

1. Imię i nazwisko

Agnieszka Kloch

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2010 doktor nauk biologicznych, Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński

Praca doktorska *Geny głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) klasy II, pasożyty i struktura populacji u dwóch gatunków gryzoni – nornicy rudej *Myodes glareolus* i susła perełkowanego *Spermophilus suslicus** wykonana pod kierunkiem prof. Jacka Radwana

2003 magister biologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Praca magisterska *Rozmieszczenie, liczebność i wybiórczość pokarmowa wilków (*Canis lupus*) z Lasów Napiwodzko-Ramuckich i Puszczy Piskiej* wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Jędrzejewskiego z Zakładu Badania Ssaków PAN i dr Marcina Brzezińskiego z Zakładu Ekologii Wydziału Biologii UW

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

10.2013 – obecnie	adiunkt, Uniwersytet Warszawski Wydział Biologii (pełen etat) <ul style="list-style-type: none">• 04-08.2018 – urlop macierzyński• od 08.2018 – 1/2 etatu łączone z urlopem rodzicielskim
10.2010 – 09.2013	popularyzator nauki, Centrum Nauki Kopernik
10.2009 – 06.2011	asystent naukowy - kierownik grantu, Uniwersytet Jagielloński, Instytut Nauk o Środowisku (1/8 etatu)
10.2004 – 10.2009	doktorant, Uniwersytet Jagielloński, Instytut Nauk o Środowisku
04.2004-01.2005	Ogólnopolskie Towarzystwo Ochrony Ptaków

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14.03.2003 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

Procesy kształtujące dynamikę liczebności populacji pasożytów a ewolucja genów odporności u żywicieli w warunkach naturalnych

sumaryczny IF: 13,11

liczba punktów MNISW: 135

liczba cytowań 25

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Kloch A**, Baran K, Buczek M, Konarzewski J, Radwan J. 2013. MHC influences parasite load and winter survival in the root vole *Microtus oeconomus*. *Evolutionary Ecology* 27: 635-653

IF₂₀₁₃: 2,372, **IF_{5-letni}**: 2,42 **pkt MNISW**: 25, **liczba cytowań**: 22

Mój udział oceniam na 55%. Polegał on na opracowaniu koncepcji badań, wykonaniu prac terenowych, oznaczeń parazytologicznych i genotypowaniu, analizie danych oraz przygotowaniu manuskryptu do publikacji. W pracy pełniłam rolę autora korespondencyjnego. Publikacja powstała w ramach grantu NCN nr N304 168836, którego byłam kierownikiem.

2. **Kloch A**, Michalski A, Bajer A, Behnke J. 2015. Biased sex ratio among worms of the family Heligmosomidae - searching for a mechanism. *International Journal for Parasitology*, 45: 939–945

IF₂₀₁₆: 3,73 , **IF_{5-letni}**: 3,6 **pkt MNISW**: 40, **liczba cytowań**: 0

Mój udział oceniam na 75%. Polegał on na wykonaniu analiz, interpretacji wyników, i przygotowaniu manuskryptu do publikacji. W pracy pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

3. Biedrzycka A, **Kloch A**. 2016. Development of novel associations between MHC alleles and susceptibility to parasitic infections in an isolated population of an endangered mammal. *Infection, Genetics and Evolution* 44, 210-217

IF₂₀₁₆: 2,89, **IF_{5-letni}**: 2,83 **pkt MNISW**: 30, **liczba cytowań**: 2

Mój udział oceniam na 50%. Polegał on na oznaczeniu zarażenia pasożytami u badanych zwierząt i modelowaniu statystycznym uzyskanych wyników, przygotowaniu wyników do publikacji, współudziale w tworzeniu manuskryptu. W pracy pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

4. **Kloch A**, Wenzel MA, Laetsch DR, Michalski O, Bajer A, Behnke J, Welc-Falęciak R, Piertney SB. 2018. Signatures of balancing selection in toll-like receptor (TLRs) genes – novel insights from a free-living rodent. *Scientific Reports* 8: 8361

IF₂₀₁₇: 4,12, **IF_{5-letni}**: 4,61, **pkt MNISW**: 40, **liczba cytowań**: 1

Mój udział oceniam na 55%. Polegał on na opracowaniu koncepcji badań, genotypowaniu, analizie danych oraz przygotowaniu manuskryptu do publikacji. W pracy pełniłam rolę autora korespondencyjnego. Publikacja powstała w ramach grantu NCN Opus (2012/07/B/NZ8/00058), którego byłam kierownikiem.

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

Wstęp

W warunkach naturalnych zwierzęta są narażone na wiele gatunków pasożytów, od bakterii i wirusów po wielokomórkowe helminty, a zdolność do zwalczania infekcji wpływa istotnie na dostosowanie poprzez zwiększoną śmiertelność i/lub zmniejszoną płodność zarażonych osobników (np. Gulland i Fox 1992, Burthe i in. 2008). Z tego powodu pasożyty stanowią istotną siłę selekcyjną wpływającą na ewolucję żywicieli. Dynamika ewolucji w układzie pasożyt-żywiciel ma charakter wyścigu zbrojeń – pasożyty wykształcają dostosowania umożliwiające przełamanie mechanizmów obronnych żywiciela, z kolei po stronie żywiciela dochodzi do ciągłych zmian tych mechanizmów, co zapewnia zachowanie odporności.

Do właściwego zrozumienia wpływu pasożytów na ewolucję żywicieli konieczne jest poznanie ich ekologii, a zwłaszcza czynników kształtujących liczebność i sukces reprodukcyjny. Na oba te parametry wpływają interakcje między- i wewnątrzgatunkowe między pasożytami, jednak o ile wpływ konkurencji międzygatunkowej został dość dobrze opisany (np. Telfer i in. 2010), rola czynników wewnątrzgatunkowych jest znacznie słabiej poznana. W przypadku rozdzielnopłciowych pasożytów o prostym cyklu życiowym konkurencja wewnątrzgatunkowa, w tym konkurencja między płciami, wydaje się istotnym czynnikiem kształtującym dynamikę liczebności populacji, dlatego w **pierwszej pracy (Kloch i in., 2015, *Int J Paras*)** zajęłam się dokładniej tym zagadnieniem. Praca ta stanowi tło dla pozostałych publikacji wchodzących w skład osiągnięcia.

Na poziomie genetycznym presja ewolucyjna ze strony pasożytów jest najlepiej widoczna w genach kodujących elementy odpowiedzi immunologicznej, ponieważ białka układu odpornościowego wchodzą w bezpośrednie interakcje z pasożytami. Zależność ta została najdokładniej poznana w przypadku genów głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC, major histocompatibility complex), stanowiącego kluczowy element odpowiedzi nabytej opartej o rozpoznawanie antygenów. Kompleks MHC należy do najbardziej polimorficznych loci u kręgowców i uważa się, że ich wysoka zmienność jest utrzymywana poprzez dobór równoważący (*balancing selection*) ze strony pasożytów (Berhatchez i Landry 2003, Piertney i Oliver 2006). Istnieje wiele prac pokazujących związek polimorfizmu genów MHC zarówno z odpornością, jak i podatnością na pasożyty w populacjach naturalnych (przegląd w: Sommer 2005, Piertney i Oliver 2006), jednak badania te w przeważającej większości miały charakter korelacyjny, co nie pozwala na bezpośrednie wnioskowanie o przystosowawczym charakterze tych związków. W **drugiej pracy**

(Kloch i in. 2013 *Evol Ecol*) wchodzącej w skład osiągnięcia postanowiłam uzupełnić tę lukę poprzez zbadanie wpływu obecności „alleli odporności” na podstawowy parametr dostosowania, jakim jest przeżywalność.

Kolejnym słabo poznanym aspektem zależności między genotypem żywiciela a podatnością na infekcje jest dynamika czasowa tych związków. Zagadnieniu temu poświęcono **trzecią pracę (Biedrzycka i Kloch 2016, *Infect Genet Evol*)** wchodzącą w skład osiągnięcia, której przedmiotem były zmiany w czasie występowania pasożytów i frekwencji alleli MHC DRB w izolowanej populacji susła perełkowanego. Wnioski płynące z tej pracy mają zastosowanie w planowaniu działań ochronnych, ponieważ infekcje zwiększają ryzyko wymarcia zagrożonych gatunków (McCallum i Dobson 2002), a na ich działanie szczególnie narażone są małe populacje odznaczające się niską zmiennością genetyczną (Radwan i in. 2010).

MHC stanowi tylko jeden z wielu elementów składających się na różnorodność odpowiedzi immunologicznej (Jepson i in. 1997), przy czym mechanizmy ewolucyjne kształtujące zmienność innych komponentów układu odpornościowego są dotychczas słabo poznane. **Czwartą pracę (Kloch i in. 2018 *Sci Rep*)** poświęcono określeniu roli pasożytów w kształtowaniu zmienności receptorów TLR stanowiących element wrodzonej odpowiedzi immunologicznej.

Prowadzone przeze mnie badania wpisują się w stosunkowo nową gałąź biologii ewolucyjnej nazwaną „dziką immunologią” (Pedersen i Babayan 2011). Jej celem jest poznanie mechanizmów warunkujących odporność w warunkach naturalnych, ponieważ na wolności zwierzęta muszą jednocześnie radzić sobie z infekcjami i innymi czynnikami stresowymi, takimi jak interakcje społeczne, głód, skrajne warunki pogodowe itd., a w takich warunkach funkcjonowanie układu odpornościowego może się istotnie różnić od odpowiedzi w warunkach laboratoryjnych.

Publikacja 1

Kloch A, Michalski A, Bajer A, Behnke J. 2015. Biased sex ratio among worms of the family Heligmosomidae - searching for a mechanism. *International Journal for Parasitology*, 45: 939–945

Wstęp

Znajomość ekologii pasożytów jest konieczna dla lepszego zrozumienia ich roli jako siły ewolucyjnej wpływającej na zmienność genetyczną w populacjach żywicieli. Z ekologicznego punktu widzenia pasożyty funkcjonują w systemie metapopulacji, a poszczególne osobniki

żywielskie stanowią izolowane wyspy. Migracja jest możliwa tylko między pokoleniami, poprzez formy dyspersyjne czyli – w przypadku nicieni – uwalniane do środowiska jaja.

