskazują na różne ścieżki adaptacji do zmian zasolenia u osobników z subpopulacji wschodniej i zachodniej. Zaobserwowany u dorsza ze stada wschodniego profil ekspresji genów, poziomu kortyzolu w osoczu oraz poziomu osmolalności osocza jest prawdopodobnie adaptacją chroniącą ryby przed stresem osmotycznym. Stres osmotyczny jest powodowany przez migracje pionowe i długotrwałą migrację dorsza do obszarów tarła. Różne profile reakcji na zmienione zasolenie, obserwowane w obydwu grupach, sugerują też, że granica międzywodą słoną a morską jest barierą, która rozdziela subpopulacje dorsza na poziomie genetycznym i fizjologicznym.**

Istnienie genetycznych zmian adaptacyjnych we jednej z badanych grup dorsza jest bardzo istotne w kontekście dynamiki jego populacji w Morzu Bałtyckim. Degradacja stada wschodniego, czy to wskutek przełowienia, czy też potencjalnych epidemii lub choćby zmian

środowiska, prawdopodobnie będzie oznaczała nieodwracalne ograniczenie wschodniego zasięgu dorsza w Morzu Bałtyckim. Brak zdolności adaptacyjnych typowych dla dorsza ze wschodniej subpopulacji spowoduje, że dorsz z zachodniego Morza Bałtyckiego będzie miał trudności nie tylko z bytowaniem w warunkach panujących we wschodniej części akwenu ale także z dostępnością miejsc gdzie będzie mógł odbywać tarło.

Zróżnicowanie profili adaptacji do zmiennego zasolenia obserwowanych u dorsza dowodzi odrębności stad ze wschodniego i zachodniego Morza Bałtyckiego. Różnice te nie dają jednak odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu środowisko wpływa na rodzaj przystosowań i jak bardzo zmienne są te adaptacje. Odpowiedź na to pytanie dało porównanie sekwencji transkryptomu, uzyskanego od osobników z Morza Bałtyckiego, które zostały poddane opisanemu powyżej eksperymentowi. Aby uzyskać sekwencje transkryptomu, pobrałam RNA ze skrzelii badanych ryb. Transkrypty osobników z Morza Bałtyckiego zostały porównane do sekwencji osobników ze wschodniego Oceanu Atlantyckiego (ENSEMBL wersja 87 ensembl.org/Gadus_morhua). Analiza transkryptów (Małachowicz, **Kijewska**, Wenne 2015) wskazała, że około 1,44% sekwencji było charakterystyczne wyłącznie dla osobników z Morza Bałtyckiego.

Poza zróżnicowaniem sekwencji, przeprowadzona analiza transkryptomu dorsza z Morza Bałtyckiego wykazała również różnice na poziomie struktury genów. Polegały one na alternatywnym łączeniu egzonów czyli alternatywnym splicingu. Alternatywny splicing (AS) może wprowadzać zmiany determinujące zmiany fizjologiczne lub, poprzez wpływ na zmienność mRNA, może pozwalać na wykorzystywanie rozmaitych wariantów AS przez inne niż oryginalny, mechanizmy regulacyjne (Kalsotra i Cooper 2011). Alternatywne aranżacje transkryptów są jednym z najważniejszych komórkowych mechanizmów Eukaryota, generującym wiele transkryptów z jednego genu, wytwarzającym mRNA swoiste dla danej tkanki, modulującym ekspresję i funkcję genów (Ruangsri i in. 2012). W publikacji (4) przedstawiłam wyniki dotyczące zróżnicowania subpopulacji z Morza Bałtyckiego pomiędzy sobą i w porównaniu z genomem osobników ze wschodniego Oceanu Atlantyckiego. U osobników z Morza Bałtyckiego zidentyfikowanych zostało 509 transkryptów, z czego 89% stanowiły nowe, nie opisane wcześniej aranżacje. Liczba transkryptów wahała się w zależności od geograficznego pochodzenia dorsza lub/i grupy eksperymentalnej. Grupy eksponowane na dowolną zmianę zasolenia współdzieliły 16 wariantów AS. W grupie „obniżonego zasolenia” zidentyfikowano 3 oryginalne warianty AS, a w grupie eksponowanej na podwyższone zasolenie 1 oryginalny wariant AS. Niektóre warianty AS występowały wyłącznie u osobników pochodzących z określonej, wschodniej lub zachodniej, lokalizacji geograficznej. W grupach eksponowanych na zmiany zasolenia, 7 wariantów AS znalazło się wyłącznie u osobników z zachodniego Morza

Bałtyckiego, podczas gdy u osobników ze wschodniego Morza Bałtyckiego – 4 oryginalne alternatywne aranżacje. Wszystkie warianty AS występujące zależnie od lokalizacji geograficznej reprezentowały klasę ontologiczną genów „funkcje molekularne” (GO – gene ontology; klasyfikacja właściwości genów w kontekście komórkowym). Warianty AS ze wschodniego Morza Bałtyckiego zaklasyfikowane zostały do podklas związanych z gospodarką jonową. We wschodnim Morzu Bałtyckim prawdopodobnie ma związek z niższą zawartością jonów w wodzie. Z kolei warianty AS z zachodniego Morza Bałtyckiego należały do podklas związanych z procesami redukującymi uszkodzenia lipidów w błonach i uszkodzenia DNA. Taka aktywność może być związana ze stresem osmotycznym, któremu sprzyjają nieregularne i gwałtowne wlewy wody oceanicznej do zachodniego Morza Bałtyckiego.

