

1. Imię i nazwisko: Sebastian Hofman**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

Magister biologii, studia ukończone w 1997 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego, na podstawie rozprawy: „Analiza sprzężeń allozymów u mieszańców kumaków”. Promotor pracy magisterskiej: Prof. dr hab. Jacek M. Szymura.

Doktor nauk biologicznych - tytuł uzyskany w 2002 roku na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego na podstawie rozprawy doktorskiej: „Przepływ genów w obrębie strefy mieszańcowej kumaków”. Promotor: Prof. dr hab. Jacek M. Szymura, recenzenci: Prof. dr hab. Jan Rafiński oraz Prof. dr hab. Tadeusz Sywula.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2002 – 2006 Asystent w Zakładzie Anatomii Porównawczej Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

od 2006 Adiunkt w Zakładzie Anatomii Porównawczej Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

4. Wskazanie osiągnięcia naukowego 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**

Zastosowanie DNA mitochondrialnego do analiz zagadnień ewolucyjnych u wybranych grup płazów.

b) Dorobek wchodzący w skład osiągnięcia naukowego

1. **Hofman S.**, Szymura J.M. 2007. Limited mitochondrial DNA introgression in a *Bombina* hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 295-306.

(IF = 2,368, MNiSW = 20 pkt., cyt. = 13)

2. **Hofman S.**, Spolsky C., Uzzell T., Cogălniceanu D., Babik W., Szymura J.M. 2007. Phylogeography of the fire-bellied toads *Bombina*: independent Pleistocene histories inferred from mitochondrial genomes. *Molecular Ecology* 16: 2301-2316.

(IF = 5,169, MNiSW = 40 pkt., cyt. = 50)

3. **Hofman S.**, Pabijan M., Dziewulska-Szwajkowska D., Szymura J.M. 2012. Mitochondrial genome organization and divergence in hybridizing central European water frogs of the *Pelophylax esculentus* complex (Anura, Ranidae). *Gene* 491: 71-80.

(IF = 2,196, MNiSW = 20 pkt., cyt. = 4)

4. **Hofman S.**, Pabijan M., Osikowski A., Szymura J.M. 2014. Complete mitochondrial genome of the Greek marsh frog *Pelophylax cretensis* (Anura, Ranidae). *Mitochondrial DNA*, DOI: 10.3109/19401736.2014.974158.

(IF = 1,701, MNiSW = 15 pkt., cyt. = 0)

5. **Hofman S.**, Pabijan M., Osikowski A., Litvinchuk S.N., Szymura J.M. 2015. Phylogenetic relationships among four new complete mitogenome sequences of *Pelophylax* (Amphibia: Anura) from the Balkans and Cyprus. *Mitochondrial DNA*, DOI: 10.3109/19401736.2015.1025266.

(IF = 1,701, MNiSW = 15 pkt., cyt. = 0)

Razem: IF = 13,135, MNiSW = 110 pkt., cyt. = 67

IF podano według danych z roku publikacji, punkty MNiSW podano według danych z roku 2015, liczba cytowań według Web of Science z dnia 10.05.2015.

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

Mitochondrialny DNA (mtDNA) stał się już dawno modelową cząsteczką wykorzystywaną w biologii ewolucyjnej, systematyce i biologii konserwatorskiej. MtDNA jest skutecznym markerem molekularnym używanym w analizach, zarówno na poziomie wewnątrz jak i między gatunkowym. Wykorzystywany jest w wielu badaniach, takich jak analiza pokrewieństw filogenetycznych, biogeografia, analiza hybrydyzacji oraz inne badania wykorzystujące markery molekularne. Cząsteczka ta jest często używana w badaniach filogenetycznych i filogeograficznych dla wielu organizmów, a pomimo jej wyjątkowych właściwości (np. rzadka rekombinacja, dziedziczenie matczyne) analizy z wykorzystaniem mtDNA dają zazwyczaj wyniki zbieżne z analizami wykorzystującymi inne markery, takie jak geny jądrowe. Szybkie tempo ewolucji oraz szybkie tempo utrwalania wariantów w skali lokalnej, będące głównie wynikiem dryfu genetycznego, powodują, że pomimo pewnych ograniczeń, mtDNA jest ciągle podstawowym źródłem danych dla badań filogenetycznych na różnych poziomach taksonomicznych.

Płazy należą do klasycznych organizmów wykorzystywanych do badań biogeograficznych i testowania różnorodnych hipotez w tej dziedzinie. Dwie grupy spośród płazów zasługują na szczególną uwagę. Pierwszą stanowią siostrzane gatunki kumaków europejskich, kumak nizinny (*Bombina bombina*) i górski (*B. variegata*), tworzące mieszańce międzygatunkowe i formujące trwałą strefę mieszańcową, która stanowi doskonałą okazję do badań nad długoterminowymi efektami hybrydyzacji i rekombinacji, rozbijających koadaptowane kombinacje genów. Proces ten w oczywisty sposób ułatwia introgresję genów i przeciwdziała procesom prowadzącym do wzrostu zróżnicowania. Drugą interesującą grupą płazów są europejskie gatunki żab zielonych z rodzaju *Pelophylax*. Dwa gatunki: *P. lessonae* i *P. ridibundus* tworzą w środkowej Europie mieszańce (*P. esculentus*), które wykazują, w wyniku hybrydogenezy, półklonalny sposób dziedziczenia. Płazy te stwarzają możliwość analiz mtDNA w kontekście introgresji i działania doboru naturalnego. Z drugiej strony gatunki *Pelophylax* żyjące na niewielkim obszarze (np. *P. epeiroticus*, *P. kurtmuelleri* oraz *P. shqipericus*) pozwalają na badania nad wydarzeniami ewolucyjnymi w skali lokalnej. Wyjątkowe są tutaj gatunki wyspowe (takie jak *P. cretensis* i *P. cypriensis*), których dywergencja może stanowić jeden z punktów kalibracyjnych zegara molekularnego.

Głównym kierunkiem moich zainteresowań naukowych były analizy mtDNA na wielu poziomach pozwalające rozwiązać różnorodne zagadnienia ewolucyjne. Po pierwsze analizowałem rozmieszczenie typów mitochondrialnych w strefach mieszańcowych kumaków, w celu znalezienia śladów introgresji mtDNA na tło genetyczne innego gatunku. W szerszym aspekcie ewolucji mtDNA *Bombina*, badałem filogenezę i filogeografię wszystkich gatunków i podgatunków kumaków w Europie, na podstawie sekwencji fragmentu mitochondrialnego cytochromu b. Badania tego typu, wśród wielu aspektów ewolucyjnych, mogą wyjaśnić pokrewieństwa filogenetyczne, zmiany biogeograficzne i demograficzne oraz naświetlić wydarzenia ewolucyjne na poziomie populacji. W końcowym etapie zająłem się analizami pełnych sekwencji genomów mitochondrialnych dla żab zielonych. Tego typu badania mają ogromne znaczenie porównawcze, oraz pozwalają m. in. na otrzymanie bardzo dobrze potwierdzonych drzew filogenetycznych.

Strefy mieszańcowe pomiędzy zróżnicowanymi genetycznie populacjami stwarzają unikatową możliwość do badań nad dynamiką mtDNA. W strefach tych haplotypy mtDNA mogą znajdować się na różnym tle genetycznym genów jądrowych, a także ich częstość może zmieniać się wzdłuż różnych siedlisk. Strefy mieszańcowe pozwalają również analizować długoterminowe efekty hybrydyzacji i rekombinacji, które rozbijają kompleksy koadaptowanych genów i mogą doprowadzić do introgresji i zmniejszania różnorodności genetycznej. Dwa europejskie gatunki kumaków tworzą mieszańce w wąskiej, ale stabilnej, strefie mieszańcowej, utrzymywanej dzięki równowadze pomiędzy doborem naturalnym i dyspersją osobników (Szymura 1993). Silne korelacje pomiędzy różnymi cechami, a także nierównowaga genetyczna pomiędzy niesprzężonymi loci allozymatycznymi, wskazują, że w transektach poprzez strefy mieszańcowe w Polsce, dobór naturalny przeciwko mieszańcom międzygatunkowym działa na dużą liczbę loci, które są mniej lub bardziej równomiernie rozrzucone w genomie kumaków (Szymura i Barton 1986; 1991). Strefa mieszańcowa działa więc jak bariera przeciwdziałająca introgresji genów sprzężonych z fragmentami chromosomów, na które działa dobór naturalny. MtDNA, dzięki umiejscowieniu w cytoplazmie, może być uwolniony od takich fizycznych zależności i może ulegać łatwiejszej introgresji w porównaniu do loci jądrowych (Chan i Levin 2005).