Na dynamikę liczebności populacji rozdzielnopłciowych nicieni istotnie wpływa proporcja płci, ponieważ od niej zależy ilość produkowanych jaj, a więc pośrednio także efektywność zarażenia kolejnych żywicieli. Zgodnie z zasadą Fishera, równa proporcja płci jest strategią ewolucyjnie stabilną (Edwards 1998), jednak u wielu gatunków nicieni zaobserwowano odstępstwa od tej zasady, zwykle w kierunku przewagi samic. Znaczenie ekologiczne i ewolucyjne tego zjawiska jest słabo poznane. Ponieważ przewaga samic maleje przy wysokich zagęszczeniach populacji pasożytów, niektórzy badacze uznali taką proporcję płci za mechanizm pozwalający skompensować niższe szanse znalezienia partnera (*mating probability*) przy niskich zagęszczeniach (Haukisalmi i in. 1996). Inni autorzy przyczyny upatrywali w konkurencji o zasoby pokarmowe (Stien i in. 1996), w szczególności z innymi gatunkami pasożytów (Tarasovskaya 2008). Hipotezy te nie znalazły jednak potwierdzenia w części badań i wpływ nierównej proporcji płci na dynamikę populacji nicieni wymaga dalszego wyjaśnienia.

Celem niniejszej pracy była analiza czynników kształtujących strukturę populacji dwóch gatunków nicieni o podobnej biologii zarażających nornicę rudą: *Heligmosomum mixtum* i *Heligmosomoides glareoli*, ze szczególnym uwzględnieniem proporcji płci. Nicienie te należą do najczęściej spotykanych pasożytów nornicy rudej (Bajer et al. 2005) i mają prosty cykl życiowy obejmujący tylko jednego żywiciela. Długość życia jest zbliżona do długości życia nornicy w warunkach naturalnych, przez co raz zarażony żywiciel zwykle pozostaje zainfekowany do końca życia (Haukisalmi i in. 1996).

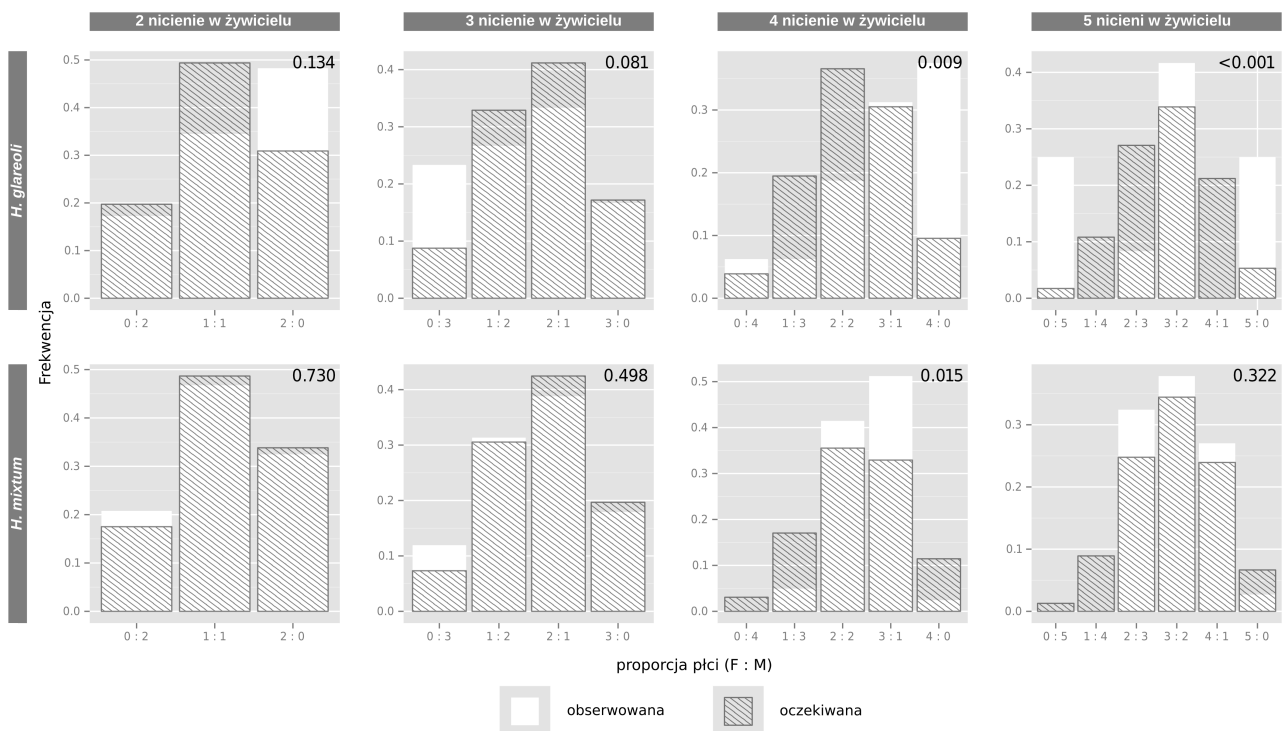
Wyniki

W pracy przeanalizowano dane obejmujące 1458 zarażonych nornic odłowionych w trakcie 23 sesji odłowów przeprowadzonych na przestrzeni 11 lat na trzech powierzchniach w okolicy stacji terenowej Uniwersytetu Warszawskiego w Urwitałcie na Mazurach (Behnke i in. 2001, Bajer i in. 2005). Ponieważ populacje pasożytów ze swojej natury wykazują strukturę związaną z podziałem populacji między osobniki żywicielskie, analizę przeprowadzono na dwóch poziomach (Sousa 1994): i) metapopulacji, rozumianej jako populacja pasożytów jednego gatunku występujących w danym gatunku żywiciela oraz ii) infrapopulacji czyli populacji pasożytów jednego gatunku występującej w jednym osobniku żywicielskim.

U obu gatunków nicieni stwierdzono istotny nadmiar samic, proporcja samic wynosiła

odpowiednio 0,58 u *H. mixtum* i 0,56 u *H. glareoli*. Na poziomie metapopulacji wyliczono dwa parametry: współczynnik agregacji k oraz szansę znalezienia partnera (*mating probability*) wg Maya i Woolhousa (1993). Współczynnik agregacji dla wszystkich serii odłowów poza czterema był niższy od 1, co oznacza, że w badanych populacjach osobniki żywicielskie o skrajnie wysokiej lub skrajnie niskiej liczbie pasożytów występowały częściej niż wynikałoby to z rozkładu losowego. Najwyższy współczynnik agregacji stwierdzono w serii odłowów odznaczającej się największym odsetkiem zarażonych żywicieli i najwyższą średnią intensywnością infekcji.

We wszystkich seriach odłowów poza jedną szansa znalezienia partnera przez samicę (*mating probability*) była wysoka ($\geq 80\%$). U *H. mixtum* stwierdzono marginalnie nieistotną zależność między szansą znalezienia partnera i proporcją samic ($r = -0,476$, $p = 0,06$). Wbrew wcześniejszym doniesieniom (Haukisalmi i in. 1996, Stien i in. 1996) nie potwierdzono korelacji pomiędzy proporcją płci i współczynnikiem agregacji, ani między proporcją płci a zagęszczeniem populacji pasożytów.



Rycina 1. Porównanie oczekiwanej (kreskowane słupki) i obserwowanej (białe słupki) rozkładu proporcji płci w infraciatach liczących od 2 do 5 niciani. U góry każdego histogramu podano istotność statystyczną różnicy między rozkładami (źródło: Kloch i in. 2015).

Analiza na poziomie infraciata wykazała, że proporcja samic u *H. mixtum* była wyższa u starszych żywicieli, na co wskazywała istotna korelacja proporcji płci z masą soczewek żywiciela stanowiących dobrą aproksymację wieku (uogólniony model liniowy, $\chi^2 = 5,407$, $p = 0,043$). U *H.*

glareoli proporcja płci była przechylona na stronę samców u żywicieli zarażonych jednocześnie co najmniej dwoma tasiemcami ($\chi^2=4,172$, $p=0,041$), jednak wynik ten jest niepewny ze względu na niską liczbę takich zarażeń.

Najciekawszym wynikiem na poziomie infrapopulacji jest nadreprezentacja infekcji złożonych z pasożytów tylko jednej płci (Rycina 1). W infrapopulacjach liczących co najmniej dwa nicienie infekcje złożone z jednej płci stanowiły 24,7% zarażeń *H. glareoli* i 15,8% zarażeń *H. mixtum*. W infrapopulacjach liczących 4 i 5 osobników *H. glareoli* istotnie częściej niż wynikało to z rozkładu teoretycznego stwierdzano infekcje złożone z samych samców lub samych samic (Ryc 1). Nadmiar infekcji złożonych tylko z samic stwierdzono też w infrapopulacjach o liczebności 4 u *H. mixtum*.

Znaczenie wyników

W niniejszej pracy nie potwierdzono hipotezy tłumaczącej nierówną proporcję płci u nicieni parametrami na poziomie metapopulacji. **Stwierdzono natomiast istotną rozbieżność pomiędzy oczekiwaną i obserwowaną proporcją płci w infrapopulacjach liczących od 2 do 5 pasożytów, a także nadreprezentację infekcji złożonych tylko z jednej płci. Tego rodzaju obserwacje nie były dotychczas opisane, a ponieważ infekcje jednopłciowe wydają się niekorzystne przystosowawczo, zaproponowałam mechanizm tłumaczący to zjawisko.**

Badane nicienie mają cykl bezpośredni tzn. kolejne nornice zarażają się przez kontakt z jajami znajdującymi się w odchodach osobników zarażonych. Liczebność infrapopulacji Heligmosomidae jest niezbyt wysoka i rzadko przekracza 10 nicieni. Przy założeniu panmiksji istnieje więc spora szansa, że dwa losowo wybrane osobniki potomne będą miały wspólnych rodziców. Dla przykładu, średni współczynnik pokrewieństwa potomstwa pochodzącego z infrapopulacji złożonej z czterech nicieni, dwóch samców i dwóch samic, wynosi 0,25 – tyle samo, co w infrapopulacji złożonej z jednego samca i czterech samic. Kiedy odchody zawierające jaja z takiej infrapopulacji trafią do kolejnego żywiciela, powstająca z nich nowa infrapopulacja będzie złożona ze spokrewnionych osobników i przez to narażona na kojarzenie krewniacze. Zaproponowany przeze mnie mechanizm zakłada, że w celu uniknięcia inbrodu osobniki jednej płci usuwają w takiej populacji rodzeństwo drugiej płci, co skutkuje nadreprezentacją infekcji jednopłciowych. Ze względu na koszty kojarzenia krewniaczego opłacalne wydaje się odroczenie rozrodu do czasu pojawienia się niespokrewnionych partnerów, którzy mogą zasilić daną infrapopulację na skutek kolejnego

zarażenia nornicy jajami pochodzącymi od innego osobnika. Chociaż nie jest znany sposób, w jaki nicienie miałyby usuwać rodzeństwo, mechanizm taki może stanowić skuteczny sposób unikania inbrodu i przez to pozwalający na zachowanie wysokiej zmienności genetycznej. Wysoka zmienność ma w przypadku pasożytów istotne znaczenie przystosowawcze, ponieważ zapewnia potencjał umożliwiający powstawanie przystosowań pozwalających ominąć mechanizmy obronne żywicieli zgodnie z dynamiką Czerwonej Królowej. Wynik ten jest szczególnie istotny w kontekście pracy 4 wchodzącej w skład prezentowanego osiągnięcia, w której analizowano te same populacje, i częściowo te same osobniki żywicielskie, co w niniejszej publikacji. **Uzyskane wyniki nakreślają ekologiczne tło, na którym toczy się ewolucyjny wyścig zbrojeń między pasożytami i żywicielami, a jego aspekty z punktu widzenia żywicieli opisano w publikacji 4.**