Ponadto na podstawie analizy funkcjonalnej transkryptów stwierdziłam, że niektóre warianty AS są zaangażowane w ścieżki metaboliczne mające bezpośredni związek z sygnalizacją wewnątrz- i międzykomórkową, procesami zapalnymi, oraz procesami apoptozy, nekrozy i przeżycia komórek. Opisane ścieżki i profil wariantów AS sugerują ich wpływ na szybką komunikację pomiędzy komórkami oraz mechanizmy przeżycia komórek. Dodatkowo, niektóre wykryte alternatywne aranżacje transkryptów prawdopodobnie mają cechy umożliwiające im modulację sygnałów poprzez ich włączanie i wyłączenie. W tym kontekście na uwagę zasługują warianty AS powiązane ze szlakiem sygnałowym JaK/STAT i mTOR (ścieżka sygnalizacyjna **Janusowych Kinaz** i białek **STAT [Signal Transducer and Activator of Transcription proteins]** oraz ssaczego celu rapamycyny – **mammalian Target Of Rapamycin kinase**), stanowiącymi ważny mechanizm sygnalizacyjny i aktywator transkrypcji. Obecność związanych z tymi ścieżkami metabolicznymi wariantów AS z niekompletnymi i kompletnymi domenami sugeruje, że warianty AS biorą udział w regulacji procesów katabolicznych i anabolicznych, decydujących o przeżyciu lub śmierci komórki. Część wariantów AS związanych ze ścieżką sygnałową JaK/STAT była zaangażowana również w ścieżkę sygnałową receptorów limfocytów B. Stres wpływa bezpośrednio na układ odpornościowy ryb powodując immunosupresję i zwiększając podatność ryb na choroby. Warianty AS specyficzne dla dorsza w Morzu Bałtyckim mają potencjał modyfikacji sygnalizacji receptorów limfocytów B i w ten sposób prawdopodobnie mogą znosić negatywne skutki obniżonego zasolenia (reakcje prozapalne i osłabiona ochrona przed patogenami).

Alternatywne aranżacje transkryptów zwiększają złożoność i plastyczność transkryptomu pod presją warunków środowiska. Chociaż Berg i in. (2015) sugerowali, że adaptacja do niskiego zasolenia sprzyja dywergencji genomowej, dorsz z Morza Bałtyckiego jest genetycznie bardzo mało zróżnicowany (Poćwierz-Kotus, **Kijewska** i in. 2015). **W przypadku dorsza z**

Morza Bałtyckiego, warianty AS wspierają złożoność genomu w procesie adaptacji do lokalnego środowiska. „Allopatryczne” pochodzenie alternatywnych aranżacji transkryptów można z kolei wyjaśnić selekcyjnym wpływem środowiska lub ich równoległą ewolucją. Założenie wpływu selekcji na utrwalenie adaptacji do lokalnych warunków środowiska jest bardziej prawdopodobne ze względu na zgodność z wcześniejszymi danymi Berga i in. (2015) na temat wpływu selekcji kierunkowej na genom dorsza.

Uzyskane przeze mnie wyniki jednoznacznie wskazują na genetyczną rozdzielność dwóch subpopulacji dorsza z Morza Bałtyckiego. Poziom zróżnicowania genetycznego pomiędzy dorszem ze wschodniego i zachodniego Morza Bałtyckiego jest argumentem za oficjalnym uznaniem populacji dorsza ze wschodniego Morza Bałtyckiego za podgatunek *Gadus morhua callarias* i przyjęciem oficjalnej nazwy „dorsz bałtycki”. Jednocześnie należałoby uznać wschodnią część Morza Bałtyckiego za rejon endemicznego występowania tego podgatunku. Za argumentem tym przemawia udokumentowany szereg unikalnych adaptacji do środowiska, który odróżnia dorsza bałtyckiego od dorsza atlantyckiego. Adaptacje obserwowane u dorsza ze wschodniego Morza Bałtyckiego wynikają z selekcyjnego wpływu środowiska. Tego typu oddziaływanie wskazuje, że cechy te zostały nabyte w procesie przystosowania i nie zostały ujawnione w ramach polimorfizmu cech charakterystycznych dla tego gatunku. Skutkiem presji selekcyjnej był prawdopodobnie efekt wąskiego gardła („bottleneck effect”), który może tłumaczyć dlaczego populacja wschodnia dorsza charakteryzuje się tak wysoką homogenicznością na poziomie genetycznym. Choć niskie zróżnicowanie genetyczne wschodniobałtyckiego dorsza jest brane pod uwagę w zarządzaniu zasobami dorsza w Morzu Bałtyckim, powinna być wzięta pod uwagę dodatkowa kwestia ewentualnego mieszania się stad wschodniego i zachodniego w rejonie ICES 24. Określenie obecności przedstawicieli obu stad w tym rejonie może być istotne dla wprowadzenia, stosownie do okresu rozrodu, odpowiednich okresów ochronnych i wysokości połowów w tym obszarze.

