

# AUTOREFERAT

Dr Maciej Krzysztof Konopiński

Instytut Ochrony Przyrody Polskiej Akademii Nauk  
al. Mickiewicza 33, 31-120 Kraków

Kraków, 23 stycznia 2023 r.

## Spis treści:

1. Uzyskane stopnie naukowe.
2. Przebieg zatrudnienia.
3. Problematyka badawcza cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawiane do postępowania habilitacyjnego.
4. Przebieg kariery naukowej
  - 4.1. Dorobek naukowy zdobyty przed uzyskaniem stopnia doktora
  - 4.2. Dorobek naukowy zdobyty po uzyskaniu doktoratu
5. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.
6. Aktywność naukowa w innych jednostkach naukowych.

**Imię i nazwisko:** Maciej Krzysztof Konopiński

ORCID: 0000-0003-0893-0846

Profil Web of Science: <https://www.webofscience.com/wos/author/record/438415>

### **1. Uzyskane stopnie naukowe**

**2008** Doktor nauk biologicznych. Tytuł rozprawy: "Zmienność genetyczna i asymetria fluktuacyjna u niepyłaka mnemosyny (*Parnassius mnemosyne* L.) w Polsce"

Miejsce wykonania: Instytut Ochrony Przyrody PAN,

Promotor: Prof. dr hab. Henryk Okarma.

**1997** Magister biologii, Tytuł pracy: "Rola modzeli godowych u kumaka górskiego (*Bombina variegata* L.)"

Miejsce wykonania: Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Zakład Anatomii Porównawczej.

Promotor: Prof. dr hab. Jacek M. Szymura

### **2. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

I 2019 - do chwili obecnej - pracownik badawczo-techniczny w Zakładzie Ochrony Fauny Instytutu Ochrony Przyrody PAN

XI 2009 - XII 2018, adiunkt w Zakładzie Ochrony Fauny Instytutu Ochrony Przyrody PAN

III 2007 - XI 2009, asystent w Zakładzie Ochrony Fauny Instytutu Ochrony Przyrody PAN

V - X 2001, Marie Curie Fellowship, Universitat de Barcelona, Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, prof. Montserrat Aguade group, Sześciomiesięczny staż naukowy. "Detecting the effects selection on olfactory receptors in *Drosophila melanogaster*." (urlop naukowy w Instytucie Ochrony Przyrody PAN)

VI 2000 - III 2007, pracownik badawczo-techniczny w Zakładzie Ochrony Fauny Instytutu Ochrony Przyrody PAN

X - XII 1998, pracownik techniczny, Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza

### **3. Problematyka badawcza cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe przedstawiane do postępowania habilitacyjnego.**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego:** "Mechanizmy ewolucyjne kształtujące różnorodność genetyczną gatunków w procesie ekspansji"

**b) Lista publikacji składających się na osiągnięcie habilitacyjne:**

(IF – wskaźnik *Impact Factor* z roku publikacji artykułu, według Web of Science; Punkty MNiSW/MEiN według punktacji obowiązującej w chwili składania wniosku, oraz w nawiasie, jeśli w chwili publikacji artykułu punktacja była odmienna; liczba cytowań aktualizowana 15 stycznia 2023)