W celu porównania zróżnicowania i rozprzestrzenienia wariantów mtDNA w stosunku do genów jądrowych, sprawdziliśmy założenia teorii klinalnej w dwóch transektach poprzez strefę mieszańcową kumaków w południowej Polsce: w okolicach Krakowa oraz Przemyśla (Hofman i Szymura 2007). Genotypy wszystkich osobników zostały wstępnie określone na

podstawie sześciu niesprzężonych, diagnostycznych loci allozymatycznych. Następnie dla wszystkich osobników określono typ mtDNA (*bombina* lub *variegata*), za pomocą nowo opracowanej, stosunkowo prostej metody. Mianowicie, na podstawie 62 sekwencji fragmentu cytochromu b, zaprojektowano parę starterów pozwalającą namnożyć fragment zawierający dwa diagnostyczne miejsca restrykcyjne, *Hae*III i *Bam*HI. Pierwszy z enzymów tnie typ mtDNA charakterystyczny dla *B. bombina*, drugi dla *B. variegata*. Dzięki temu profile agarozowe w prosty sposób pozwalały na odróżnienie pomiędzy typami mtDNA oraz jednocześnie stanowiły wzajemną kontrolę. Następnie sprawdzano zgodność pomiędzy klinami różnych loci allozymatycznych oraz mtDNA.

W obu transektach, haplotypy mtDNA charakterystyczne dla *B. bombina* były ograniczone do północnej lub północno-wschodniej części transektu, podczas gdy haplotypy *variegata* do południowej lub południowo-zachodniej części. Rozkład ten był zgodny z oczekiwaniami wynikającymi z badań nad cechami morfologicznymi oraz zmiennością allozymów (Szymura i Barton 1986; 1991). Znaczące częstości haplotypów mtDNA obu gatunków znajdowały się jedynie w populacjach leżących w centrum strefy. Ogólnie wzorzec zmienności częstości alleli niesprzężonych loci allozymatycznych i haplotypów mtDNA był podobny; zmienność mtDNA poprzez transekty miała charakter klinalny i korelowała ze zmiennością klinalną allozymów. Jednak w większości populacji centralnych, częstość haplotypów mtDNA *variegata* przeważała nad częstością alleli allozymatycznych tego gatunku. Asymetria ta szczególnie była widoczna po stronie transektu zajmowanej przez *B. variegata*, gdzie nie znaleziono haplotypów mtDNA *bombina*, nawet w populacjach ze znaczącą częstością alleli *B. bombina*. Z kolei, po stronie *B. bombina*, w niektórych przypadkach znaleziono haplotypy *variegata* na tle genów jądrowych *B. bombina*.

W obu transektach klin zmienności mtDNA był znacząco przesunięty na stronę *B. bombina* (około 1 km). Ponadto w transekcie w okolicach Przemyśla, klin mtDNA był także znacząco węższy (3,42 km) w porównaniu z klinem allozymów (6,05 km). Na taki kształt klina mtDNA mogą wpływać dwa czynniki: dyspersja osobników równoważona przez dryf genetyczny i/lub dobór naturalny. W wyniku dziedziczenia matczynego, przestrzenny wzorzec zmienności haplotypów mtDNA zależy od demografii i przemieszczania się samic, przenoszących warianty mtDNA z jednej populacji do drugiej. Mniejsza dyspersja samic i/lub dryf genetyczny mogą zwężać klin mtDNA i udawać dobór naturalny. Z kolei przesunięcie klina mtDNA w kierunku *B. bombina* może być wynikiem większej dyspersji samic posiadających mtDNA typu *variegata*.

Zwężenie klina mtDNA może również wskazywać na silniejszy dobór naturalny działający na pewne fragmenty genomu. Oczywiście jest, że mtDNA nie jest cząsteczką neutralną. U eukariontów, białka transbłonowe, osadzone w wewnętrznej błonie mitochondriów, są miejscem produkcji około 90% energii przechowywanej w ATP. Białka te składają się na podjednostki systemu transportu elektronów (ETS) i są kodowane zarówno w DNA jądrowym, jak i mitochondrialnym. Produkty obu genomów i ich precyzyjne współdziałanie jest konieczne dla metabolizmu tlenowego. Zrekombinowane, heterospecyficzne kompleksy u mieszańców mogą więc mieć negatywny wpływ na ich wydajność, na różnych stadiach życiowych, poprzez żywotność zarodków, możliwości kojarzenia się oraz mobilność plemników.

Kliny zmienności mtDNA, będące równe lub węższe w porównaniu z klinami loci jądrowych są zgodne w szerszej skali z właściwościami obserwowanymi dla różnych grup europejskich kumaków wyodrębnionych na podstawie cech morfologicznych i badań molekularnych (Szymura 1993). Sugeruje to, że w dłuższej ewolucyjnej skali, hybrydyzacja nie prowadzi jednak do znaczącej introgresji mtDNA w żadnym z dwóch możliwych kierunków (Szymura i in. 2000).

Mitochondrialny DNA jest często używany w badaniach filogenetycznych i filogeograficznych, mających na celu określenie zróżnicowania nukleotydów, zidentyfikowanie linii matczynych wraz z ich pokrewieństwami filogenetycznymi, określenie zasięgów geograficznych poszczególnych linii mitochondrialnych oraz znalezienie potencjalnych refugium glacialnych, a także dróg postglacialnej rekolonizacji w Europie. Analizie filogenetycznej poddaliśmy 364 osobniki *B. bombina* i *B. variegata* pochodzące z 156 miejsc reprezentujących całe zasięgi obu gatunków, z wyjątkiem najbardziej wschodnich rejonów zasięgu *B. bombina* (Hofman i in. 2007).

Dla obu gatunków, *B. bombina* i *B. variegata*, potwierdzono status gatunków siostrzanych. Wykazano trzy główne linie filogenetyczne mtDNA: *B. bombina*, *B. variegata* z Karpat oraz *B. variegata* z południowo-zachodniej Europy. *B. bombina* i *B. variegata* z Karpat wykazują tylko niewielkie zróżnicowanie wewnątrzgrupowe, natomiast pozostałe haplotypy *B. variegata* tworzą trzy dobrze zdefiniowane linie: z Apeninów we Włoszech, Rodopów z Bułgarii oraz z pozostałej części Bałkanów i zachodniej Europy. Umieszczenie włoskich *Bombina* w obrębie linii *B. variegata*, silnie podważa status gatunkowy *Bombina pachypus*, opisanego wcześniej z Włoch (Lanza i Vanni 1991; Canestrelli i in. 2006).

Dane molekularne wskazywały, że dywergencja pomiędzy europejskimi gatunkami kumaków nastąpiła w górnym miocenie lub dolnym pliocenie. Niewiele młodsza (na pewno przed plejstocenska) była jedynie dywergencja pomiędzy linią karpacką, a wszystkimi pozostałymi liniami *B. variegata*. Takie poprzedzające plejstocen powstanie dwóch gatunków *Bombina*, a także dwóch głównych linii *B. variegata* było zaskakujące w porównaniu do innych organizmów. Co więcej, tak odległe w czasie powstanie trzech głównych linii *Bombina* w Europie, sugeruje, że plejstocenske oscylacje klimatyczne wpływały jedynie na zmiany rozmieszczenia istniejących już linii filogenetycznych. Takie zmiany mogły powodować powstawanie geograficznie izolowanych populacji i indukować ich zróżnicowanie wewnętrzne. Zamieszkujące niziny *B. bombina* dzieliły się na dwa niewiele różniące się kłady, z północnej i południowej części zasięgu, co sugerowało ich powstanie podczas ostatniego zlodowacenia w oddzielnych refugiach, zlokalizowanych na nizinach w pobliżu Morza Czarnego, lub, co jest również możliwe, w obrębie zalanego obecnie szelfu w północno-zachodniej części Morza Czarnego.