W przyszłości zamierzam odpowiedzieć na pytania dotyczące roli wariantów AS w adaptacji za pomocą obserwacji ekspresji poszczególnych alternatywnych aranżacji transkryptów. Jest to konieczne zarówno po to, by określić ich funkcjonalność i zależność od występujących zmian środowiska jak i po to, by móc prześledzić aktywność poszczególnych ścieżek metabolizmu. Zamierzam również kontynuować badania nad różnorodnością genetyczną populacji dorsza bałtyckiego w celu opracowania metody pozwalającej na precyzyjną ocenę kondycji tej populacji.

Cytowana literatura (z wyjątkiem publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe)

- Antoszek A., Antoszek J., Więcaszek B., Ogiński T., Suszycki S. (2011) Differences between the Baltic cod *Gadus morhua callarias* L. and Atlantic cod *Gadus morhua morhua* L., by skeletal muscle protein polymorphism, analyzed with classical SDS-PAGE electrophoresis. *EJPAU* 14 (3) (#02).
- Árnason E. i Rand D.M. (1992) Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Genetics* 132, 211-20.
- Aro E. (2000) The spatial and temporal distribution patterns of cod (*Gadus morhua callarias* L.) in the Baltic Sea and their dependence on environmental variability—implications for fishery management. Academic dissertation. University of Helsinki, Finland.
- Berg P.R., Jentoft S., Star B., Ring K.H., Knutsen K., Lien S., Jakobsen K.S., André C. (2015) Adaptation to low salinity promotes genomic divergence in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Genome Biol. Evol.* 20, 1644–1663.
- Cardinale M. i Svedäng H. (2011). The beauty of simplicity in science: Baltic cod stock improves rapidly in a ‘cod hostile’ ecosystem state. *Mar. Eco. Prog. Ser.* 425, 297-301.
- Celi M., Vazzana M., Sanfratello M.A., Parrinello N. (2012) Elevated cortisol modulates Hsp70 and Hsp90 gene expression and protein in sea bass head kidney and isolated leukocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 175, 424–431.
- Dang Z., Balm P.H., Flik G., Wendelaar Bonga S.E., Lock R.A. (2000) Cortisol increases Na(+)/K(+)-ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Biol.* 203, 2349–2355.
- Eero M., Vinther M., Haslob H., Huwer B., Casini M., Storr-Paulsen M., Köster F. W. (2012). Spatial management of marine resources can enhance the recovery of predators and avoid local depletion of forage fish. *Conserv. Lett.* 5, 486–492.
- Kalsotra A., Cooper T.A. (2011) Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat. Rev. Genet.* 12, 715–729.
- Köster F.W., Möllmann C. (2000) Trophodynamic control by clupeid predators on recruitment success in Baltic cod? *ICES J. Mar. Sci.* 57, 310–323.
- Małachowicz M., **Kijewska A.**, Wenne R. (2015) Transcriptome analysis of gill tissue of Atlantic cod *Gadus morhua* L. from the Baltic Sea. *Mar. Genomics* 23, 37–40.
- Mommsen T.P., Vijayan M.M., Moon T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268.
- Neuenfeldt S., Andersen K.H., Hinrichsen H.-H. (2009) Some Atlantic cod *Gadus morhua* in the Baltic Sea visit hypoxic water briefly but often. *J. Fish Biol.* 75, 1095–8649.
- Neuenfeldt S., Hinrichsen H.-H., Nielsen A., Andersen K.H. (2007) Reconstructing migrations of individual cod (*Gadus morhua* L.) in the Baltic Sea by using electronic data storage tags. *Fish. Oceanogr.* 16, 1365–2419.