Publikacja 2

Kloch A, Baran K, Buczek M, Konarzewski J, Radwan J. 2013. MHC influences parasite load and winter survival in the root vole *Microtus oeconomus*. *Evolutionary Ecology* 27: 635-653

Praca powstała w ramach grantu MNiSW nr N304 168836, którego byłam kierownikiem. Grant realizowałam w latach 2010-12 w Instytucie Nauk o Środowisku Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Wstęp

Mimo licznych prac pokazujących związku występowania poszczególnych alleli MHC z podatnością na infekcje (przegląd w: Spurgin i Richardson 2010), funkcjonalne znaczenie tych związków pozostaje słabo zbadane. U niektórych gatunków, takich jak owce Soay, osobniki posiadające allele MHC związane z odpornością na zarażenie nicieniami odznaczały się wyższą przeżywalnością (Paterson i in. 1998). U innych, takich jak kozice, genotyp MHC wpływał na przeżywalność, ale nie zapewniał odporności na świerzbowca (Schaschl i in. 2012). Wpływ pasożytów na przeżywalność nie jest zresztą jasny, podczas gdy niektórzy autorzy stwierdzili negatywny wpływ pasożytów na przeżywalność (Gulland i Fox, 1992, Burthe i in. 2008), inni nie znaleźli takiej zależności; niekiedy przeciwstawne wyniki otrzymywano w przypadku tego samego gatunku (Moss i in. 1990, Hudson 1986).

Ze względu na znaczne różnice w biologii pasożytów, nie bez znaczenia wydaje się gatunek pasożyta, który stanowi obiekt badań. Zgodnie z hipotezą Scotta i Dobsona (1989) wpływ pasożytów na dostosowanie żywicieli zależy od złożoności cyklu życiowego – pasożyty o transmisji bezpośredniej powinny są bardziej zjadliwe niż pasożyty wymagające do swojego

rozwoju żywicieli pośrednich. Ponadto negatywny wpływ pasożytów zależy od innych czynników, takich jak płeć żywiciela czy dostępność pokarmu (Fuller i Blaustein 1996, Murray i in. 1996)

Celem niniejszej pracy było określenie związków między zarażeniem pasożytami, haplotypem MHC a przeżywalnością zimową u nornika północnego *Microtus oeconomus*. Przyjęto następujące hipotezy:

1. Pasożyty o transmisji bezpośredniej i szerokim spektrum żywicieli powinny być bardziej zjadliwe niż pasożyty specyficzne, wymagające do rozwoju żywicieli pośrednich. Pasożyty pozostające z żywicielami w długotrwałych oddziaływaniach trwających przez większość życia powinny być mniej zjadliwe niż mikropasożyty wywołujące krótkotrwałe infekcje.
2. W badanej populacji powinny występować allele MHC DRB związane z podatnością (lub odpornością) na infekcje.
3. Zakładając, że poszczególne allele MHC wpływają na podatność na zarażenie, związki te powinny wpływać na przeżywalność. Spodziewano się, że osobniki posiadające allele warunkujące oporność będą rzadziej zarażone, a zatem będą miały większe szanse przeżycia zimy niż osobniki pozbawione takich alleli oraz osobniki posiadające allele związane z podatnością.

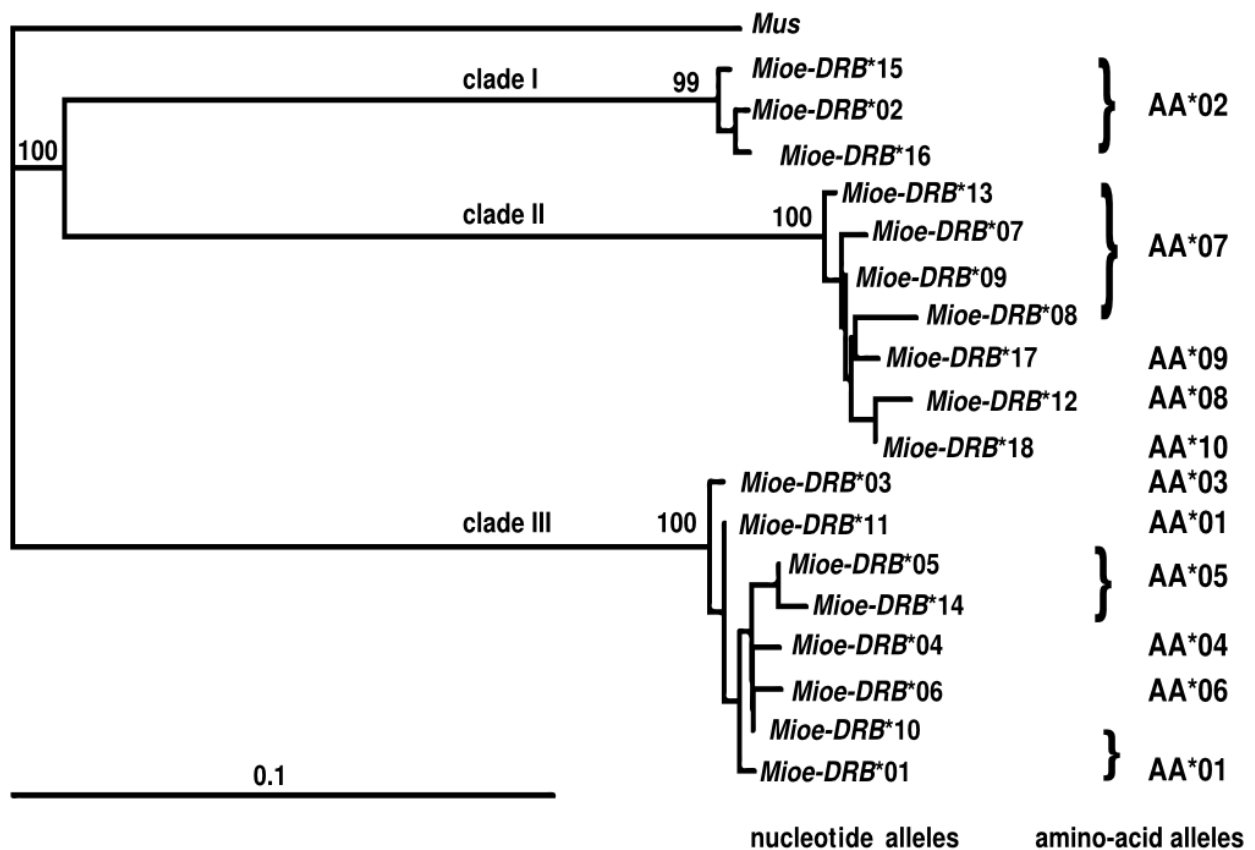
Wyniki

Spośród 167 zwierząt złowionych jesienią, zarażenie określono u 159. Zarażenie pasożytami krwi było wyższe niż pasożytami jelitowymi, tym samym potwierdzono hipotezę 1. W krwi stwierdzono cztery gatunki pasożytów, z czego najczęstsza była *Haemobartobella* sp. (43,9% zarażonych zwierząt) i *Babesia* sp. (22,3%), rzadziej stwierdzano *Trypanosoma* sp. (7,4%) oraz *Bartonella* sp. (1%). W odchodach wykryto jaja 4 gatunków helmintów: jaja tasiemców stwierdzono u 10% norników, nicienie z rodzaju *Trichuris* u 3,5%, sporadycznie (1%) zaobserwowano też nicienie z rodzaju *Syphacia*.

Genotypowanie w technologii 454 Roche pozwoliło wyróżnić 18 alleli MHC DRB. Badane locus uległo duplikacji, średnio u jednego osobnika stwierdzano 4,6 allelu, przy czym maksymalnie u jednego zwierzęcia występowało 6 alleli. Analiza filogenetyczna wyróżniła trzy wyraźne kłady (Rycina 2), z których każdy odpowiadał oddzielnemu locus. Ponieważ niektóre allele nukleotydowe miały taką samą sekwencję aminokwasową, w analizach posłużono się allelami aminokwasowymi (oznaczonymi dalej AA), żeby uwzględnić potencjalną zmienność białek MHC, a nie zmienność samych sekwencji.

Zgodnie z przewidywaniami, stwierdzono istotny związek pomiędzy występowaniem

poszczególnych alleli MHC a zarażeniem pasożytami. Zwierzęta posiadające allel AA*05 dwukrotnie częściej zarażone *Babesia sp.* niż zwierzęta bez tego allelu (odpowiednio 31,7 i 15,3%, $\chi^2=7,092$, $p=0,008$), natomiast osobniki z allelem AA*08 były odznaczały się niższą prevalencją *Babesia sp.* (13,9% u osobników z allelem, 25,7% bez niego, $\chi^2=4,14$ $p=0,042$). Zarażenie *Babesia sp.* zmniejszało szanse przeżycia zimy od listopada do marca (przeżywalność 20,8% u niezarażonych, 9,1% u zarażonych, $\chi^2=8,407$, $p=0,004$), a efekt ten był jeszcze silniejszy od stycznia do marca (odpowiednio 77% i 37%, $\chi^2=5,471$, $p=0,019$). Szansa przeżycia zimy zależała również od obecności alleli MHC. Osobniki posiadające allel AA*08 przeżywały lepiej w okresie od listopada do stycznia (z allelem przeżywalność wynosiła 44,9%, bez 22%, $\chi^2=6,648$, $p=0,01$). Wyższą przeżywalność stwierdzono u osobników z allelem AA*01, zarówno w pierwszej połowie zimy ($\chi^2=9,468$, $p=0,001$), jak i w całym badanym okresie ($\chi^2=8,661$, $p=0,004$).