Zróżnicowanie mtDNA w obrębie *B. variegata* jest bardziej skomplikowane. Olbrzymia dychotomia pomiędzy grupą karpacką i pozostałymi liniami *B. variegata*, wraz z rozmieszczeniem kładów mtDNA i zróżnicowaniem allozymów w obrębie populacji karpackich, sugeruje istnienie dwóch oddzielnych refugium w obrębie Karpat. Dwa inne refugia dla *B. variegata* były prawdopodobnie zlokalizowane na Półwyspie Apenińskim, najprawdopodobniej w jego najbardziej południowej części, oraz w regionie Rodopów. Ostatnia linia filogenetyczna *B. variegata*, z Bałkanów i zachodniej Europy, tworzyła dwie podgrupy: zachodnią i bałkańską. W przypadku podgrupy zachodniej, odpowiadającej podgatunkowi *B. v. variegata*, najwyższe zróżnicowanie haplotypów zostało znalezione na obszarach wyżynnych wschodniej Serbii. Z tego powodu prawdopodobne jest istnienie na tym obszarze refugium, z którego nastąpiła ekspansja, zarówno w kierunku północno-wschodnim, jak i północno-zachodnim. W przypadku podgrupy bałkańskiej, która zawiera większość populacji podgatunku *B. v. scabra*, ostatnie zlodowacenie przeżyło prawdopodobnie wiele populacji w południowych Bałkanach.

Biorąc pod uwagę większą skalę geograficzną, istnieje u *Bombina* wysoka zbieżność w zmienności cech fenotypowych, allozymów i haplotypów mtDNA: *B. bombina* i *B. variegata* mogą być rozróżnione na podstawie każdej z długiej listy cech diagnostycznych dla obu gatunków (Szymura 1993). Zbieżność ta istnieje również dla większości grup geograficznych w obrębie *B. variegata*; istnieje jednak jedna ważna niezgodność pomiędzy haplotypami mtDNA grupy zachodniej, a ich allozymami i morfologią. Mianowicie, dane

morfologiczne i allozymatyczne łączą tę grupę z grupą karpacką, podczas gdy *B. v. variegata* występujące wzdłuż południowej doliny Morawy we wschodniej Serbii i na terenach zachodnich, posiadają haplotypy mtDNA bliskie linii bałkańskiej. Możliwym wytłumaczeniem tej niezgodności może być transfer bałkańskiego mtDNA do *Bombina* występujących w zachodniej Europie, który to, biorąc pod uwagę niedawne oddzielenie się tych linii, mógł nie mieć negatywnych skutków u mieszańców na interakcje pomiędzy mtDNA a genomem jądrowym. Alternatywne wytłumaczenie, biorące pod uwagę transfer genów jądrowych z karpackich *B. variegata* do populacji *B. v. scabra*, wydaje się mniej prawdopodobne.

Nieco odrębnym obszarem badań nad mtDNA są analizy całych genomów mitochondrialnych, które mogą stanowić nie tylko ważne źródło danych dla analiz filogenetycznych na różnych poziomach taksonomicznych, ale też mogą tworzyć bazę do badań nad innymi aspektami ewolucji organizmów, włączając w to dobór naturalny. Badania filogenetyczne przy użyciu kompletnych genomów mitochondrialnych pozwalają rozwiązać większą liczbę węzłów na drzewie filogenetycznym w porównaniu do badań używających jedynie krótkie fragmenty mtDNA. Ponadto, analizy porównawcze substytucji w kompletnych genomach mitochondrialnych mogą m. in. pozwolić na wykrycie miejsc będących pod wpływem pozytywnego doboru naturalnego lub innych jego odmian. Co więcej, różne filogenetyczne i biogeograficzne analizy wielu organizmów są często oparte na odmiennych, relatywnie krótkich, fragmentach mtDNA, co może prowadzić do przeciwnych wyników, błędnego filogenetycznego wnioskowania i słabego statystycznego poparcia dla otrzymanych drzew filogenetycznych. Na błędy we wnioskowaniu może również wpływać odmienne tempo ewolucji różnych fragmentów genomów mitochondrialnych. Oczywistym sposobem ominięcia wyżej wymienionych problemów jest analiza pełnych sekwencji genomów.

Do analiz kompletnych sekwencji genomów mitochondrialnych wybraliśmy (Hofman i in. 2012) unikatową parę gatunków żab zielonych z rodzaju *Pelophylax*: *P. lessonae* i *P. ridibundus*. Gatunki te wykazują szereg odróżniających je cech, będących adaptacjami do odmiennych siedlisk, preferowanych przez nie. Pomimo tego tworzą one mieszańce - *P. kl. esculentus*. W środkowej Europie mieszańce te wykazują dziedziczenie półklonalne w wyniku nietypowego sposobu reprodukcji zwanego hybrydogenezą. Jej efektem jest przekazywanie do gamet jedynie jednego (zwykle *ridibundus*, rzadziej *lessonae*) z dwóch rodzicielskich genomów jądrowych i wyeliminowanie drugiego z linii

płciowej (Graf i Polls Pelaz 1989). Co więcej, większość *P. kl. esculentus* oraz prawie co trzeci *P. ridibundus* w środkowej Europie zawierają mtDNA charakterystyczne dla *P. lessonae*. Ciekawe jest ograniczenie tego zjawiska do populacji środkowoeuropejskich; wszystkie badane *P. ridibundus* z południowej i wschodniej Europy posiadały jedynie typ mtDNA charakterystyczny dla własnego gatunku (Plötner i in. 2008).

Do analizy kompletnych genomów mitochondrialnych starannie wybraliśmy sześć osobników *Pelophylax* reprezentujących wszystkie trzy gatunki środkowoeuropejskie (Hofman i in. 2012). Dla przeprowadzenia tego wyboru stworzono łatwą i szybką metodę wstępnej identyfikacji typu mtDNA przy pomocy metody PCR. Zaprojektowano specyficzne startery umożliwiające namnożenie tylko jednego z dwu typów mtDNA: *lessonae* lub *ridibundus*. W kolejnym etapie zsekwencjonowano niemal kompletne genomy mtDNA, ustalono ich organizację u obu gatunków i obliczono dywergencję nukleotydów we wszystkich regionach mtDNA. Przeprowadzono również analizy porównawcze substytucji aminokwasowych dla sprawdzenia znaczenia funkcjonalnego obserwowanej dywergencji, również w szerszym aspekcie introgresji mtDNA w kompleksie żab zielonych.

Ostatecznie otrzymaliśmy cztery niemal kompletne genomy mitochondrialne *lessonae* oraz dwa genomy *ridibundus*. Jedynie niewielki fragment regionu kontrolnego pozostał niezsekwencjonowany z powodu dużej liczby powtórzeń krótkich sekwencji nukleotydów. Skład genów genomów mitochondrialnych nie różnił się od typowego dla kręgowców (Boore 1999). Ich liniowy układ był identyczny do układu charakterystycznego dla zsekwencjonowanego wcześniej genomu żaby zielonej ze wschodniej Palearktyki - *P. nigromaculatus* (Sumida i in. 2001) i zgadzał się z najczęściej opisywanym układem dla płazów z grupy Neobatrachia (Kurabayashi i in. 2006; Zhang i in. 2013).

Genomy mitochondrialne *Pelophylax* zawierały dwa geny rRNA (12S i 16S) oraz 22 geny tRNA, które tworzą charakterystyczne struktury drugorzędowe (z wyjątkiem tRNA-Ser (AGY)). Genomy zawierają również 43 nukleotydy leżące między genami, fragmenty nakładające się oraz regiony niekodujące, takie jak miejsce początku replikacji nici lekkiej oraz region kontrolny. Tak jak u innych kręgowców, genomy *Pelophylax* zawierały również 13 genów kodujących białka, włączając *ATP6*, *ATP8*, *CO I-III*, *ND 1-6*, *ND4L* oraz cytochrom b.