- Nielsen E.E., Hansen M.M., Ruzzante D.E., Meldrup D., Grønkjær P., (2003) Evidence of a hybrid-zone in Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the Baltic and the Danish Belt Sea revealed by individual admixture analysis. *Mol. Ecol.* 12, 1497–1508.
- Nielsen E.E., Hansen M.M., Schmidt C., Meldrup D., Grønkjær P. (2001) Population of origin of Atlantic cod. *Nature* 413:272.
- Nissling A. i Westin L. (1997) Salinity requirements for successful spawning of Baltic and Belt Sea cod and the potential for cod stock interaction in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 152, 261–27.
- Poćwierz-Kotus A., **Kijewska A.**, Petereit C., Bernaś R., Więcaszek B., Arnyasi M., Lien S., Kent M.P., Wenne R. (2015) Genetic differentiation of brackish water populations of cod *Gadus morhua* in the southern Baltic, inferred from genotyping using SNP-arrays. *Mar. Genomics* 19, 17–22.
- Ruang Sri J., Salger S. A., Caipang C. M. A., Kiron V. & Fernandes J. M. O. (2012) Differential expression and biological activity of two piscidin paralogues and a novel splice variant in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 32, 396–406.
- Støttrup J.G., Overton J.L., Paulsen H., Möllmann C., Tomkiewicz J., Pedersen P.B., Lauesen P. (2008) Rationale for restocking the eastern Baltic. *Rev. Fish. Sci.* 16, 58-64.
- Thøgersen T., Hoff A., Frost H.S. (2015). Fisheries management responses to climate change in the Baltic Sea. *Climate Risk Management* 10, 51-62.
- Tomkiewicz J., Lehmann K.M., Stæhr K. J. & St John M. (1998) Oceanographic influences on the distribution of Baltic cod, *Gadus morhua*, during spawning in the Bornholm Basin of the Baltic Sea. *Fisheries Oceanography* 7, 48–62.
- Wieland K., Jarre-Teichmann A., Horbowa K. (2000) Changes in the timing of spawning of Baltic cod: possible causes and implications for recruitment. *ICES J. Mar. Sci.* 57, 452-464.
- Więcaszek B. 2010. Analiza status taksonomicznego dorsza *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 z Morza Bałtyckiego, na podstawie cech morfologicznych, biologicznych i genetycznych populacji z różnych rejonów rozszedlenia. Rozprawa habilitacyjna, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie.

5. OMÓWIENIE INNYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH (ARTYSTYCZNYCH)

W moim dorobku można wyróżnić dwa wątki badawcze. Pierwszy, związany jest z bezpośrednio z pracami prezentowanymi jako moje osiągnięcie naukowe i dotyczy badań nad dorszem oraz nad płastugami. Badając płastugi z Morza Bałtyckiego użyłam metod wstępnie opracowanych w czasie badań nad dorszem w pracy poświęconej użyciu VNTR (4). Drugi wątek jest związany z pasożytami, dla których ryby są żywicielami paratencicznymi, pośrednimi lub ostatecznymi. Wątek ten stanowi kontynuację moich badań podjętych w ramach pracy doktorskiej. Najważniejsze osiągnięcia badawcze obu wątków omówione są poniżej.

5.1 Dorsz i ryby płastugowate

W ramach badań nad *G. morhua*, dzięki współpracy z Zachodniopomorskim Uniwersytetem Technologicznym, zbadalam osobnika dorsza złowionego w północnym Oceanie Atlantyckim. Okaz ten cechował się unikalnym złotym wybarwieniem, które nie jest spotykane we wschodnim lub północnym Oceanie Atlantyckim. Rozległa i zróżnicowana populacja dorsza atlantyckiego obejmuje wiele ras geograficznych i ekologicznych, które różnią się ubarwieniem. Zróżnicowaną kolorystykę wiąże się najczęściej z preferencjami dietetycznymi dorszy obserwowanych w zachodnim Atlantyku (Gosse i Wroblewski 2004). W północnym i wschodnim Oceanie Atlantyckim odnotowywano tylko pojedyncze przypadki osobników charakteryzujących się unikalną kolorystyką (**Kijewska i in. 2012**, Rybczyk i in. 2014). Analiza zawartości żołądka „złotego dorsza” pozwoliła na wyeliminowanie hipotezy o wpływie diety tego osobnika na jego ubarwienie. **Wyniki przeprowadzonych analiz, w tym DNA mitochondrialnego i jądrowego oraz poziomu melatoniny i preparatów histologicznych sugerowały, że przyczyną unikalnego wybarwienia mogą być zaburzenia pigmentacji i rozwoju chromatoforów.** Ta konkluzja otwiera nowe możliwości badawcze w celu określenia czynników genetycznych wpływających na zróżnicowane ubarwienie dorszy. Jest to szczególnie interesujące w kontekście zachodnich populacji *G. morhua* i możliwości potwierdzenia lub wykluczenia domniemanego powiązania zmian kolorystycznych z preferencjami dietetycznymi.

Postęp w dziedzinie badań molekularnych umożliwił ustalenie struktury populacji dorsza w Morzu Bałtyckim za pomocą podstawień pojedynczych nukleotydów oraz analizę całego genomu w celu wykrycia zróżnicowania między subpopulacjami. Praca Poćwierz-Kotus, **Kijewska i in. (2015)** dotyczyła zróżnicowania subpopulacji wschodniej i zachodniej dorsza w Morzu Bałtyckim. W efekcie **po raz pierwszy wykazaliśmy różnice genetyczne między wschodnim i zachodnim stadem dorsza przy użyciu 7994 SNP. Ponadto użycie matrycy SNP o tak dużej liczebności pozwoliło na wiarygodną identyfikację osobników dorsza w zależności od pochodzenia ze wschodniej lub zachodniej subpopulacji bałtyckiej.** Pozyskane informacje wskazały również, że w badaniach nad przystosowaniem dorsza do różnic w zasoleniu jedną z badanych subpopulacji powinny reprezentować osobniki z Zatoki Kilońskiej, które reprezentują zachodnią subpopulację dorsza w Morzu Bałtyckim.