Rycina 2. Drzewo filogenetyczne skonstruowane metodą najbliższego sąsiada (neighbour-joining) pokazujące podział alleli MHC-DRB na trzy główne klady. Po prawej stronie zaznaczono allele aminokwasowe odpowiadające poszczególnym allelom nukleotydowym (źródło: Kloch i in. 2013)

Znaczenie wyników

Zgodnie z hipotezą 1, stwierdzono istotny wpływ zarażenia pasożytem krwi *Babesia sp.*, na przeżywalność, zależności takiej nie stwierdzono natomiast w przypadku pasożytów jelitowych. Jak przypuszczano (hipoteza 2), wykryto związek między występowaniem określonych alleli MHC a podatnością na zarażenie tym pasożytem. **Najważniejszym wynikiem jest wyraźne pokazanie związku występowania alleli MHC z przeżywalnością i podatnością na infekcje w populacji w sytuacji, gdy zarażenie zmniejszało istotnie przeżywalność. Jest to pierwsza praca, w której te trzy czynniki analizowano jednocześnie.** Tym samym wykazano, że u krótkożyjących gryzoni, jakimi są norniki, występowanie alleli MHC związanych z odpornością na infekcje ma znaczenie przystosowawcze.

Publikacja 3

Biedrzycka A, Kloch A. 2016. Development of novel associations between MHC alleles and susceptibility to parasitic infections in an isolated population of an endangered mammal. *Infection, Genetics and Evolution* 44, 210-217

Wstęp

Pasożyty mogą istotnie przyczynić się do wyginięcia zagrożonych gatunków (McCallum i Dobson 2002), a na ich działanie są szczególnie narażone małe, izolowane populacje podatne są na negatywne efekty kojarzenia krewniczego i dryfu. Procesy te prowadzą do spadku różnorodności genetycznej, co może upośledzać zdolność do zwalczania infekcji (Radwan i in. 2010). Dla przykładu, większą podatność na infekcje stwierdzono u uchatek, których rodzice byli ze sobą blisko spokrewnieni (Acevedo-Whitehouse i in. 2003), natomiast u owiec osobniki heterozygotyczne odznaczały się niższą przeżywalnością na skutek zarażenia nicieniami (Coltman i in. 1999). Dobór naturalny może przeciwdziałać utracie alleli z przyczyn losowych i znane są gatunki, takie jak lis wyspowy, które zachowały zmienność w genach MHC mimo silnej utraty zmienności w loci neutralnych (Aguilar i in 2004). Negatywne skutki obniżonej zmienności w MHC nie zawsze jednak są widoczne, jak wykazano w przypadku bobra czy kozła śnieżnego (Babik i in. 2005, Mainguy i in. 2007).

Brak spójnego obrazu wyłaniający się z cytowanych wyżej pracy pokazuje, że znaczenie zmienności genetycznej w loci kodujących elementy układu odpornościowego dla podatności na

infekcje wśród zagrożonych gatunków nie jest w pełni poznane. W szczególności, niewiele wiadomo o zmianach frekwencji alleli w czasie. Chociaż wykazano, że takie zmiany mogą zachodzić bardzo szybko na skutek presji ze strony pasożytów (Eizaguirre i in. 2012), nie wiadomo, czy są wyjątkiem czy regułą. Dla przykładu, długoterminowe badania likaonów wykazały, że struktura w genach MHC i loci mikrosatelitarnych była w poszczególnych latach zbliżona, co pokazuje, że procesy demograficzne przeważały nad doborem (Marsden i in. 2012). Celem niniejszej pracy było ustalenie, jak zmieniało się w czasie zarażenie pasożytami i frekwencje alleli MHC w izolowanej populacji susła perełkowanego, która około 10 lat wcześniej przeszła przez silną redukcję liczebności.

Modele teoretyczne przewidują, że zachowanie pasożytów w populacji żywicieli zależy od tempa i rodzaju transmisji (McCallum i in. 2001). W przypadku transmisji zależnej od zagęszczenia gospodarzy, przy spadku liczebności żywicieli może dojść do sytuacji, w której dalsza transmisja pasożyta nie jest możliwa i pasożyt zaniknie z lokalnej populacji. Z kolei wahania liczebności populacji żywicieli nie powinny wpływać na występowanie przypadku pasożytów o szerokim spektrum żywicieli.

W pracy postawiono więc następujące hipotezy:

1. Spodziewano się innej dynamiki czasowej występowania pasożytów krwi i pasożytów jelitowych. Przypuszczano, że zarażenie pasożytami krwi będzie wyższe ze względu na szeroki rezerwuar żywicieli, natomiast opierając się na wcześniejszych pracach (Kloch 2010, Biedrzycka i in. 2011) spodziewano się niskiego zarażenia pasożytami jelitowymi o bezpośrednim cyklu życiowym.
2. Przyjęto założenie, że na frekwencję loci MHC działa dobór przeciwdziałający procesom demograficznym i dryfowi, dlatego oczekiwano wyższej zmienności w locus MHC i spodziewano się znaleźć różnice w dynamice zmian w czasie frekwencji alleli między MHC a loci neutralnymi.

Wyniki

W badanej populacji zmienność w loci neutralnych pozostawała na poziomie typowym dla izolowanej populacji, która przeszła niedawno znaczną redukcję liczebności: w 8 loci mikrosatelitarnych stwierdzono od 1 do 6 alleli i stosunkowo niską heterozygotyczność, która była niższa niż 0,5 w sześciu z siedmiu analizowanych loci (Tabela 1). Między latami zaobserwowano istotną zmianę frekwencji alleli MHC, ale nie loci neutralnych (wyniki testu dokładnego Fishera, odpowiednio $p=0,014$ i $p=0,673$) ale wbrew przewidywaniom, w 2014 nastąpił istotny spadek

heterozygotyczności w locus MHC DRB.

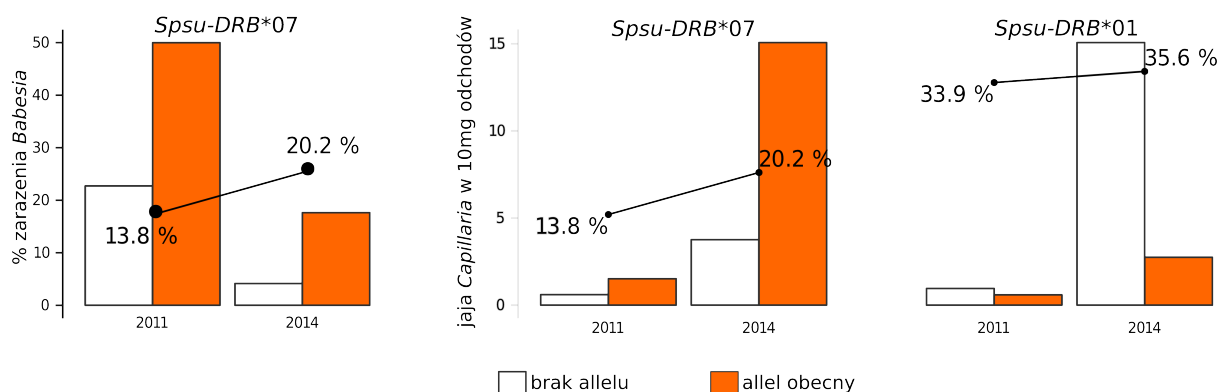
Między latami zaobserwowano istotny wzrost zarażenia pasożytami jelitowymi *Capillaria* (z 25,8% w 2011 do 59,6% w 2014) i *Trichuris* (z 0 do 13,4%). W 2014 u 7,6% osobników stwierdzono tasiemce, których w badanej populacji nie zaobserwowano w 2011 r. Wśród pasożytów krwi zaobserwowano spadek prevalencji i intensywności zarażenia *Babesia* sp. (28,8% w 2011, 9,7% w 2014) oraz *Anaplasma/Mycoplasma* sp. (odpowiednio 92,7% i 85%).

Tabela 1. Zmienność w badanych loci, Ssu oznaczają markery mikrosatelitarne, monomorficzne locus Ssu17 nie zostało uwzględnione w analizach. Ho – heterozygotyczność obserwowana, He - heterozygotyczność oczekiwana, p – istotność odstępstwa od równowagi Hardy'ego-Weinberga (z poprawką na wielokrotne porównania), R_A – bogactwo alleli.

Locus	2011					2014				
	n	Ho	He	p	R_A	n	Ho	He	p	R_A
MHC DRB	6	0.5065	0.7851	<0.001	6.00	6	0.3585	0.2970	0.767	2.00
Ssu1	4	0.3741	0.3776	1.000	3.07	4	0.7308	0.7797	0.906	6.00
Ssu3	2	0.1528	0.1533	1.000	2.00	2	0.2500	0.3480	0.024	3.97
Ssu5	3	0.1209	0.1525	0.249	2.97	3	0.2222	0.1997	1.000	2.00
Ssu7	2	0.4134	0.3924	1.000	2.00	2	0.1591	0.1711	0.904	3.00
Ssu8	5	0.5175	0.5098	0.995	4.93	5	0.3396	0.2846	0.934	2.00
Ssu15	3	0.0872	0.1086	0.393	2.50	2	0.3636	0.4052	0.916	5.00
Ssu16	4	0.4027	0.3724	0.034	2.80	2	0.0943	0.0907	1.000	2.00

Wykryto istotne związki alleli z podatnością na infekcje. U osobników z allelem Spsu-DRB*01 intensywność zarażenia nicieniem *Capillaria* była w 2014 pięć razy niższa niż u osobników bez tego allelu. W 2011 zależności takiej nie zaobserwowano ze względu na niski odsetek zarażonych osobników. Frekwencja allelu Spsu-DRB*01 nieznacznie wzrosła między latami z 33,9 do 35,6%. Niezgodnie z przewidywaniami frekwencja allelu Spsu-DRB*07 wzrosła z 13,8 do 20,2%, a jego występowanie było związane z wyższym ryzykiem zarażenia *Babesia* sp i wyższą liczbą jaj *Capillaria* sp. w odchodach (Rycina 3).

Zmienność neutralna nie miała związku z podatnością na infekcje. W celu wykluczenia ewentualnego wpływu na obserwowane związki alleli MHC z zarażeniem takich procesów jak nielosowe kojarzenie, przeprowadzono analizę pokrewieństwa między osobnikami. Korzystając z markerów neutralnych wyliczono współczynnik pokrewieństwa i na jego podstawie, przyjmując jako kryterium $r > 0,2$, wyróżniono w 2011 roku sześć grup spokrewnionych osobników i pięć takich grup w 2014. Frekwencje alleli Spsu-DRB*01 i *07 były podobne w tych grupach, nie stwierdzono też między nimi różnic w zarażeniu, co dowodzi, że obserwowane związki alleli z zarażeniem nie mogą wynikać z nielosowego kojarzenia czy wyższego zarażenia w niektórych rodzinach.