Średnia liczba różnic nukleotydowych pomiędzy genomami mitochondrialnymi *P. lessonae* i *P. ridibundus* wynosi $1838 \pm 35,6$ co daje dystans *p* równy 11,9% dla całego genomu z wyłączeniem regionu kontrolnego. Poszczególne regiony funkcjonalne mtDNA *Pelophylax* ewoluowały z różnym tempem. Geny rRNA i tRNA okazały się najmniej zmienne

co jest wynikiem ograniczeń funkcjonalnych. Dystans p dla genów kodujących białka, pomiędzy *P. lessonae* i *P. ridibundus* waha się od 11,3 % (dla *COIII*) do 17,0 % (dla *ATP8*). Współczynnik określający dobór naturalny przeciwko substytucjom niesynonimowym (dN/dS) znajduje się w przedziale 0,006 do 0,108. Wśród 245 niesynonimowych substytucji znalezionych pomiędzy *P. lessonae* i *P. ridibundus*, większość (74,7%) została znaleziona w kompleksie I (ETS I) systemu transportu elektronów (czyli dla genów *ND*). Ewidentne jest zatem zróżnicowanie w ograniczeniach funkcjonalnych pomiędzy poszczególnymi genami kodującymi elementy kompleksów ETS; geny *ND* (ETS I) ewoluowały znacznie szybciej niż geny kodujące elementy innych kompleksów. Takie wysokie zróżnicowanie w genach *ND* (szczególnie *ND5*) zostało wykryte również dla wielu innych genomów mitochondrialnych Metazoa (np. Montooth i in. 2009). Obserwacje te mogą również sugerować, że kompleks ETS I jest ważnym celem dla działania doboru naturalnego. Jednak nie można do końca wyciągać jednoznacznych wniosków. U owadów substytucje niesynonimowe w genach *ND* prawdopodobnie odgrywają mniejszą rolę niż podstawienia w genach *CO* (kompleks ETS III) (Montooth i in. 2009). Podobnie, udokumentowany został brak różnic w aktywności enzymów *ND*, różniących się aż 45 aminokwasami pomiędzy dwoma gatunkami pstrągów (Blair i in. 2006) oraz brak dysfunkcji tych enzymów u mieszańców. W przeciwieństwie do tego nawet bardzo niewielkie substytucje aminokwasów mogą przynieść różnice w aktywności oksydazy cytochromowej (Harrison i Burton 2006).

Pomiędzy genami kodującymi białka znaleziono 211-213 podstawień aminokwasów pomiędzy sześcioma badanymi genomami mitochondrialnymi *Pelophylax*. Zmiany niesynonimowe w domenach błonowych zawierały 47% wszystkich obserwowanych podstawień aminokwasów, pozostałe podstawienia dotyczyły domen pozabłonowych. Jedynie 25 substytucji aminokwasów spełniało kryteria zmian radykalnych. Niemal taka sama liczba zmian radykalnych występowała w domenach błonowych i pozabłonowych (odpowiednio 12 i 13). Jest to wynik odmienny w porównaniu do białek kodowanych w DNA jądrowym, w przypadku których, segmenty pozabłonowe akumulują średnio dwa razy tyle substytucji aminokwasów niż regiony błonowe (Tourasse i Li 2000). Różnica ta może być związana z właściwościami charakterystycznymi dla genomów mitochondrialnych i jądrowych, takich jak nieco odmienny kod genetyczny, współczynnik tranzykcji do transwersji oraz różna liczebność kodonów.

Znacząco więcej substytucji aminokwasowych wykryto w linii *P. lessonae*.

Możliwym wytłumaczeniem może być wpływ pozytywnego doboru naturalnego na niektóre

kodony wyżej wymienionych genów. Zmiany w genomach mitochondrialnych mogą dawać korzyści adaptacyjne niektórym liniom filogenetycznym *P. lessonae* w chłodniejszym klimacie, co zostało zaproponowane dla najbardziej północnego krańca zasięgu tego gatunku i pewnych właściwości kijanek związanych z zimowaniem (Plötner i in. 2008). Przewaga adaptacyjna może dotyczyć również osobników posiadających mtDNA *lessonae* na tle genów jądrowych *P. ridibundus*, w wyniku trójstopniowych interakcji pomiędzy mitochondriami, genami jądrowymi i środowiskiem, szczególnie w sroższym klimacie. Powyższa hipoteza może być wzmocniona poprzez fakt wyższej częstości introgresji mtDNA typu *lessonae* u żab żyjących w obszarach położonych bardziej na północ zachodniej Palearktyki (Plötner i in. 2008).

W celu analiz porównawczych, a także otrzymania bardziej wiarygodnych drzew filogenetycznych żab zielonych, uzyskaliśmy sekwencje genomów mitochondrialnych innych gatunków *Pelophylax*. Genom *P. cretensis* (Hofman i in. 2014) był pierwszym kompletnym (zawierającym również region kontrolny) genomem mitochondrialnym zsekwencjonowanym dla żab zielonych zachodniej Palearktyki. Genom ten (o długości 17 829 pz) posiadał typowy dla płazów z grupy Neobatrachia układ genów. Region kontrolny, o długości 2 452 pz, zawierał trzy bloki konserwatywne, region TAS (*putative termination-associated sequences*), miejsce początku replikacji nici ciężkiej oraz region zawierający tandemowe powtórzenia sekwencji kilku nukleotydów. Porównanie genomu *P. cretensis* z genomami innych gatunków żab zielonych (dystans *p*, z wykluczeniem regionu kontrolnego) wskazuje na najniższy stopień dywergencji z *P. ridibundus* (0,08) i znacznie większy z *P. lessonae* (0,126).

Zsekwencjonowany mtDNA *P. cretensis* może stanowić podstawę dla dalszych analiz porównawczych, a także może być jednym z punktów umożliwiających kalibrację zegara molekularnego dla *Pelophylax*. Gatunek ten jest bowiem endemitem Krety, największej wyspy Morza Śródziemnego, która prawdopodobnie była połączona z kontynentem europejskim podczas kryzysu mesyńskiego (5,96-5,33 mln lat temu). Po otwarciu się cieśniny Gibraltarskiej i zalaniu Morza Śródziemnego, Kreta stała się wyspą izolowaną przez wody morskie (Garcia-Castellanos i in. 2009). Płazy należą do zwierząt, dla których woda morska jest barierą nie do przebycia, tak więc czas istnienia bariery morskiej może dać miarę minimalnego czasu izolacji wyspowych gatunków płazów.

Wynikiem analiz filogenetycznych kompletnych genomów mitochondrialnych są drzewa o dużej wiarygodności, a także dużo lepsze wyjaśnienia powiązań filogenetycznych

w porównaniu do badań stosujących mniejsze fragmenty mtDNA. Nie do końca rozwiązane stosunki filogenetyczne istniały dla dwóch gatunków *Pelophylax*: *P. cretensis* i *P. epeiroticus* (Lymberakis i in. 2007, *versus* Akin i in. 2010) oraz pozostałych gatunków pochodzących z Bałkanów. Między innymi z tego powodu zsekwencjonowaliśmy (Hofman i in. 2015) całościowe mtDNA dla czterech gatunków *Pelophylax*: *P. cypriensis* z Cypru, oraz endemicznych dla Bałkanów: *P. epeiroticus*, *P. kurtmuelleri* i *P. shqipericus*. Jednym z głównych celów tych badań było połączenie analiz na podstawie nowych i wcześniej opublikowanych genomów mitochondrialnych.