Z kolei pierwsza analiza transkryptomu dorsza z Morza Bałtyckiego (Małachowicz, **Kijewska, Wenne 2015**), w której badano osobniki pochodzące z eksperymentu opisanego w części dotyczącej moich osiągnięć (2), wskazała na różnice pomiędzy dorszem z Morza Bałtyckiego i dorszem ze wschodniego Oceanu Atlantyckiego sięgające 1.44%. Transkrypty zaklasyfikowane do odpowiednich klas ontologicznych reprezentowały głównie podklasy

aktywności katalitycznej, wiązań cząsteczek oraz procesów komórkowych i procesów metabolicznych. **Zaobserwowana dywergencja sekwencji pomiędzy rybami z Morza Bałtyckiego i Oceanu Atlantyckiego wskazała na konieczność utworzenia referencyjnego genomu/transkryptomu dla dorsza z Morza Bałtyckiego.**

Innymi, badanymi przeze mnie gatunkami ryb z Morza Bałtyckiego były płastugi. Stornia (*Platichthys flesus* L.) i gładzica (*Pleuronectes platessa* L.) są komercyjnie poławianymi gatunkami ryb morskich. Oba gatunki tolerują niskie zasolenie i zajmują różne, ale częściowo zachodzące na siebie siedliska w Morzu Bałtyckim. Stornię i gładzicę identyfikuje się za pomocą cech morfologicznych, jednak ich identyfikacja jest utrudniona przez daleko posunięty polimorfizm cech morfologicznych oraz obecność hybryd gatunkowych *P. flesus* × *P. platessa*. Moje badania nad płastugami zasiedlającymi Morze Bałtyckie (**Kijewska i in. 2009**) dotyczyły identyfikacji gatunków płastug oraz hybryd międzygatunkowych, obserwowanych w Morzu Bałtyckim (Sick i in. 1963). Opracowane przeze mnie cztery markery: dwa mitochondrialne i dwa jądrowe (powtórzenia tandemowe w rejonie niekodującym mtDNA, cytochrom b - *cob*, międzygenowy rejon niekodujący rDNA - ITS oraz peptyd PTH-podobny – PTHrP) pozwalają na identyfikację gatunkową storni i gładzicy. Dzięki temu ustaliłam, że hybrydy międzygatunkowe występują w Morzu Bałtyckim w rejonie Bornholmu. **Użycie opracowanych markerów pozwala na wykrywanie hybryd tych dwóch gatunków. Dodatkowo, analiza otrzymanych wyników, w szczególności wzorów heteroplazmii mtDNA, wykazała, że populacja storni w Morzu Bałtyckim jest podzielona na dwie subpopulacje: zachodnią (obszary ICES 23-25) oraz wschodnią, zasiedlającą obszar ICES 26.**

5.2 Pasożyty

Osobnym wątkiem, który jest efektem kontynuacji moich badań z okresu studiów magisterskich i doktorskich jest wątek parazytologiczny. Moje badania dotyczyły analizy taksonomicznej patogennych dla człowieka nicieni z rodziny Ascaridae. Ponadto analizowałam zależności pomiędzy dystrybucją przestrzenną pasożytów w środowisku morskim, a składem gatunkowym parazytofauny obserwowanym w żywicielach pośrednich, paratenicznych i ostatecznych.

Badania nad dystrybucją pasożytów w populacji storni (*Platichthys flesus* L.) (Chibani, **Kijewska, Rokicki 2005**) w Morzu Bałtyckim wykazały, że **największe znaczenie dla składu fauny pasożytniczej storni miał wiek i płeć ryb. Wymiary storni warunkowały wybory dietetyczne ryb, sprzyjając akumulacji specyficznego składu pasożytów wykorzystujących różne gatunki bezkręgowców jako żywicieli pośrednich bądź paratenicznych.** Również

wybór miejsca żerowania związany z wiekiem storni wpływa na potencjalne zarażenie metacerkariami *Diplostomum* sp. czy kolcogłowami *Pomphorhynchus laevis* (Zoega i Müller 1776).

Ten nurt w moich badaniach reprezentują także prace nad dystrybucją nicieni z rodziny Anisakidae w halibucie grenlandzkim (*Reinhardtius hippoglossoides*, Walbaum 1792) (Karpiej, Dzido, Rokicki, **Kijewska 2013**). Analiza składu gatunkowego nicieni w zależności od klasy długości żywicieli paratenicznych wykazała, że **skład parazytofauny halibuta grenlandzkiego jest uzależniony od preferencji dietetycznych ryb**. Ponadto za pomocą klucza molekularnego do identyfikacji gatunków z nadrodziny Ascaridoidea (Kijewska i in. 2002) **wykazano po raz pierwszy, że w Morzu Barentsa występuje gatunek *Contracaecum osculatum* C**, który był dotychczas uważany za gatunek występujący w wodach Islandii i w Morzu Bałtyckim (Mattiucci i Nascetti, 2008).