Rycina 3. Związek występowania alleli MHC DRB z podatnością na infekcje oraz zmiany częstości alleli w czasie (źródło: Biedrzycka i Kloch 2016)

Znaczenie wyników

W niniejszej pracy opisano znaczny wzrost zarażenia pasożytami jelitowymi w zagrożonej, izolowanej populacji susła perełkowanego. Do zmiany doszło w ciągu zaledwie trzech lat, chociaż w poprzednich latach zarażenie utrzymywało się na stałym, niskim poziomie (Kloch 2010, Biedrzycka i in. 2011). Znaczne zmiany zarażenia nie są typowe dla populacji dzikożyjących gryzoni (np. Bajer i in. 2005), a obserwowany wynik nie zgadzał się z przypuszczeniami. Zgodnie z modelem teoretycznym, do utrzymania się w populacji pasożytów o bezpośrednim cyklu życiowym konieczne jest pewne progowe zagęszczenie żywicieli. Znaczna redukcja liczebności żywicieli, do ok. 50 osobników w roku 2000, powinna spowodować zanik pasożytów jelitowych w tej populacji, a tymczasem zaobserwowano proces odwrotny. Zaproponowano następujące wyjaśnienie: kiedy liczebność susłów zaczęła rosnąć po załamaniu w roku 2000, powoli rosło ryzyko zarażenia na skutek wyższego zagęszczenia żywicieli i częstszych kontaktów między nimi oraz kumulacji na terenie kolonii odchodów zawierających jaja – jaja nicieni są odporne środowiskowo, mogą się pozostać infekcyjne przez kilka lat. **Rezultat ten pokazuje, że w przypadku izolowanych populacji zagrożonych gatunków wzrost liczebności może prowadzić – paradoksalnie – do większego narażenia na infekcje i dlatego wydaje się zasadne, żeby w działaniach ochronnych dotyczących takich populacji rutynowo uwzględniać monitorowanie infekcji.**

Z modelem teoretycznym nie zgadzał się spadek obserwowanych zarażeń pasożytem krwi *Babesia* sp., który jest przenoszony przez wektory między szerokim spektrum żywicieli, a więc jego transmisja pozostaje niezależna od zagęszczenia populacji susłów. Do wyjaśnienia tej obserwacji konieczne są dalsze badania, możliwe jednak, że przyczyną były zmiany zagęszczenia innych żywicieli (np. norników i myszy), albo spadek zagęszczenia wektorów ze względu na zmianę

warunków środowiska (Mierzejewska i in. 2015).

Najważniejszym wynikiem niniejszej pracy jest powiązanie zmian w liczebności pasożytów z frekwencją alleli MHC. W MHC nastąpił istotny spadek heterozygotyczności, którego nie stwierdzono w loci neutralnych. Co więcej, niezgodnie z przewidywaniami, wzrosła też frekwencja alleli związanych z podatnością na infekcje. Przyjmuje się, że geny MHC ewoluują pod działaniem doboru równoważącego – pasożyty przystosowują się do najczęstszych genotypów gospodarzy, przez co rzadkie allele związane są z odpornością, co skutkuje zmianami frekwencji alleli w czasie. W tym kontekście możliwych jest kilka wyjaśnień obserwowanych wyników. Po pierwsze, modele pokazują, że proces usuwania szkodliwych „alleli podatności” jest bardzo wolny (Apanius i in. 1997). Po drugie, allel Spsu-DRB*07 stwierdzany częściej u osobników o wysokiej liczbie jaj *Capillaria sp.* w odchodach, mógł zapewniać odporność na inne infekcje, których w niniejszej pracy nie analizowano. Jeżeli zarażenie innym patogenem obniżało dostosowanie bardziej niż zarażenie *Capillaria sp.*, wówczas powinien nastąpić wzrost frekwencji tego allelu, tak jak zaobserwowano. Wreszcie możliwy jest scenariusz, w którym allel ten umożliwiał przeżycie mimo wysokiej intensywności infekcji. W rezultacie w populacji pozostały mocno zarażone osobniki z tym allelem, natomiast osobniki z innymi allelami nie przeżyły infekcji o podobnej intensywności.

Niniejsza praca jest jednym z niewielu badań dynamiki zmian frekwencji alleli MHC w czasie. Biorąc pod uwagę, że susły rzadko żyją ponad 3 lata i wydają jeden miot rocznie, wyniki pokazują, że istotna zależność między allelami MHC a zarażeniem może powstać w ciągu zaledwie kilku pokoleń. Podkreślają tym samym znaczenie zachowania zmienności w loci funkcjonalnych dla gatunków zagrożonych.

Publikacja 4

Kloch A, Wenzel MA, Laetsch DR, Michalski O, Bajer A, Behnke J, Welc-Falęciak R, Piertney SB. 2018. Signatures of balancing selection in toll-like receptor (TLRs) genes – novel insights from a free-living rodent. *Scientific Reports* 8: 8361

Praca powstała w ramach grantu NCN Opus 2012/07/B/NZ8/00058, którego byłam kierownikiem. Grant realizowałam w latach 2013-17 na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego.

Wstęp

Rola presji selekcyjnej ze strony pasożytów w kształtowaniu zmienności genetycznej w populacjach żywicieli została wyczerpująco zbadana w przypadku genów MHC, natomiast mechanizmy działające na inne elementy układu odpornościowego są znacznie słabiej poznane. W szczególności niewiele wiadomo na temat elementów odporności wrodzonej. Odporność wrodzona stanowi ewolucyjnie starszą gałąź układu odpornościowego, zapewniającą szybką, lecz mniej specyficzną reakcję przeciwko patogenom niż oparta o przeciwciała odpowiedź nabyta. Istotnym elementem odporności wrodzonej są receptory toll-podobne (TLR, toll-like receptor), które uczestniczą w rozpoznawaniu konserwowanych motywów pochodzących od patogenów jednokomórkowych (PAMP, pathogen-associated molecular patterns), takich jak np. glikoproteiny budujące ścianę komórkową bakterii. W badaniach klinicznych u człowieka wykazano związki punktowych polimorfizmów (SNP) w genach TLR z podatnością na takie choroby, jak gruźlica, cytomegalia, borelioza i zapalenie wątroby typu C (przegląd w Skevaki i in. 2015). Ostatnie badania potwierdziły występowanie takich zależności także u dzikożyjących ssaków (Tschirren i in. 2013, Gavan i in. 2015), jednak prace te ograniczały się do pojedynczych loci.

Zgodnie z zasadą Czerwonej Królowej, pasożyty przystosowują się do najczęstszych genotypów gospodarza i w rezultacie wartość przystosowawcza takiego genotypu maleje w czasie. Rzadkie allele z reguły „umykają” pasożytom i przez to ich częstość wzrasta do momentu, kiedy pasożyty zaczną się do nich przystosowywać. Skutkuje to zależnym od częstości doborem równoważącym, który – w tym kontekście – został potwierdzony w licznych pracach poświęconych genom MHC (przegląd w: Piertney i Oliver 2006). W innych niż MHC elementach układu odpornościowego dobór równoważący stwierdzono dotychczas jedynie u ludzi w TLR1, 6 i 10 (Ferrer-Admetlla i in. 2008) i w cytokinach u norników (Turner i in. 2011). Zdecydowana większość prac poświęconych ewolucji genów TLR wykazała dobór kierunkowy lub stabilizujący: dobór pozytywny stwierdzono u naczelnych (Własiuk i Nachman 2010) i wśród wybranych taksonów ssaków (Areal i in. 2011), u ptaków przeważał natomiast dobór stabilizujący (Alcaide i Edwards 2011). Ślady doboru pozytywnego zidentyfikowano również w TLR2 wśród gryzoni, przy czym obejmował on tylko część sekwencji kodującą fragment receptora odpowiedzialny za wiązanie PAMP, podczas gdy pozostała część sekwencji wykazywała raczej ślady doboru oczyszczającego (Tschirren i in. 2011). Poszczególne receptory w obrębie rodziny TLR różnią się pod względem prezentowanych motywów (PAMP), które można podzielić na cząsteczki pochodzenia bakteryjnego, wirusowego, lub pierwotniaczego. Wydaje się, że TLR „bakteryjne”

ewoluują szybciej i są bardziej zmienne niż TLR „wirusowe”, co tłumaczy się zmiennością i tempem ewolucji prezentowanych przez nie motywów (Fornuskowa i in. 2013).

Brak doniesień na temat doboru równoważącego w genach TLR może wynikać z faktu, że cytowane wyżej prace opierały się przede wszystkim na porównaniach międzygatunkowych, a więc obejmowały dużą skalę czasową. W takiej skali wykrycie doboru równoważącego jest trudne, ponieważ jest on maskowany przez inne procesy (Charlesworth 2006, Vitti i in. 2013). Celem niniejszej pracy było więc zbadanie mechanizmów kształtujących zmienność receptorów TLR w małej skali czasowej i przestrzennej. W tym celu wykorzystano dwie populacje nornicy rudej różniące się pod względem presji ze strony pasożytów, w których wcześniej (Kloch i in. 2010) wykazano lokalny charakter zależności między frekwencją alleli MHC DRB a intensywnością zarażenia nicieniem *A. tetraaptera*.

Opierając się na wcześniejszych pracach dotyczących zmienności TLR2 spodziewano się znaleźć związek poszczególnych alleli z odpornością na infekcje, a także spodziewano się różnic w poziomie zmienności między poszczególnymi loci. Zgodnie z hipotezą Fornuskowej i in. (2013) oczekiwano różnic w tempie ewolucji między TLR „bakteryjnymi” i „wirusowymi”.

Wyniki

Za pomocą sekwencjonowania na platformie Illumina MiSeq uzyskano sekwencje siedmiu amplikonów (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 9) obejmujących w sumie około 15kB. Amplikony obejmowały od niemal 50 do prawie 100% sekwencji kodujących, co daje dobre odzwierciedlenie ogólnej zmienności w tych genach. Wśród sekwencji pochodzących od 90 osobników nornicy rudej zidentyfikowano 177 punktowych polimorfizmów (SNP) i dwie delecje (2-bp w TLR 5 i 3-bp w TLR4). Delecja w TLR5 powodował przesunięcie ramki odczytu i powstanie przedwczesnego kodonu stop w pozycji 379.

Badane loci różniły się znacznie pod względem zmienności, przy czym TLR „wirusowe” (TLR7 i TLR9) odznaczały się z reguły niższą zmiennością niż TLR „bakteryjne”. Dla przykładu, w najbardziej zmiennych TLR1 i TLR2 stwierdzono ponad 20 miejsc polimorficznych na 1000bp sekwencji, natomiast w najmniej zmiennym TLR 7 wartość ta wynosiła tylko 1,7 (Tabela 2). Podobne różnice występowały pod względem liczby alleli (haplotypów). Najwięcej haplotypów stwierdzono w TLR2, najmniej (poniżej 10) w TLR7 i TLR9. Wszystkie loci oprócz TLR7 wykazywały wysoką różnorodność haplotypów, która była zbliżona do 0,8, znacznie różnice wykazano natomiast w przypadku różnorodności nukleotydowej.