Nowo uzyskane genomy mitochondrialne wykazywały identyczną organizację genów, orientację tRNA i ich antykodony oraz identyczne kodony start i stop genów kodujących białka w porównaniu do wcześniej otrzymanych genomów *Pelophylax*. Średnia liczba różnic w obrębie czterech nowych genomów (z wykluczeniem regionu kontrolnego) wyniosła 1 569, dając dystans $p = 0,096$. Najbardziej różny okazał się genom *P. shqipericus*, pozostałe trzy genomy grupowały się w obrębie jednej linii ewolucyjnej. Podobnie jak w przypadku *P. lessonae* i *P. ridibundus* regiony funkcjonalne bałkańskich *Pelophylax* ewoluowały z różnym tempem. Średni dystans genetyczny dla genów kodujących 12S i 16S rRNA wyniósł odpowiednio 0,05 i 0,067; jednak poziom dywergencji różnił się w obrębie tych genów, gdyż zawierały one identyczne i wysoko zmienne fragmenty. Średni dystans dla regionu kontrolnego, z wyjątkiem regionu z powtórzeniami, wyniósł 10,2%, co jest wartością identyczną do dystansu charakteryzującego region kodujący. Średni dystans p dla genów kodujących białka waha się od 8,4% (dla *COII*) do 13,7% (dla *ATP6*). W sumie wykryto 284 substytucje niesynonimowe, a znaczna ich część (81,3%) dotyczyła kompleksu I. Wśród nowo analizowanych genomów znaleziono 243 substytucje aminokwasów, większość z nich (49,8%) w obrębie genu *ND5*. Większość substytucji niesynonimowych, tak jak oczekiwano, obserwowano pomiędzy linią “*P. bedriagae/ridibundus*” (*P. cypriensis*, *P. kurtmuelleri* i *P. epeiroticus*) a linią “*P. lessonae*” (*P. shqipericus*).

W końcowym etapie badań nad żabami zielonymi, przeprowadziliśmy analizę filogenetyczną dla wszystkich dostępnych (opisanych powyżej) kompletnych lub niemal kompletnych genomów mitochondrialnych *Pelophylax*. Genomy te tworzą dwie główne linie ewolucyjne żab zachodniej Palearktyki. Pierwsza, “*ridibundus/bedriagae*” zawiera *P. ridibundus* i *P. kurtmuelleri*, które tworzą klady siostrzane (z tylko 1% dywergencją) i oba są grupą siostrzaną do *P. cypriensis* (z 5% dywergencją). Analizy genomów rozwiązały definitywnie powiązania filogenetyczne dwóch innych gatunków *Pelophylax* w obrębie linii *ridibundus/bedriagae*: *P. cretensis* okazał się bliżej spokrewniony z kladem

ridibundus/kurtmuelleri/cypriensis (z 8% dywergencją) niż *P. epeiroticus* (z 9–10% dywergencją). Tak więc porównania kompletnych genomów potwierdziły wcześniejsze badania wykorzystujące szybko ewoluujące geny *ND2* i *ND3* (Akin i in. 2010), oraz zaprzeczyły wynikom badań przy wykorzystaniu genów ewoluujących wolniej (16S rRNA i *cytb*) (Lymberakis i in. 2007). Drugą główną linią *Pelophylax* była linia “*lessonae*”, obejmująca *P. lessonae* i *P. shqipericus*, których dywergencja wynosiła 7%.

Podsumowując, moje główne osiągnięcia naukowe przyczyniły się m. in. do znalezienia jednego z pierwszych przykładów introgresji mtDNA na jądrowe tło genetyczne innego, znacznie się różniącego gatunku, w obrębie rodzaju u *Bombina*. Pokazana została również szczegółowa filogeneza i filogeografia linii mitochondrialnych europejskich *Bombina*, a także demograficzne i historyczne aspekty ewolucji mtDNA *Bombina*. Zidentyfikowano również możliwe refugia glacialne. Co więcej, wykryto możliwy transfer jednego typu mtDNA na znacznie odrębne tło genów jądrowych. Uzyskane zostały również kompletne lub niemal kompletne sekwencje genomów mitochondrialnych dla 7 gatunków *Pelophylax*. Udokumentowano skład genów i ich ułożenie, a także poziom dywergencji pomiędzy poszczególnymi genami i gatunkami oraz możliwości działania doboru naturalnego w różnych funkcjonalnych częściach mtDNA.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) Omówienie pozostałego dorobku naukowego

Moje pozostałe zainteresowania badawcze koncentrowały się głównie wokół analiz molekularnych różnych aspektów ewolucyjnych wśród płazów i ślimaków. Brałem udział w analizowaniu strefy mieszańcowej kumaków w okolicach Stryja na Ukrainie, analizie filogenezy i filogeografii kumaków w skali całego zasięgu obydwu gatunków europejskich, a także w analizach kompletnych sekwencji genomów mitochondrialnych kumaków europejskich i azjatyckich. W przypadku ślimaków przeprowadzałem szczegółowe analizy molekularne kilku rodzajów z nadrodziny *Truncatelloidea* wraz z porównaniami zmienności markerów genetycznych i cech morfologicznych.

Moje analizy molekularne przyczyniły się m. in. do opisanie nowego transektu przez strefę mieszańcową kumaków, w pobliżu Stryja na Ukrainie (Yanchukov i in. 2006), przy wykorzystaniu, w charakterze markerów genetycznych, pięciu niesprzężonych ze sobą loci allozymatycznych, dwóch markerów SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) oraz fragmentu mtDNA. Strefa mieszańcowa wzdłuż rzeki Stryj wykazywała liczne właściwości charakterystyczne także dla wcześniej opisanych klinalnych transektów poprzez strefę mieszańcową kumaków, m. in. w okolicach Krakowa i Przemyśla. Należały do nich przewaga zrekombinowanych genotypów w centrum strefy oraz zgodność zmienności niesprzężonych markerów w obrębie populacji mieszańcowych. Zgodna zmienność klinalna częstości alleli, wraz z gwałtowną zmianą w centrum transektu, występowała w poprzek wąskiego ekotonu, w obrębie którego zbiegają się obszary przejściowe środowiska wodnego, wysokości terenu oraz roślinności lądowej.

Odkryliśmy kilka unikalnych właściwości transektu w okolicy Stryja. Wąski klin zmienności wydawał się być w sprzeczności ze słabą barierą dla przepływu genów oraz niewielkimi korelacjami pomiędzy środowiskiem a częstościami alleli. Obliczona szerokość klina na locus wahała się od 0,86 km (dla *Mdh-1*) do 4,25 km (dla *Ak*), średnio wynosiła ona 2,3 km. Jest to najniższa wartość wśród obliczonych dla różnych transektów przez strefę mieszańcową kumaków w Europie. Najprawdopodobniej tak wąski klin zmienności w okolicy Stryja jest wynikiem połączenia rozmieszczenia różnych siedlisk oraz preferencji siedliskowych kumaków. Dorosłe osobniki poszczególnych gatunków wykazują odmienne preferencje do zbiorników wodnych, co wpływa na rozmieszczenie genotypów w obrębie

strefy mieszańcowej; w okolicach Stryja może to powodować zmniejszenie współczynnika dyspersji w obrębie ekotonu, a tym samym powodować zwężenie klina zmienności.

W przeciwieństwie do transektów w Polsce, w okolicach Stryja nie znaleziono ani asymetrii, ani zwężenia klina mtDNA, w porównaniu z markerami jądrowymi. Odkryto jednak asymetryczną introgresję genów *B. variegata* na obszar zajęty przez *B. bombina*, wzdłuż brzegu rzeki Stryj. Przeprowadzono również szczegółowe porównania wszystkich pięciu intensywnie badanych transektów przez strefę mieszańcową kumaków w Europie, które to stanowią poparcie dla hipotezy zakładającej wpływ rozmieszczenia siedlisk i preferencji ich wyboru na strukturę genetyczną strefy mieszańcowej i w końcowym efekcie na powstanie bariery dla przepływu genów pomiędzy zróżnicowanymi pulami genowymi.