Z kolei w pracy Najda, **Kijewska i in. (2018)** celem pracy było określenie dystrybucji pasożytniczych nicieni z nadrodziny Ascaridoidea w zależności od głębokości i lokalizacji w Morzu Barentsa. **W pracy tej opublikowałam uzupełnienie klucza molekularnego do oznaczania Ascaridoidea, obejmujące identyfikację gatunków siostrzanych z kompleksu *Contracaecum osculatum*. Wykazaliśmy także, że lokalizacja pasożytniczych nicieni w poszczególnych narządach wewnętrznych ryb jest nieprzypadkowa i zależy od gatunku pasożyta**. Ponadto zauważyliśmy, że zarządzanie odpadami na łodziach rybackich może być dodatkowym czynnikiem wpływającym na rozprzestrzenianie się pasożytów. Wnętrznosci z ryb są utylizowane przez wyrzucanie ich do morza. W wodzie są one znajduwane i zjadane przez ptaki, a także ryby i ssaki morskie, które śledzą trawlerzy, aby móc żywić się resztkami. Takie zjawisko może zwiększyć częstość występowania pasożytów w ekosystemie morskim.

Badania nad występowaniem pasożytniczych nicieni zostały również podjęte w rejonach arktycznym i antarktycznym. W artykule poświęconym tej tematyce (Dzido, **Kijewska**, Rokicka i in. **2009**) badaliśmy występowanie pasożytniczych nicieni w szeregu gatunków ryb, ptaków i ssaków oraz bezkręgowców. **W efekcie, jako pierwsi odnotowaliśmy obecność *Anisakis simplex* C w próbach pochodzących z ryb nototeniiowatych – *Nothotenia coriiceps* (Richardson, 1844) i *N. rossii* (Richardson, 1844), z których *N. rossii* jest gatunkiem cennym komercyjnie**.

Analiza dystrybucji pasożytniczych nicieni została również przeprowadzona w odniesieniu do ryb występujących na szelfie Afrykańskim (**Kijewska i in. 2009**). W artykule tym udowodniliśmy że pasożytnicza fauna ryb odzwierciedla nie tylko zasięg geograficzny występowania Anisakidae, ale także zachowania żywieniowe żywicieli pełniące rolę ogniw w cyklach życiowych pasożytów (Mattiucci i Nascetti, 2006). **Występowanie i liczebność**

Anisakidae odzwierciedla rozmieszczenie żywicieli, w tym żywicieli ostatecznych, i ich preferencje dietetyczne. Analiza wszystkich tych czynników służy zrozumieniu zależności między rozmieszczeniem gatunków ryb, ssaków morskich i występowaniem specyficznego składu fauny pasożytniczej.

Dodatkową tematyką, która również dotyczy nicieni z rodziny Anisakidae były analizy molekularne w celu zbadania zróżnicowania populacji oraz dywergencji wybranych gatunków. Pierwszą pracą poświęconą tej tematyce była praca **Kijewska i in. (2008)**, w której skupiałam się na badaniu historii ewolucyjnej nicieni reprezentujących nadrodzinę Ascaridoidea. Wyniki analizy pokazały, że w obrębie tego taksonu kilkakrotnie doszło do niezależnego wykształcenia monoksenicznego (w obrębie pojedynczego żywiciela) cyklu życiowego. Ponadto **udowodniliśmy, że fizjologia żywiciela ostatecznego stanowi silną barierę selekcyjną.** Zastosowaliśmy również kilka metod testowania topologii uzyskanych drzew i doszliśmy do wniosku, że rozwiązywanie trudnych problemów filogenetycznych dotyczących historii ewolucji nicieni pasożytniczych wymaga dużych zbiorów danych. **Dalszy postęp może wymagać sekwencjonowania znacznie wyższej liczby genów, w tym też takich, które kodują białka. Problemu rozdzielczości analizy nie rozwiązuje natomiast analizowanie większej liczby taksonów.**

Dwie prace ze swojego dorobku poświęciłam na analizę DNA mitochondrialnego wybranych gatunków pasożytów z rodziny Anisakidae: *Anisakis* sp. i *Contracaecum* sp. Analiza populacyjna Anisakidae była jedną z pierwszych prac, która wykorzystywała DNA mitochondrialne do badań populacyjnych w obrębie tej rodziny. Wcześniej tylko Cross i in. (2007) zajęli się zróżnicowaniem *Anisakis simplex* s.s. (Rudolphi, 1809) na podstawie analizy sekwencji COI (pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej). W pracy poświęconej analizie mitochondrialnego DNA *A. simplex* s.s. (**Kijewska i in. 2009**) wykazaliśmy, że uznawana dotychczas za słabo ustrukturyzowaną (Mattiucci i in. 1997) **populacja *A. simplex* s.s. jest podzielona na dwie izolowane geograficznie subpopulacje. Subpopulacja z Oceanu Spokojnego jest dodatkowo ustrukturyzowana genetycznie, co wskazuje na to, że jest starsza od nieustrukturyzowanej subpopulacji z Oceanu Atlantyckiego.**