Tabela 2. Podsumowanie zmienności badanych loci. Podano długość zsekwencjonowanego fragmentu oraz procent, jaki długość ampliconu stanowiła względem całkowitej sekwencji kodującej danego genu (%). S/1000bp – liczba miejsc polimorficznych na 1000bp, h – liczba haplotypów, Hd – różnorodność haplotypów, p – różnorodność nukleotydyowa w przeliczeniu na jedno miejsce (zasadę).

locus	długość (bp)	%	S/1000bp	h	Hd	p x 10 ³
TLR1	1126	47.2	21.31	16	0.851	5.67
TLR2	2351	99.9	24.25	32	0.804	3.80
TLR4	2162	86.3	9.71	16	0.771	1.25
TLR5	2260	86.3	17.3	19	0.837	3.28
TLR6	1234	51.0	16.21	12	0.811	4.43
TLR7	2948	93.6	1.7	6	0.347	0.13
TLR9	2962	95.8	3.71	9	0.753	1.14

Wnioskowanie o doborze działającym na badane loci w małej skali czasowej może opierać się na dwóch rodzajach analiz: pierwszą są testy neutralności, porównujące spektrum częstości alleli z rozkładem oczekiwanym przy założeniu braku kierunkowych sił ewolucyjnych, druga opiera się natomiast na wykazaniu istotnych statystycznie zależności między występowaniem określonych haplotypów i podatnością na infekcje. W niniejszej pracy zastosowano obydwie te podejścia, dzięki czemu uzyskane wyniki zyskały na sile.

W trzech loci (TLR4, 7 i 9) stwierdzono istotne odchylenie od równowagi Hardego-Weinberga (Tabela 3), przy czym w TLR4 stwierdzono nadmiar heterozygot, a w TLR7 i 9 nadmiar homozygot. Test D Fu i Li, który jest znacznie mniej wrażliwy na procesy demograficzne niż test D Tajimy, wykazał istotne odejście od neutralności w TLR 2 i TLR5. Wartość $D > 0$ wskazuje na nadmiar alleli średniej częstości, co sugeruje dobór równoważący. Z kolei w TLR9 istotny wynik testu McDonalda-Kreitmana wskazuje nadmiar podstawień synonimowych, co sugeruje dobór oczyszczający. Dodatkowo obliczono statystyki D stosując technikę „przesuwanego okna” (*sliding window*). Wybrano okno wielkości 60bp i przesunięciu 20bp, co odpowiada średniej wielkości motywów bogatych w leucynę (LRR, leucine-rich repeats), które budują istotne funkcjonowanie obszary białka TLR czyli miejsca wchodzące w interakcje z PAMP lub innym elementami układu odpornościowego. W TLR1 i TLR2 wykryto obszary z $D > 0$ z $p < 0,05$. Takie obszary znaleziono również w TLR5 i TLR6, ale istotność statystyczna D była wyższa ($0,05 < p < 0,1$).

Nadmiar alleli średniej częstości, wskazany przez $D > 0$, może wynikać z doboru równoważącego, ale także ze zmian wielkości populacji. Wpływ procesów demograficznych powinien być jednakowo widoczny we wszystkich loci, natomiast w niniejszej pracy nie uzyskano takiego obrazu. Ponadto współczynnik F_{st} różnił się znacznie między loci TLR, przyjmując wartości od 0,01 w TLR4, co wskazuje na swobodny przepływ genów, do ponad 0.3 w TLR9, co

sugeruje izolację populacji. Jeżeli frekwencja alleli TLR wynikałaby z procesów demograficznych, współczynniki Fst w każdym locus powinny być podobne. Dla porównania, zróżnicowanie w loci neutralnych w tych samych populacjach wynosiło 0,072, co wskazuje na umiarkowane zróżnicowanie populacji (Kloch i in. 2010). Rozbieżności między loci sugerują, że różnice frekwencji alleli genów TLR w badanych populacjach przypisać należy raczej działaniu doboru niż demografii i procesom neutralnym (Turner i in. 2012). Podobne zróżnicowane struktury populacji w strukturze populacji w loci neutralnych i TLR2 opisano u nornicy rudej w Szwecji i wynik ten zinterpretowano jako skutek doboru ze strony pasożytów (Tschirren i in. 2012).

Tabela 3. Wartości współczynników Fst, wartość p testu odchylenia od równowagi Hardego-Weinberga (HWE), oraz wartości statystyk trzech testów neutralności: D Tajimy, D Fay i Li oraz wartość NI testu McDonalda-Kreitmana. Gwiazdkami oznaczono poziomy istotności: *** p<0.001, ** p<0.1, * p<0.05). Istotne wyniki wyszczególniono tłustym drukiem.

	Fst	HWE	Testy neutralności		
			D Tajimy	D Fu & Li	test McDonalda-Kreitmana (NI)
TLR1	0.0998 ***	0.099	1.424	0.115	0.768
TLR2	0.0569 ***	0.784	-0.267	1.089 *	1.469
TLR4	0.0166 *	0.017	-0.744	-0.128	0.641
TLR5	0.1174 ***	0.958	0.254	1.841 *	1.070
TLR6	0.0662 ***	0.410	1.331	1.297	0.609
TLR7	0.1069 ***	<0.001	-1.118	-0.136	2.193
TLR9	0.3833 ***	0.027	1.813	0.678	0.138 *

Wykorzystując ogólne modele liniowe (GLM) wykryto istotny związek występowania haplotypów TLR1*aa10 i TLR5*aa02 z podatnością na zarażenie *Bartonella* sp., bakterią pasożytującą w krwi. Ponieważ w tej części pracy ważna była zmienność funkcjonalna receptorów TLR, do analiz użyto alleli aminikwasowych zamiast sekwencji nukleotydowych. Nornice z allelem TLR1*aa10 były trzy razy częściej zarażone bakteriami *Bartonella* niż zwierzęta bez tego allelu (33 vs 11,7%, $\chi^2=10,61$, wartość p z poprawką na wielokrotne porównania p=0,024), podobnie – częstsze infekcje stwierdzono u osobników z allelem TLR5*aa02 (41,2 vs. 26,8%, $\chi^2=7,47$, p z poprawką = 0,066). Co ciekawe, zwierzęta posiadające allel TLR5*aa02 były znacznie rzadziej niż pozostałe zarażone niciem *A. tetraptera* (5,8% vs. 27,7%, p=0,019), jednak wynik ten nie był istotny po zastosowaniu poprawki na wielokrotne porównania.

Znaczenie wyników

Zgodnie z przewidywaniami w niniejszej pracy stwierdzono różnice w zmienności między badanymi loci, przy czym TLR prezentujące PAMP wirusowe odznaczały się niższym polimorfizmem niż pozostałe loci. Wbrew wcześniejszym doniesieniom, w loci „bakteryjnych” znaleziono ślady doboru równoważącego wynikającego z presji ze strony pasożytów, co potwierdzono stosując dwa rodzaje analiz: testy neutralności i badanie związków alleli z zarażeniem.

Praca jest pierwszym doniesieniem pokazującym, że w dzikożyjących populacjach niezagrażonego, pospolitego gatunku dobór równoważący utrzymuje zmienność genów TLR stanowiących element odporności wrodzonej. U ssaków dobór równoważący w innych niż MHC loci dotychczas opisano tylko u ludzi (Ferrer-Admetlla i in. 2008) oraz w populacjach, które przeszły przez wąskie gardło, a więc pozostają pod silnym działaniem dryfu i innych procesów demograficznych zmieniających frekwencję alleli (Grueber et al. 2013, Quéméré i in. 2015). Uzyskany w niniejszej pracy wynik odbiega od dotychczasowych rezultatów pokazujących, że geny TLR pozostają pod wpływem doboru stabilizującego lub kierunkowego. Przyczyną tej rozbieżności jest skala prowadzonych badań: w dużej skali czasowej lub przestrzennej trudno jest wykryć dobór równoważący z kilku powodów. Po pierwsze, zmienność pasożytów zależy od rozpatrywanej skali – w dużej skali geograficznej lokalne populacje żywicieli mogą być wystawione na działanie innego spektrum gatunkowego pasożytów, podczas gdy w skali lokalnej w grę wchodzi subtelniejsze różnice skutkujące doбором równoważącym np. różnice w antygenowości pasożytów. Po drugie, ślady doboru równoważącego nie pozostają w genomie widoczne przez długi czas, w przeciwieństwie do doboru kierunkowego (Charlesworth 2006). **Niniejsza praca podkreśla więc znaczenie skali czasowej i przestrzennej skalę prowadzonych analiz dla wnioskowania o charakterze doboru działającego na geny odporności.**

Podsumowanie

Moje osiągnięcie habilitacyjne poświęcone było wyjaśnieniu zależności między zmienną w czasie i przestrzeni presją ze strony pasożytów a zmiennością genów kodujących elementy układu odpornościowego u dzikożyjących ssaków. Wykazałam, że:

- W populacji nicieni stanowiących najczęstsze pasożyty nornicy rudej proporcja płci jest przechylona na stronę samic, oraz występuje nadreprezentacja infekcji złożonych tylko z

jednej płci. Zaproponowano mechanizm tłumaczący to zjawisko, oparty na unikaniu kojarzenia krewniaczego przez niczenie, dzięki czemu mogą zachować wysoką zmienność zapewniającą potencjał ewolucyjny umożliwiający powstawanie przystosowań pozwalających ominąć mechanizmy obronne żywicieli zgodnie z dynamiką Czerwonej Królowej.

- Zarażenie pasożytami krwi, ale nie pasożytami jelitowymi, zmniejsza przeżywalność zimową u nornika północnego, natomiast obecność allelu MHC zapewniającego odporność na zarażenie zwiększa szanse przeżycia zimy. W pracy tej bezpośrednio wykazałam, że występowanie alleli MHC związanych z odpornością na infekcje ma znaczenie przystosowawcze.
- W małych, izolowanych populacjach w krótkim czasie może dojść do znacznej zmiany zarażenia pasożytami, czemu towarzyszy zmiana frekwencji alleli genów odporności i wykształcenie nowych związków między występowaniem alleli a zarażeniem. W ten sposób pokazałam znaczenie zmienności w loci odporności dla gatunków zagrożonych.
- Geny TLR, stanowiące element starszej ewolucyjnie niż MHC odporności wrodzonej, podobnie jak MHC podlegają doborowi równoważącemu ze strony pasożytów, jednak efekt ten jest dobrze widoczny w małej skali przestrzennej i czasowej.

Bibliografia

Acevedo–Whitehouse K, Gulland F, Greig D, Amos W (2003) Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* 422: 35.

Aguilar A, Roemer G, Debenham S, Binns M, Garcelon D, Wayne RK (2004) High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3490–3494.

Alcaide, M, Edwards, S.V. (2011) Molecular evolution of the Toll-like receptor multigene family in birds. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 1703-15.

Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK (1997) The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Crit Rev Immunol*, 17: 179–224.

Areal, H, Abrantes, J, Esteves, P.J. (2011). Signatures of positive selection in Toll-like receptor (TLR) genes in mammals. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 368.

Babik W, Durka W, Radwan J (2005) Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Mol Ecol* 14: 4249– 4257.

Bajer A, Behnke JM, Pawelczyk A, Kuliś, K, Sereda, MJ, Siński, E, (2005) Medium–term temporal stability of the helminth component community structure in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 130, 213–228.

Behnke, J.M, Barnard, C.J, Bajer, A, Bray, D, Dinmore, J, Frake, K, Osmond, J, Race, T, Sinski, E, 2001b. Variation in

- the helminth community structure in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from three comparable localities in the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 123, 401–414.
- Bernatchez L, Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years. *J Evol Biol* 16: 363–377.
- Biedrzycka A, Kloch A., Buczek M, Radwan J. (2011). Major histocompatibility complex DRB genes and blood parasite loads in fragmented populations of the spotted suslik *Spermophilus suslicus*. *Mammalian Biology* 76: 672-677.
- Burthe S, Telfer S, Begon M, Bennett M, Smith A, Lambin X (2008) Cowpox virus infection in natural field vole *Microtus agrestis* populations: significant negative impacts on survival. *J Anim Ecol* 77:110–119
- Charlesworth, D. (2006). Balancing Selection and Its Effects on Sequences in Nearby Genome Regions. *PLoS Genetics*, 2, e64.
- Coltman DW, Pilkington J, Kruuk LEB, Wilson K, Pemberton JM (1999) Positive genetic correlation between parasite resistance and body size in a free-living ungulate population. *Evolution* 55: 1259–1267.
- Edwards AWF (1998). Natural Selection and the Sex Ratio: Fisher's Sources. *Am. Nat.* 151, 564–56.
- Eizaguirre C, Lenz T,L, Kalbe M, Milinski M. 2012. Rapid and adaptive evolution of MHC genes under parasite selection in experimental vertebrate populations. *Nat Commun* 3: 621.
- Ferrer-Admetlla, A, Bosch, E, Sikora, M, Marquès-Bonet, T, Ramírez-Soriano, A, Muntasell, A, Navarro, A, Lazarus, R, Calafell, F, Bertranpetit, J, Casals F. (2008). Balancing Selection Is the Main Force Shaping the Evolution of Innate Immunity Genes. *Journal of Immunology*, 181, 1315-1322.
- Fornusková, A, Vinkler, M, Pagès, M, Galan, M, Joussetin, E, Cerqueira, F, Morand, S, Charbonnel, N, Bryja, J, Cosson J-F. (2013). Contrasted evolutionary histories of two Toll-like receptors (Tlr4 and Tlr7) in wild rodents (MURINAE). *BMC Evolutionary Biology*, 13, 194
- Fuller CA, Blaustein R (1996) The effect of the intestinal parasite *Eimeria arizonensis* on survival of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) in natural and semi-natural populations. *Ecology* 77: 2196-2202.
- Gavan, M.K, Oliver, M, Douglas, A, Piertney, S.B. (2015). Gene dynamics of toll-like receptor 4 through a population bottleneck in an insular population of water voles (*Arvicola amphibius*). *Conservation Genetics*, 16, 1181-1193.
- Grueber, C, Wallis, GP, Jamieson, I. (2013). Genetic drift outweighs natural selection at toll-like receptor TLR immunity loci in a re-introduced population of a threatened species. *Mol. Ecol.* 22:4470–4482.
- Gulland FMD, Fox M (1992) Epidemiology of nematode infection of Soay sheep (*Ovis aries* L.) on St. Kilda. *Parasitology* 105:481–492
- Haukisalmi, V, Henttonen, H, Vikman, P, 1996. Variability of sex ratio, mating probability and egg production in an intestinal nematode in its fluctuating host population. *Int. J. Parasitol.* 26, 755–764.
- Hudson P.J. 1986. The effect of a parasitic nematode on the breeding production of red grouse. *J. Anim. Ecol.* 55: 85-91
- Jepson A, Banya W, Sisay-Joof F, Hassan-King M, Nunes C, Bennett S, Whittle H. (1997). Quantification of the relative contribution of major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes to human immune responses to foreign antigens. *Infections and Immunity*, 65, 872-876.
- Kloch A. 2010. Geny głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC) klasy II, pasożyty i struktura populacji u dwóch gatunków gryzoni – nornicy rudej *Myodes glareolus* i susła perełkowanego *Spermophilus suslicus*. Praca doktorska.
- Kloch, A, Babik W, Bajer, A, Siński, E, Radwan J. (2010). Effects of an MHC-DRB genotype and allele number on the load of gut parasites in the bank vole *Myodes glareolus*. *Molecular Ecology*, 19 Suppl 1, 255–265.
- Mainguy J, Worley K, Côté SD, Coltman DW (2007) Low MHC DRB class II diversity in the mountain goat: past bottlenecks and possible role of pathogens and parasites. *Conserv Genet* 8: 885–891.
- May, R.M, Woolhouse, M.E.J, (1993). Biased sex ratios and parasite mating probabilities. *Parasitology* 107, 287–295.
- McCallum H, Barlow N, Hone J (2001) How should pathogen transmission be modelled? *Trends Ecol Evol* 16: 295–300.

- McCallum H, Dobson A (2002) Disease, habitat fragmentation and conservation. *Proc Biol Soc Lond B*, 269: 2041–9
- Mierzejewska EJ, Alsarraf M, Behnke JM, Bajer A. (2015) The effect of changes in agricultural practices on the density of *Dermacentor reticulatus* ticks. *Vet Parasitol* 211:259-65
- Moss R, Trenholm I.B, Watson A, Parr, R. (1990). Parasitism, predation and survival of hen red grouse *Lagopus* in spring. *J. Anim. Ecol.* 59: 631-642.
- Murray DL, Keith LB, Cary JR (1996) The effect of anthelmintic treatment on the parasite burden of snowshoe hares. *Can J Zool* 74: 1604-1611
- Paterson S, Wilson K, Pemberton JM (1998) Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3714–3719
- Pedersen AB, Babayan SA. (2011) Wild immunology. *Mol Ecol.* 20: 872-80
- Piertney SB, Oliver MK (2006) The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* 96, 7–21.
- Quéméré, E, Galan, M, Cosson, J, Klein, F, Aulagnier, S, Gilot-Fromont, E, Merlet, J, Bonhomme, M, Hewison, A.J, Charbonnel, N. (2015). Immunogenetic heterogeneity in a widespread ungulate, the European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Mol. Ecol.* 24:3873-3887.
- Radwan J, Biedrzycka A, Babik W. (2010). Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? *Biol Cons* 143: 537-544.
- Schaschl H, Suchentrunk F, Morris DL, Ben Slimen H, Smith S, Arnold W (2012) Sex-specific selection for MHC variability in Alpine chamois. *BMC Evol Biol* 12:20
- Scott M.E, Dobson. A. 1989. The role of parasites in regulating host abundance. *Parasitology Today* 5: 176-183
- Skevaki, C, Pararas, M, Kostelidou, T, Tsakris, A, Ooutsias, J.G. (2015) Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 180, 165-77.
- Sommer S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology* 2:16.
- Sousa WP, (1994). Patterns and processes in communities of helminth parasites. *Trends Ecol. Evol.* 9, 52–57.
- Spurgin LG, Richardson DS (2010) How pathogens drive genetic diversity: MHC mechanisms and misunderstandings. *Proc R Soc B* 277:979–988
- Stien, A, Halvorsen, O, Leinaas, H.-P, (1996). Density- dependent sex ratio in *Echinomermella matsi* (Nematoda) a parasite of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Parasitology* 112, 105–112.
- Tarasovskaya, N.E, 2008. Sizes and sex ratio indices of inter- and intraspecific relationship of the nematodes from murine rodents. *Parazitologija* 46, 517–525, Russian with English summary.
- Telfer S, Lambin X, Birtles R, Beldomenico P, Burthe S, Paterson S, Begon M. (2010). Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science*, 330: 243-246.
- Tschirren, B, Andersson, M, Scherman, K, Westerdahl, H, Mittl, P.R, Raberg, L. (2013). Polymorphisms at the innate immune receptor TLR2 are associated with *Borrelia* infection in a wild rodent population. *Proceeding of the Royal Society B*, 280, 20130364.
- Tschirren, B, Andersson, M, Scherman, K, Westerdahl, H, Råberg, L. (2012). Contrasting patterns of diversity and population differentiation at the innate immunity gene toll-like receptor 2 (TLR2) in two sympatric rodent species. *Evolution*, 66, 720-31.
- Tschirren, B, Råberg, L, Westerdahl H. (2011) Signatures of selection acting on the innate immunity gene Toll-like receptor 2 (TLR2) during the evolutionary history of rodents. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 1232-40.
- Turner, A.K, Begon, M, Jackson, J.A, Bradley, J.E, Paterson, S. (2011). Genetic Diversity in Cytokines Associated with Immune Variation and Resistance to Multiple Pathogens in a Natural Rodent Population. *PLoS Genetics*, 7, e1002343.
- Turner, A.K, Begon, M, Jackson, J.A, Paterson, S. (2012). Evidence for selection at cytokine loci in a natural population of field voles (*Microtus agrestis*). *Molecular Ecology*, 21, 1632-46.

Vitti, J.J, Grossman, S.R, Sabeti, P.C. (2013). Detecting natural selection in genomic data. *Annual Review in Genetics*, 47: 97-120.

Wlasiuk, G, Nachman, N.W. (2010). Adaptation and constraint at Toll-like receptors in primates. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 2172-86.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza publikacjami wchodzącymi w skład osiągnięcia habilitacyjnego, jestem współautorem 11 prac oryginalnych, które omówiono poniżej z podziałem na zakresy tematyczne. Gwiazdką oznaczono prace, w których pełniłam rolę autora korespondencyjnego.

sumaryczny IF: 25,179

liczba punktów MNISW: 320

liczba cytowań: 280

Ewolucja genów głównego układu zgodności tkankowej (MHC)

1. Biedrzycka A, **Kloch A.**, Buczek M, Radwan J. 2011. Major histocompatibility complex DRB genes and blood parasite loads in fragmented population of the spotted suslik *Spermophilus suslicus*. *Mammalian Biology* 76: 672-677.

Publikacja zawierała materiał z rozprawy doktorskiej.

2. **Kloch A.**, Babik W., Bajer A., Siński E., Radwan J. 2010. Effects of an MHC-DRB genotype and allele number on the load of gut parasites in the bank vole *Myodes glareolus*. *Molecular Ecology* 19 (Suppl. 1), 255–265.

Publikacja zawierała materiał z rozprawy doktorskiej.