Wyżej opisaną filogenezę europejskich kumaków (Hofman i in. 2007) uzupełniono poprzez zastosowanie filogenetycznych analiz wielogenowych oraz analizy koalescentu, oraz poprzez znaczne zwiększenie wyjściowej bazy danych obejmującej zarówno nowe osobniki, jak i nowe populacje. Jednym z najważniejszych celów tej analizy było zidentyfikowanie refugium glacialnych i odtworzenie dróg kolonizacji dla europejskich kumaków po ostatnim zlodowaceniu (Fijarczyk i in. 2011). W tym celu określono zróżnicowanie genetyczne mtDNA dla 950 osobników pochodzących z 385 stanowisk w Europie oraz zróżnicowanie genów jądrowych (*Rag-1*, *Ncx-1*) dla znacznej części tych osobników. Tak ogromny zestaw danych jest unikalny w badaniach filogenetycznych, nie tylko płazów, ale również innych grup zwierząt.

Główne klady wyodrębnione na podstawie zmienności mtDNA były identyczne do opisanych wcześniej (Hofman i in. 2007). Znaczącą zmienność genetyczną genów jądrowych znaleziono jedynie w południowych Karpatach i na Bałkanach. Na podstawie obu rodzajów markerów, oprócz *B. bombina*, wyodrębniono również trzy grupy *B. variegata*: zamieszkujące Karpaty, Bałkany oraz Półwysep Apeniński.

Zidentyfikowano trzy główne obszary będące refugiami glacialnymi dla *B. variegata* zlokalizowane w południowych Karpatach, na Półwyspie Bałkańskim oraz w południowych Apeninach. Pojedyncze refugium dla *B. bombina* znajdowało się na nizinach zlokalizowanych na zachód i północny zachód od Morza Czarnego. Wyniki te podkreślają, jak ważne były dla zwierząt lądowych refugia glacialne zlokalizowane w Środkowej Europie, daleko na północ od obszarów Morza Śródziemnego, uznawanych wcześniej za jedyne istniejące refugia glacialne. Analizy rozkładu zmienności genetycznej oraz struktury populacji wyraźnie wskazały na utratę zróżnicowania genetycznego wzdłuż tras rekolonizacji z refugium

glacialnych w kierunku brzegów obszarów występowania gatunków i potwierdziły, że ekspansji po okresie zlodowacenia towarzyszył silny dryf genetyczny. Ponadto nasze wielogenowe analizy przepływu genów pomiędzy Karpackimi i Bałkańskimi grupami *B. variegata* ujawniły jednokierunkowy przepływ genów z Bałkanów w kierunku północnym, na obszar południowych Karpat.

W celu poznania powiązań filogenetycznych poszczególnych linii mitochondrialnych wszystkich gatunków *Bombina*, uzyskano ich pełne genomy mitochondrialne (Pabijan i in. 2013). W sumie przeanalizowano 12 nowych i 6 wcześniej opublikowanych genomów kumaków Europejskich i Azjatyckich. Skład genów i ich ułożenie w nowo sekwencjonowanych genomach był identyczny do opisanych wcześniej, z wyjątkiem unikalnej duplikacji fragmentu tRNA-Pro oraz *ND6* u *B. maxima*. W obrębie *Bombina* występowały dwie wyraźne grupy, tak zwane ‘małe’ i ‘duże’ *Bombina*, a dystans *p* pomiędzy tymi grupami wynosił 13-14%, biorąc pod uwagę całą kodującą część mtDNA. *B. orientalis* okazał się najbardziej różny w obrębie ‘małych’ *Bombina* (11,9-12,5% różnicowania). Kolejna dywergencja nastąpiła pomiędzy *B. bombina* i *B. variegata* (7,9–8,6%). Z kolei *B. maxima* stanowił siostrzaną grupę do wszystkich pozostałych ‘dużych’ *Bombina*, a dystans genetyczny wahał się od 5,4% do 6,2%. Różnicowanie w pozostałej grupie ‘dużych’ *Bombina* było niewielkie (1,6-2,6%) co pokazuje, że przynajmniej w kontekście mtDNA, *B. fortunuptialis*, *B. lichuanensis* oraz *B. microdeladigitora* nie rozdzieliły się jeszcze całkowicie. Filogeneza na poziomie wewnątrz gatunkowym pokrywała się z wcześniejszymi badaniami (Hofman i in. 2007; Fijarczyk i in. 2011): *B. variegata* przeszedł dwa główne podziały linii mitochondrialnych, pierwszy rozdzielił karpackie *B. v. variegata* od linii południowych, drugi natomiast oddzielił apenińskie *B. v. pachypus* od kladu zawierającego bałkańskie *B. v. scabra* i *B. v. variegata* z zachodniej Europy. W przeciwieństwie do *B. variegata*, poziom dywergencji u *B. bombina* był niski. *B. bombina* pochodzące z Anatolii w Turcji były siostrzaną grupą do północno- i południowo europejskich linii tego gatunku.

Oszacowanie czasu dywergencji różni się dla dwóch najstarszych węzłów na drzewie filogenetycznym *Bombina*. Najwcześniejsza dywergencja wystąpiła pomiędzy małymi i dużymi *Bombina* (odpowiednio podrodzaje *Bombina* i *Grobina*) w środkowym oligocenie albo we wczesnym miocenie. Zachodnio-azjatyckie *B. orientalis* i europejskie *B. bombina* + *B. variegata* oddzieliły się we wczesnym lub środkowym miocenie. Z kolei rozdzielenie *B. bombina* od *B. variegata* nastąpiło w późnym miocenie i nieco poprzedziło rozdzielenie linii mtDNA bałkańskich *B. v. scabra* oraz występujących w Karpatach

B. v. variegata. W przypadku *Grobina* najbardziej genetycznie odrębny *B. maxima* oddzielił się od innych *Grobina* w południowo-wschodniej Azji w późnym miocenie lub w pliocenie. Nasze analizy wskazują również, że *B. fortinuptialis*, *B. lichuanensis* oraz *B. microdeladigitata* mogą być geograficznymi formami tego samego gatunku, które rozdzieliły się w wyniku plejstocénskich klimatycznych zmian w południowo-wschodniej Azji. Tymczasem w zachodniej Palearktyce klimatyczne oscylacje były prawdopodobnie przyczyną powstania dwóch bałkańskich linii mtDNA *B. v. scabra* oraz allopatrycznego *B. v. pachypus* na Półwyspie Apenińskim.

Kolejne moje zainteresowania badawcze, realizowane w odrębnym zespole badawczym, obejmowały analizy molekularne w obrębie ślimaków należących do nadrodziny Truncatelloidea. Znaleźliśmy m. in. przedstawicieli *Vinodolia fumana*, gatunku uważanego za wymarły (Szarowska i in. 2013) oraz opisaliśmy jego muszlę, tarkę, miękkie części ciała oraz anatomię żeńskiego układu rozrodczego. Określiśmy również pozycję filogenetyczną gatunku na podstawie standardowo używanych markerów genetycznych: oksydazy cytochromowej (*COI*) oraz 18S rRNA. Ponadto znaleźliśmy, po raz pierwszy poza kontynentalną Grecją, przedstawicieli rodzaju *Daphniola* (Szarowska i in. 2014a) pochodzących z dwóch wysp na Morzu Egejskim: Chios oraz Rodos. Dystans genetyczny pomiędzy osobnikami zamieszkującymi te dwie wyspy był zaskakująco niski, co sugeruje przynależność tych dwóch populacji do tego samego gatunku, blisko spokrewnionego z *D. louisi* z Attyki. Historia geograficzna rodzaju *Daphniola* była jednak skomplikowana. Rozdzielenie się tych dwóch kładów nastąpiło około 2.8 mln lat temu, do czego przyczyniły się niektóre wydarzenia geologiczne, związane głównie z zanikiem i powstawaniem pomostów lądowych pomiędzy wyspami i kontynentem w obrębie Morza Egejskiego.