Druga praca (Dzido, **Kijewska, Rokicki 2012**), poświęcona była analizie wybranych fragmentów mtDNA i ich przydatności do badań taksonomicznych gatunków z kompleksu *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802). W pracy tej wykazaliśmy, że **mtDNA pozwala na identyfikację blisko spokrewnionych ze sobą gatunków z kompleksu gatunków siostrzanych *C. osculatum*. Ponadto wykazaliśmy, że procesem ewolucyjnym wpływającym na utrzymywanie się różnic międzygatunkowych w obrębie kompleksu gatunków siostrzanych na poziomie mitochondrialnego genomu jest selekcja negatywna.**

W przyszłości interesującym tematem badawczym może być kompleksowa analiza interakcji żywiciel-pasożyt uwzględniająca wpływ czynników środowiskowych na rozmieszczenie badanych gatunków. Również ekspresja wybranych genów związanych z procesem kolonizacji gospodarzy może rzucić światło na mechanizmy adaptacji do określonych nisz w środowisku gospodarza.

5.3 Prace przed uzyskaniem stopnia doktora

W czasie studiów doktoranckich zapoczątkowanych w 1999 roku, zajmowałam się, zgodnie z tematyką doktoratu konstrukcją klucza molekularnego, który umożliwiłby identyfikację wybranych nicieni z nadrodziny Ascaridoidea. Dodatkowo zajmowałam się analizą zależności pomiędzy dystrybucją wybranych przedstawicieli fauny pasożytniczej storni a ich wiekiem i czynnikami środowiskowymi takimi jak rejonowe zanieczyszczenie wody.

Wyniki pracy poświęconej zależności pomiędzy występowaniem kolcogłowa *P. laevis* i wiekiem storni (*P. flesus*) (Ziółkowska M., Chibani M., **Kijewska A.**, Rokicki J. 2000) wskazały, że **strategia rozwoju *P. laevis* zależy prawdopodobnie od dostępności żywicieli pośrednich** oraz, być może, **od umiejscowienia akantelli w organach wewnętrznych ryby**. Równocześnie **intensywność zarażenia ryb jest ściśle powiązana z ich preferencjami dietetycznymi, wiekiem ryb i wymiarami potencjalnego pożywienia**. Publikacja poświęcona badaniom nad parazytofauną storni (Chibani M., Ziółkowska M., **Kijewska A.**, Rokicki J. 2001) wskazała na **zależność zarażenia kolcogłowami *P. laevis* i miejscowym poziomem zanieczyszczenia wody**, który wpłynął na dostępność żywicieli pośrednich kolcogłowa.

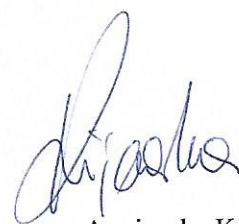
W dwóch publikacjach związanych bezpośrednio z tematem doktoratu udowodniłam na przykładzie analizy fragmentu ITS1-5.8S-ITS2 w *Anisakis simplex* s.s., że poziom zróżnicowania tego odcinka rybosomalnego DNA nie utrudnia identyfikacji gatunku niezależnie od pochodzenia geograficznego pasożyta (**Kijewska i in. 2000**). W efekcie ustaliłam, że klucz molekularny oparty o analizę wskazanego odcinka rDNA jest kluczem uniwersalnym pod względem geograficznym. Druga publikacja opisywała metodę oznaczania poszczególnych gatunków pasożytów za pomocą metody PCR-RFLP odcinka rDNA zawierającego ITS1-5.8S-ITS2. Łącznie opisałam w niej sposób oznaczenia dla 11 gatunków pasożytniczych nicieni (**Kijewska i in. 2002**). Wzory restrykcyjne (RFLP) wykazały, że endonukleaza *TaqI* była najbardziej użytecznym enzymem do identyfikacji wszystkich badanych gatunków. Nie wykryto żadnych zmian we wzorcach restrykcyjnych w obrębie każdego gatunku. W związku z tym klucz molekularny PCR-RFLP może być stosowany do identyfikacji pasożytów morskich i słodkowodnych z nadrodziny Ascaridoidea bez względu na ich pochodzenie geograficzne.

Ostatnia praca opublikowana przed uzyskaniem tytułu doktora dotyczyła zmian patologicznych w uchu wewnętrznym morswina (*Phocoena phocoena* L.), powiązanych z pasożytem *Stenurus minor* (Kühn, 1829) (Kijewska i in. 2003). Badania te wskazały, że zarażenie tym pasożytem jest bezpośrednią przyczyną uszkodzeń narządów słuchu, skutkujących poważnym stresem, bólem i dezorientacją morswinów.