3. Radwan J., Tkacz A., **Kloch A.** 2008. MHC and preference for male odour in the bank vole. *Ethology*, 114: 827-833

Geny głównego układu zgodności tkankowej należą do najbardziej zmiennych loci kręgowców, a przyczyną tak wysokiego polimorfizmu wydaje się presja ewolucyjna ze strony pasożytów. W ramach doktoratu zajmowałam się badaniami związków genotypu MHC z podatnością na zarażenie pasożytami u dzikożyjących gryzoni: nornicy rudej oraz susła perełkowanego. Nornica ruda jest gatunkiem występującym powszechnie, w przeciwieństwie do zagrożonego susła żyjącego w silnie izolowanych populacjach. Wyniki dotyczące nornicy rudej opublikowano w pracy Kloch et al. (2010). Głównym osiągnięciem było wykazanie, że zależności między genotypem MHC a podatnością na infekcje mają charakter lokalny – allel związany w jednej populacji z mniejszą intensywnością zarażenia nicieniem *A. tetraptera* w innej występował częściej u osobników silnie zarażonych. Pokazuje to, że koewolucja pasożyt-żywiciel nie jest procesem globalnym, ale jest kształtowana przez lokalne uwarunkowania.

Geny MHC są wykorzystywane w biologii konserwatorskiej jako marker potencjalnej zdolności zagrożonego gatunku do zwalczania infekcji, co ma istotne znaczenie przy określaniu kondycji zagrożonego gatunku i planowaniu działań ochronnych. W pracy Biedrzycka i in. 2011 określono związki między polimorfizmem w genach MHC a podatnością na pasożyty w czterech populacjach susła z krańca zasięgu tego gatunku. Żaden z badanych alleli nie wpływał istotnie na ryzyko infekcji, ale wykryto słaby związek pomiędzy osobniczą heterozygotycznością w loci neutralnych a intensywnością infekcji jednokomórkowymi pasożytami *Cryptosporidium* i *Haemobartonella*. Chociaż w pracy nie udało się wykazać bezpośredniego związku pomiędzy utratą zmienności w locus MHC a podatnością na pasożyty, przedstawiono szereg dowodów pośrednich wskazujących, że niska zmienność genetyczna u tego gatunku może przyczyniać się do jego zwiększonej wrażliwości na zarażenie patogenami.

W czasie studiów doktoranckich uczestniczyłam również w projekcie poświęconym wyborowi partnera w oparciu o MHC u nornic, czego rezultatem była publikacja Radwan i in. 2008. Samice w estrus umieszczano w labiryncie Y, w którego ramionach znajdował się zapach od dwóch niespokrewnionych samców. Stwierdzono, że samice więcej czasu spędzały z zapachem samca niepodobnego pod względem MHC niż takiego, z którym miały wspólne allele.

Zmienność genetyczna wybranych grup pasożytów

1. **Kloch A***, Mierzejewska EJ, Karbowski G, Slivinska K, Alsarraf M, Rodo A, Kowalec M, Dwuznik D, Bajer A. 2017. Origin of recently emerged foci of the tick *Dermacentor reticulatus* in central Europe inferred from molecular markers. *Veterinary Parasitology* 15: 63-69
2. Biedrzycka A, **Kloch A***, Migalska M, Bielański W. 2013. Molecular characterization of putative Hepatozoon sp. from sedge warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*). *Parasitology* 140, 695-698.

W pracy Kloch i in. 2017 zajmowałam się filogeografią kleszcza łąkowego *Dermacentor reticulatus*, który jest wektorem groźnego dla psów pasożyta *Babesia canis*. Występowanie tego kleszcza w Europie obejmuje dwa obszary występowania, wschodni i zachodni. Rozdziela je obszar wolny od kleszczy, który przebiega przez środkową Polskę. W pracy porównano zmienność kleszczy ze wschodniego i zachodniego zasięgu i stwierdzono znacznie podobieństwo między zwierzętami w obrębie kraju, natomiast znaczne między Polską a Niemcami. Wyniki sugerują, że za migracje kleszczy w znacznej mierze związana jest mobilność psów ze swoimi właścicielami, a nie naturalne procesy dyspersji.

W pracy Biedrzycka i in. 2008 przeprowadziłam analizę filogenetyczną występującego u wodniczki pasożyta krwi, opisywanego wcześniej jako *Hepatozoon kabeeni*. Pasożyty wyizolowane z krwi rokitniczki nie wykazały podobieństwa do żadnego gatunku *Hepatozoon*, a poszczególne haplotypy wykazały znaczne podobieństwo do rodzaju *Lankesterella* oraz kładu złożonego z rodzajów *Caryospora* i *Eimeria*. Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze sugestie, że pozycja systematyczna ptasich pasożytów klasyfikowanych wcześniej jako *Hepatozoon* powinna zostać zweryfikowana.

Ekologia pasożytów u dzikożyjących żywicieli

1. Alsarraf M, Bednarska M, Mohallal EME, Mierzejewska EJ, Behnke-Borowczyk J, Zalat S, Gilbert F, Welc-Falęciak R, **Kloch A**, Behnke JM, Bajer A. 2016. Long-term spatiotemporal stability and dynamic changes in the haemoparasite community of spiny mice (*Acomys dimidiatus*) in four montane wadis in the St. Katherine Protectorate, Sinai, Egypt. *Parasites and Vectors* 9: 195
2. **Kloch A***, Bajer A. 2012. Natural infection with *Cryptosporidium* in the endangered spotted souslik (*Spermophilus suslicus*). *Acta Parasitologica* 71:13-19
3. **Kloch A.***, Bednarska M., Bajer A. 2005. Intestinal macro- and microparasites of wolf (*Canis lupus L.*) in north-eastern Poland recovered by coprological study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12: 237-245
4. **Kloch A.**, Bajer A. 2003. Helminty jelitowe wilków (*Canis lupus*) z południowej części Pojezierza Mazurskiego: badanie koproskopowe. *Wiadomości Parazytologiczne* 49 (3): 301-305

Prezentowane prace poświęcone były analizie występowania pasożytów u różnych gatunków dzikożyjących żywicieli. U kolcomyszy arabskiej (Alsarraf i in. 2017) w próbach zebranych na przestrzeni wielu lat stwierdzono wysokie zarażenie (75%) pasożytami krwi, wykazujące znaczne różnice między latami i powierzchniami badawczymi. U susła (Kloch i Bajer 2012) przeanalizowano zarażenie pierwotniakiem jelitowym *Cryptosporidium*, którego stwierdzono u 35% zwierząt z czterech populacji ze skrajnego zasięgu. Znacznie wyższe zarażenie występowało w populacjach zamieszkujących pastwiska, co wskazuje na możliwą drogę transmisji od bydła

Dwie prace poświęcone wilkom (Kloch i in. 2005, Kloch i Bajer 2003) stanowiły jeden z pierwszych w Polsce opisów występowania pasożytów jelitowych w odchodach wilków z NE Polski. Pasożyty stwierdzono w większości analizowanych odchodów, przy czym stwierdzono znaczne różnice w zarażeniu i składzie gatunkowym pasożytów między watahami. Wśród

zidentyfikowanych nicieni występowały potencjalnie niebezpieczne dla człowieka nicienie *Toxocara canis*, co biorąc pod uwagę znaczne rozmiary terytorium zajmowanego przez jedną watahę wskazuje na możliwą znaczną rolę wilków w rozprzestrzenianiu tych pasożytów.

Ekologia drapieżników

1. Jędrzejewski W, Niedziałkowska M, Hayward MW, Goszczyński J, Jędrzejewska B, Borowik T, Bartoń KA, Nowak S, Harmuszkiewicz J, Juszczak A, Kałamarz T, **Kloch A**, Koniuch J, Kotiuk K, Mysłajek RW, Nędzyńska M, Olczyk A, Teleon M, Wojtulewicz M. 2012. Prey choice and diet of wolves related to ungulate communities and wolf subpopulation in Poland. *Journal of Mammalogy*, 93(6):1480–1492

W publikacji wykorzystano materiał stanowiący podstawę mojej pracy magisterskiej.

Wilki na nizinach w Polsce można podzielić na trzy odrębne genetycznie grupy, które nie krzyżują się ze sobą mimo braku fizycznych barier. W pracy przeanalizowano różnice w diecie tych trzech grup w kontekście lokalnych różnic w składzie gatunkowym dostępnych ofiar, w szczególności kopytnych. We wszystkich grupach wilki wykazywały preferencję wobec jeleni, unikały dzików, natomiast sarny były zabijane proporcjonalnie do ich liczebności. Wykazano także preferencję względem większych ofiar. Stwierdzono różnice w składzie diety między odrębnymi genetycznie subpopulacjami wilków, mimo niewielkich różnic w składzie gatunkowym kopytnych na tych terenach. W Polsce północno-wschodniej wilki polowały na jelenie, a także sarny, dziki, bobry i łosie. We wschodniej Polsce w diecie dominowały sarny, natomiast w Polsce południowo-wschodniej zaobserwowano wysoką selektywność wobec jeleni. Wyniki wskazują, że podział populacji pod względem genetycznym może być skutkiem specjalizacji pokarmowej.

Ekologia ptaków terenów rolniczych

1. Sanderson F.J., **Kloch A.**, Sachanowicz K., Donald P.F. 2008. Predicting the effects of agricultural change on farmland bird populations in Poland. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 129: 37-42

Praca powstała w ramach badań prowadzonych w Ogólnopolskim Towarzystwie Ochrony Ptaków i dotyczyła prognozowania zmian składu awifauny terenów rolniczych w kontekście przystąpienia Polski do Unii Europejskiej. W Europie zachodniej, na skutek intensyfikacji rolnictwa

związanej między innymi z wdrożeniem Wspólnej Polityki Rolnej, zaobserwowano istotny spadek różnorodności gatunkowej ptaków związanych z terenami rolnymi. Celem pracy było opracowanie narzędzi statystycznych, pozwalających na prognozowanie, w jakim stopniu intensyfikacja rolnictwa zagraża ptakom terenów rolnych na terenie Polski. W tym celu porównano bogactwo gatunkowe w 180 kwadratach o powierzchni 1km^2 zlokalizowanych w sześciu regionach kraju różniących się pod względem intensywności i sposobu uprawy ziemi. Zmienną środowiskową o najsilniejszym wpływie na różnorodność gatunkową była długość granicy lasów graniczących z terenami uprawnymi. Najwięcej gatunków ptaków terenów rolnych stwierdzano na powierzchniach, gdzie uprawy zbóż stanowiły ok. 30% powierzchni. Wyniki pokazały, że dla zachowania różnorodności gatunkowej ptaków istotny jest mozaikowy krajobraz oraz unikanie upraw wielkopowierzchniowych.

A Kloch