Dokładniejsze analizy przeprowadziliśmy dla rodzaju *Pseudorientalia*, znanego wcześniej jedynie z Turcji. Ślimaki tego rodzaju zostały znalezione najpierw na wyspie Samos (Szarowska i in. 2014b), a następnie na wyspach Lesbos i Chios (Szarowska i in. 2014c). Populacje z tych trzech wysp charakteryzował wysoki poziom dywergencji. Dystans genetyczny pomiędzy poszczególnymi kładami był wystarczająco duży, aby uznać populacje z poszczególnych wysp za odrębne gatunki (dystans *p* wahał się od 0,105 do 0,133). Wyniki te zostały również potwierdzone przez wyraźne różnice morfologiczne w budowie muszli. Co więcej analiza zróżnicowania COI wskazywała, że ślimaki z wyspy Lesbos mogą należeć do odrębnego rodzaju, jednak dane morfologiczne nie potwierdzają tej hipotezy. Nasze

analizy wskazywały również, że dywergencja pomiędzy populacjami *Pseudorientalia* nastąpiła w górnym lub środkowym miocenie, kiedy to obszar Morza Egejskiego był częścią jednolitej masy lądu. Tak wysoki poziom dywergencji może stanowić relikwyt wysokiego poziomu regionalnego zróżnicowania, które istniało w przeszłości.

Kolejnymi interesującymi ślimakami z nadrodziny Truncatelloidea są przedstawiciele rodzaju *Heleobia*, opisanego z Europy, Izraela oraz Ameryki Południowej. Analizowaliśmy ten rodzaj z trzech populacji na wyspie Krecie (Szarowska i in. 2013d). Morfologia żeńskich i męskich narządów rozrodczych nie różniła się, ani pomiędzy badanymi populacjami, ani w porównaniu z blisko spokrewnionymi gatunkami nominalnymi żyjącymi w Europie. W przeciwieństwie do tego, analiza cech morfologicznych muszli wykazywała nieco zmienności. Wynik ten nie pokrywał się jednak z danymi molekularnymi, które to wykazały zaskakująco niski poziom zróżnicowania pomiędzy wszystkimi populacjami z Krety, jak i w porównaniu z populacjami *Heleobia* pochodzącymi z kontynentu. Wyniki te sugerują istnienie jedynie jednego gatunku *Heleobia* żyjącego w słonawych wodach Europy. Taki niski poziom zróżnicowania genetycznego jest niespotykany typowo dla gatunków wyspowych i prawdopodobnie był konsekwencją niedawnej kolonizacji Krety przez te ślimaki.

Powyższe badania były wynikiem realizowanych grantów badawczych. Byłem kierownikiem trzech grantów Ministerialnych (KBN, MNiSW, NCN) oraz dwóch projektów finansowanych w ramach funduszy Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Ponadto byłem wykonawcą czterech innych grantów ministerialnych.

Plany na przyszłość

Logiczną kontynuacją badań nad genomami mitochondrialnymi żab zielonych, będą analizy kompletnych genomów wszystkich gatunków *Pelophylax*. Przeprowadziłem już szczegółowe analizy sześciu osobników żab z Bliskiego Wschodu i Azji Środkowej. Wyniki zostały wysłane do druku w *Amphibia-Reptilia* i są obecnie w trakcie recenzji. Planuję również przeprowadzić dokładne analizy filogenetyczne dla genomów mitochondrialnych wszystkich gatunków z zachodniej grupy żab zielonych, a więc oprócz wymienionych wyżej, także dla *P. bergeri* z Włoch, *P. caralitamus* z południowej Turcji, *P. cerigensis* z greckiej wyspy Karpatos, *P. perezi* z Półwyspu Iberyjskiego oraz dwóch osobników *P. saharicus* odpowiednio z Maroka i Tunezji.

Na zakończenie badań nad rodzajem *Pelophylax*, planuję przeprowadzić szczegółowe analizy wielogenowe. W tym celu zsekwencjonowałem już dwa fragmenty mtDNA (*cytb* i *16S rRNA*) oraz 21 genów jądrowych dla 84 osobników reprezentujących 14 gatunków żab zielonych zachodniej Palearktyki oraz dla 4 osobników *P. nigromaculatus* z środkowej Azji. Wstępne analizy wskazują na duże różnice pomiędzy genami, zarówno w poziomie dywergencji pomiędzy poszczególnymi gatunkami (np. prawie niezmienny *h3a* oraz wysoce zmienny *rag1*), jak i w topologiach uzyskanych drzew filogenetycznych. Analizy na tak dużym liczbie genów należą do rzadkości w badaniach filogenetycznych płazów. Ważnym aspektem takich badań jest ich wartość porównawcza, a także stanowią one podstawę dla podobnych analiz dla innych gatunków. Badania z wykorzystaniem genów jądrowych żab zielonych w połączeniu z analizą kompletnych genomów mitochondrialnych będą stanowiły solidną podstawę dla dalszych badań, m. in. nad przypadkami i konsekwencjami międzygatunkowej introgresji mtDNA, które zostały już wstępnie opisane dla kilku gatunków żab zielonych, zarówno z zachodniej jak i wschodniej Palearktyki.

Planuję również kontynuować pracę nad ślimakami z nadrodziny Truncatelloidea. Zakończyliśmy już morfologiczne i molekularne analizy ślimaków z rodzajów *Pseudamnicola* oraz *Bythinella* z wysp Greckich na Morzu Egejskim oraz *Bythinella* z Bułgarii. Wyniki dwóch pierwszych analiz są aktualnie po pozytywnych pierwszych recenzjach, odpowiednio w *Organisms Diversity & Evolution* oraz w *Hydrobiologia*, wyniki trzeciej analizy zostały wysłane do *ZooKeys*. Zajmowaliśmy się również innymi rodzajami z nadrodziny Truncatelloidea, pochodzącymi z Bułgarii: *Grossuana* oraz *Pseudobelgrandiella*, wyniki tych badań są obecnie w trakcie analiz i przygotowywania do druku. W celu pełnego rozwiązania filogenetycznych pokrewieństw pomiędzy głównymi rodzajami nadrodziny Truncatelloidea planujemy otrzymać kompletne sekwencje genomów mitochondrialnych oraz kilku genów jądrowych. Badania tego typu będą pionierskie dla tej grupy ślimaków.

Literatura

- Akin C., Çan Biligin C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S.N., Uzzell T. 2010. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs were determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic. *Journal of Biogeography* 37: 2111–24.
- Blier P.U., Breton S., Desrosiers V., Lemieux H. 2006. Functional conservatism in mitochondrial evolution: insight from hybridization of arctic and brook charrs. *Journal of Experimental Zoology part B Molecular and Developmental Evolution* 306: 425–432.
- Boore J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27: 1767–1780.
- Canestrelli D., Cimmaruta R., Costantini V., Nascetti G. 2006. Genetic diversity and phylogeography of the Apennine yellow bellied toad *Bombina pachypus*, with implications for conservation. *Molecular Ecology* 15: 3741–3754.
- Chan K.M.A., Levin S.A. 2005. Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution* 59: 720–729.
- Fijarczyk A., Nadachowska K., Hofman S., Litvinchuk S.N., Babik W., Stuglik M., Gollmann G., Choleva L., Cogălniceanu D., Vukov T., Džukić G., Szymura J. M. 2011. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the European fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* supports their independent histories. *Molecular Ecology* 20: 3381–3398.
- Garcia-Castellanos D., Estrada F., Jiménez-Munt I., Gorini C., Fernández M., Vergés J., De Vicente R. 2009. Catastrophic flood of the Mediterranean after the Messinian salinity crisis. *Nature* 462: 778–81.
- Graf J.-D., Polls Pelaz M. 1989. Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. In: Dawley, R.M., Bogart, J.P. (Eds.), *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*: New York State Museum Bulletin no. 466, Albany, NY, pp. 299–301.
- Harrison J.S., Burton R.S. 2006. Tracing hybrid incompatibilities to single amino acid substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 23: 559–564.
- Hofman S., Szymura J. M. 2007. Limited mitochondrial DNA introgression in a *Bombina* hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 295–306.
- Hofman S., Spolsky C., Uzzell T., Cogălniceanu D., Babik W., Szymura J. M. 2007. Phylogeography of the fire-bellied toads *Bombina*: independent Pleistocene histories inferred from mitochondrial genomes. *Molecular Ecology* 16: 2301–2316.