Cytowana literatura

- Chibani M., Kijewska A., Rokicki J. (2005) Sex and age of flounder *Platichthys flesus* (L.) and parasitic infection in the Gulf of Gdańsk. *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* 34, 85-96.
- Chibani M., Ziółkowska M., Kijewska A., Rokicki J. (2001) *Pomphorhynchus laevis* parasite of flounder *Platichthys flesus* as a biological indicator of pollution in the Baltic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 101, 35-39.
- Cross M. A., Collins C., Campbell N., Watts P. C., Chubb J. C., Cunningham C. O., Hatfield E.M. C., Mackenzie K. (2007) Levels of intra-host and temporal sequence variation in a large CO1 subunits from *Anisakis simplex* sensu stricto (Rudolphi 1809) (Nematoda: Anisakidae): Implications for fisheries management. *Mar. Biol.* 151, 695–702.
- Dzido J., Kijewska A., Rokicki J. (2012) Selected mitochondrial genes as species markers of the Arctic *Contraecaecum osculatum* complex. *J. Helminthol.* 86, 252-258.
- Dzido J., Kijewska A., Rokicka M., Świątalska – Koseda A., Rokicki J. (2009) Report on anisakid nematodes in polar regions - preliminary results. *Polar Sci.* 3, 207-211.
- Gosse K., Wroblewski, J. (2004) Variant colourations of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in Newfoundland and Labrador nearshore waters. *ICES J. Mar. Sci.: J. Conseil.* 61, 752–759.
- Karpiej K., Dzido J., Rokicki J., Kijewska A. (2013) Anisakid Nematodes of Greenland Halibut *Reinhardtius hippoglossoides* from the Barents Sea. *J. Parasitol.* 99, 650-654.
- Kijewska A., Burzyński A., Wenne R. (2009) Molecular identification of European flounder (*Platichthys flesus*) and its hybrids with European plaice (*Pleuronectes platessa*). *ICES J. Mar. Sci.* 66, 902-906.
- Kijewska A., Czarna A., Fernandez M., Zdzitowiecki K., Rokicki J., Wróbel B. (2008) Analysis of 5.8S rDNA and internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences of ascaridoid nematodes: Phylogenetic signal and hypothesis testing. *Genes Genom.* 30, 291-306.
- Kijewska A., Dzido J., Rokicki J. (2009) Mitochondrial DNA of *Anisakis simplex* s.s. as a potential tool for differentiating populations. *J. Parasitol.* 95, 1364-1370.
- Kijewska A., Dzido J., Shukhgalter O., Rokicki J. (2009) Anisakid parasites of fishes caught on the African shelf. *J. Parasitol.* 95, 639-645.
- Kijewska A., Jankowski Z., Kuklik I., Rokicki J. (2003) Pathological changes in the auditory organs of the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*, L.) associated with *Stenurus minor* (Kuhn, 1829). *Acta Parasitologica* 48, 60-63.
- Kijewska A., Rokicki J., Sitko J., Węgrzyn G. (2002) Ascaridoidea: A simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. *Exp. Parasitol.* 101, 35-39.
- Kijewska A., Słomińska-Wojewódzka M., Węgrzyn G., Rokicki J. (2000) A PCR-RFLP assay for identification of *Anisakis simplex* from different geographical regions. *Molecular and Cellular Probes* 14, 349-354.

- Kijewska A.**, Więcaszek B., Kalamarz-Kubiak H., Szulc J., Sobecka E. (2012) Skin structure studies and molecular identification of the Atlantic cod *Gadus morhua* L. of unique golden pigmentation from the Svalbard Bank. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 60-65.
- Małachowicz M., **Kijewska A.**, Wenne R. (2015) Transcriptome analysis of gill tissue of Atlantic cod *Gadus morhua* L. from the Baltic Sea. *Mar. Genomics* 23, 37-40.
- Mattiucci S., Nascetti G. (2006) Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: An update. *Parasite* 13, 99-113.
- Mattiucci S., Nascetti G. (2008) Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv.Parasitol.* 66, 47-148.
- Mattiucci S., Nascetti G., Clanchi L., Paggi P., Arduino L., Margolis J., Bratney S., Webb S., D'amelio P., Orecchia P., Bullini L. (1997) Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J. Parasitol.* 83, 401-416.
- Najda K., **Kijewska A.**, Kijewski T., Plauška K., Rokicki J. (2018) Distribution of ascaridoid nematodes (Nematoda: Chromadorea: Ascaridoidea) in fish from the Barents Sea. *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* 47, 128-139.
- Poćwierz-Kotus A., **Kijewska A.**, Petereit C., Bernaś R., Więcaszek B., Arnyasi M., Lien S., Kent M.P., Wenne R. (2015) Genetic differentiation of brackish water populations of cod *Gadus morhua* in the southern Baltic, inferred from genotyping using SNP-arrays. *Mar. Genomics* 19, 17-22.
- Rybczyk A., Czerniejewski P., Rokicka-Praxmajer J. (2014) First record of brown colouration of Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) from the North Sea. *Oceanologia* 56, 159-163.
- Sick K., Frydenberg O., Nielsen J. T. (1963) Haemoglobin patterns of plaice, flounder and their natural and artificial hybrids. *Nature* 198, 411-412.
- Ziółkowska M., Chibani M., **Kijewska A.**, Rokicki J. (2000) The occurrence of *Pomphorhynchus laevis* (Muller, 1776) (Acanthocephala) and the age of the flounder (*Platichthys flesus*, L.). *Helminthologia* 37, 159-161.



Agnieszka Kijewska