- Hofman S., Pabijan M., Dziewulska-Szwajkowska D., Szymura J.M. 2012. Mitochondrial genome organization and divergence in hybridizing central European waterfrogs of the *Pelophylax esculentus* complex (Anura, Ranidae). *Gene* 491: 71-80.
- Hofman S., Pabijan M., Osikowski A., Szymura J.M. 2014. Complete mitochondrial genome of the Greek marsh frog *Pelophylax cretensis* (Anura, Ranidae). *Mitochondrial DNA*, DOI: 10.3109/19401736.2014.974158.
- Hofman S., Pabijan M., Osikowski A., Litvinchuk S.N., Szymura J.M. 2015. Phylogenetic relationships among four new complete mitogenome sequences of *Pelophylax* (Amphibia: Anura) from the Balkans and Cyprus. *Mitochondrial DNA*, DOI: 10.3109/19401736.2015.1025266.
- Kurabayashi A., Usuki C., Mikami N., Fujii T., Yonekawa H., Sumida M., Hasegawa M. 2006. Complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of a Malagasy poison frog *Mantella madagascariensis*: evolutionary implications on mitochondrial genomes of higher anuran groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 223–236.
- Lanza B., Vanni S. 1991. Notes on the biogeography of the Mediterranean Island amphibians. (International Symposium on the Biogeographical Aspects of Insularity). *Atti dei Convegni Lincei, Accademia Nazionale dei Lincei*, 85: 335–344.
- Lymberakis P., Poulakakis N., Manthou G., Tsigenopoulos C.S., Magoulas A., Mylonas M. 2007. Mitochondrial phylogeography of *Rana* (*Pelophylax*) populations in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 115–25.
- Montooth K.L., Abt D.N., Hofmann J., Rand D.M. 2009. Comparative genomics of *Drosophila* mtDNA: novel features of conservation and change across functional domains and lineages. *Journal of Molecular Evolution* 69: 94–114.
- Pabijan M., Wandycz A., Hofman S., Węcek K., Piwczyński M., Szymura J. M. 2013. Complete mitochondrial genomes resolve phylogenetic relationships within *Bombina* (Anura: Bombinatoridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 63-74.
- Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S.N. Guex G.-D., Reyer H.-U., Hotz H. 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaerctic water frogs. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 68–681.
- Sumida M., Kanamori Y., Keneda H., Kato Y., Nishioka M., Hasegawa M., Yonekawa H. 2001. Complete nucleotide sequence and gene rearrangement of the Japanese pond frog *Rana nigromaculata*. *Genes and Genetic Systems* 76: 311–325.

- Szarowska M., Hofman S., Falniowski A. 2013. *Vinodolia fiumana* Radoman, 1973 (Caenogastropoda: Rissooidea): Rediscovery and relationships of a species presumed extinct. *Folia Malacologica* 21: 135-142.
- Szarowska M., Hofman S., Osikowski A., Falniowski A. 2014a. *Daphniola* Radoman, 1973 (Caenogastropoda: Truncatelloidea) at east Aegean islands. *Folia Malacologica* 22: 11-20.
- Szarowska M., Hofman S., Osikowski A., Falniowski A. 2014b. *Pseudorientalia* Radoman, 1973 (Caenogastropoda: Rissooidea) on Samos island, Aegean Sea. *Folia Malacologica* 22: 11-20.
- Szarowska M., Hofman S., Osikowski A., Falniowski A. 2014c. Divergence preceding Island formation among Aegean insular populations of the freshwater snail genus *Pseudorientalia* (Caenogastropoda: Truncatelloidea). *Zoological Science* 31: 680-686.
- Szarowska M., Hofman S., Osikowski A., Falniowski A. 2014d. *Heleobia malzani* (Westerlund, 1886) (Caenogastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) from Crete and species-level diversity of *Heleobia* Stimpson, 1865 in Europe. *Journal of Natural History* 48: 2487-2500.
- Szymura J.M. 1993. Analysis of hybrid zones with *Bombina*. W: Harrison R, (red.). Hybrid zones and the evolutionary process. New York, NY: Oxford University Press, 261-289.
- Szymura J.M., Barton N.H. 1986. Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toad, *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution* 40: 1141-1159.
- Szymura J.M., Barton N.H. 1991. The genetic structure of the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*: comparisons between transects and between loci. *Evolution* 45: 237-261.
- Szymura J.M., Uzzell T., Spolsky C. 2000. Mitochondrial DNA variation in the hybridizing fire-bellied toads, *Bombina bombina* and *B. variegata*. *Molecular Ecology* 9: 891-899.
- Tourasse N.J., Li W.-H. 2000. Selective constraints, amino acid composition and the rate of protein evolution. *Molecular Biology and Evolution* 17: 656-664.
- Yanchukov A., Hofman S., Szymura J.M., Mezhzherin S.V., Morozov-Leonov S.Y., Barton N.H., Nürnberger B. 2006. Hybridization of *Bombina bombina* and *B. variegata* (Anura, Discoglossidae) at a sharp ecotone in western Ukraine: comparisons across transects and over time. *Evolution* 60: 583-600.

Zhang P., Liang D., Mao R.-L., Hillis D.M., Wake D.B. Cannatella D.C. 2013. Efficient sequencing of Anuran mtDNAs and a mitogenomic exploration of the phylogeny and evolution of frogs. *Molecular Biology and Evolution* 30: 1899-1915.

b) Omówienie pracy dydaktycznej, organizacyjnej i działalności popularyzującej naukę

W czasie zatrudnienia na Uniwersytecie Jagiellońskim prowadziłem zajęcia w ramach ćwiczeń z Zoologii Kręgowców, Ewolucjonizmu, Histologii, Technik histologicznych oraz zajęć terenowych z Zoologii Kręgowców. Prowadziłem również proseminaria dla studentów III roku Biologii, Biologii-geologii i Ochrony Środowiska. W latach 2009-2010 prowadziłem wykłady i ćwiczenia z zoologii kręgowców w Podhalańskiej Państwowej Wyższej Szkole Zawodowej w Nowym Targu. Byłem opiekunem naukowym ośmiu prac licencjackich i sześciu magisterskich. Kolejne dwie prace licencjackie i dwie magisterskie zostaną ukończone w 2015 roku.

W latach 2008-2012 byłem członkiem Rady Instytutu Zoologii, jako przedstawiciel niesamodzielných pracowników naukowo-dydaktycznych. Byłem również koordynatorem pracowni powstającej w ramach projektu POIS – Rozbudowa i modernizacja infrastruktury dydaktycznej na kierunkach przyrodniczych i ścisłych UJ. Wielokrotnie brałem udział w organizacji Nocy Biologów w Instytucie Zoologii w Krakowie. Brałem również udział w przygotowywaniu materiałów promocyjnych dla Wydziału Biologii i nauk o Ziemi oraz kierunków studiów w roku 2015.

W ramach działalności popularyzującej naukę napisałem trzy artykuły do czasopisma Wszechświat (Hofman 1999, Hofman i Osikowski 2005, Osikowski i Hofman 2005). Jestem również autorem części biologicznej w encyklopediach przeznaczonych dla uczniów szkół podstawowych (Górska A. (red.) i in. 2003) i szkół gimnazjalnych (Gaweł Ł. (red.) i in. 2001) oraz Encyklopedii Popularnej (Karolczuk-Kędzińska M. (red.) i in. 2003). Jestem również autorem tekstu książki „Zwierzęta Świata” (Hofman 2003). Jestem współautorem dwóch podręczników dla szkół ponad gimnazjalnych (Godula i in. 2005; Kędryna i in. 2013). Byłem również członkiem zespołu tłumaczy podręcznika do biologii (Solomon i in. 2007). Wielokrotnie brałem udział w prezentacjach naukowych w ramach Nocy Biologów i Nocy Naukowców w Krakowie. Brałem również udział w organizacji zajęć w ramach „Uniwersytetu dzieci”.

Kraków 18.05.15

Sebastien Hofman