|           | Publikacja  | IF    | Punkty<br>MNiSW/<br>MEiN | Liczba<br>cytowań |
|-----------|---|-------|--------------------------|-------------------|
| <b>H1</b> | <p><b>Konopiński M.K.</b>, Amirowicz A., Kukuła K. 2007. Probable direction of the postglacial colonization of rivers on northern slopes of the Carpathian Ridge by <i>Barbus carpathicus</i> (Teleostei: Cyprinidae) evidenced by cline of genetic variation. <b>Journal of Fish Biology</b>, 70(Supplement C), 406–415. (DOI: 10.1111/j.1095-8649.2007.01479.x)</p> <p>(praca opublikowana przed obroną doktoratu jednak nie związana z jego tematem)</p> <p><i>Mój wkład w powstanie pracy obejmował zaplanowanie koncepcji badań, wykonanie wszystkich analiz laboratoryjnych, opracowanie statystyczne wyników oraz napisanie publikacji i redagowanie artykułu w odpowiedzi na uwagi recenzentów.</i></p>   | 1,404 | 70 (20)                  | 9                 |
| <b>H2</b> | <p><b>Konopiński M.K.</b>, Amirowicz A., Kotlík P., Kukuła K., Bylak A., Pekarík L., Šediva A. 2013. Back from the Brink: The Holocene History of the Carpathian Barbel <i>Barbus carpathicus</i>. <b>Plos ONE</b>, 8(12): e82464. (DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0082464)</p> <p><i>Mój wkład w powstanie pracy obejmował zaplanowanie koncepcji badań, pozyskanie środków na realizację badań, wykonanie wszystkich analiz laboratoryjnych, opracowanie statystyczne wyników oraz napisanie publikacji i odpowiedzi na uwagi recenzentów.</i></p>   | 3,534 | 100 (40)                 | 5                 |
| <b>H3</b> | <p>Biedrzycka A., <b>Konopiński M.</b>, Hoffman E., Trujillo A., Zalewski A. 2019. Comparing raccoon major histocompatibility complex diversity in native and introduced ranges: Evidence for the importance of functional immune diversity for adaptation and survival in novel environments. <b>Evolutionary Applications</b>, 13:752–767 (DOI: 10.1111/eva.12898)</p> <p><i>Mój wkład w powstanie pracy obejmował opracowanie bioinformatyczne (udział w obróbce danych z sekwencjonowania) i statystyczne wyników (wybór metod statystycznych, napisanie kodu w języku R), oraz napisanie odpowiednich części manuskryptu (udział w pisaniu wstępu i dyskusji, napisanie odpowiednich części w rozdziałach Materiały i metody oraz Wyniki, stworzenie tabeli 2. oraz ryciny 3.), a także udzielenie odpowiedzi recenzentom.</i></p> | 4,013 | 140                      | 4                 |

|           |   |        |                |    |
|-----------|---|--------|----------------|----|
| <b>H4</b> | <p><b>Konopiński M.K.</b>, Fijarczyk A., Biedrzycka A. 2022. Complex patterns shaping immune genes diversity during invasion of common raccoon in Europe – selection in action despite genetic drift. <i>Evolutionary Applications</i>. (DOI: 10.1111/eva.13517)</p> <p><i>Mój wkład w powstanie pracy obejmował planowanie części koncepcji badań, opracowanie bioinformatyczne (udział w obróbce danych z sekwencjonowania) i statystyczne wyników (wybór metod statystycznych, napisanie kodu w języku R), oraz napisanie odpowiednich części manuskryptu (udział w pisaniu wstępu i dyskusji, napisanie odpowiednich części w rozdziałach Materiały i metody oraz Wyniki, stworzenie tabeli 1. i 2. oraz rycin 2., 4., i 6.).</i></p> | 4,929  | 140            | 0  |
| <b>H5</b> | <p><b>Konopiński M.K.</b> Baś G., Bojarska K. 2022. Can attitude toward humans cause isolation? Marked genetic distinction of urban wild boar population. <i>Hystrix. The Italian Journal of Mammalogy</i>. 33(1):34–40. (DOI: 10.4404/hystrix-00459-2021)</p> <p><i>Mój wkład w powstanie pracy obejmował zaplanowanie koncepcji badań, pomoc przy pozyskaniu środków na realizację badań, wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie statystyczne wyników oraz napisanie publikacji (napisanie rozdziałów dotyczących materiałów i metod oraz wyników, współtworzenie wstępu i dyskusji, odpowiedzi na uwagi recenzentów).</i></p>   | 1,796  | 140            | 0  |
| <b>H6</b> | <p><b>Konopiński M.K.</b> 2020. Shannon diversity index: A call to replace the original Shannon’s formula with unbiased estimator in the population genetics studies. <i>PeerJ</i> (8): e9391. (DOI: 10.7717/peerj.9391)</p>  | 2,984  | 100            | 27 |
|           | <b>ŁĄCZNIE</b>  | 18,660 | 690<br>(20+40) | 45 |

## **c) Omówienie celu naukowego i wyników wyżej wymienionych prac**

### **Wstęp**

Liczebność i zasięg populacji dzikich zwierząt podlegają ciągłym zmianom. Skala czasowa tych zmian mieści się w zakresie od czasu mniejszego niż trwanie pojedynczego pokolenia po czas specjacji danego gatunku. Zmianom zasięgu populacji zwykle towarzyszą zmiany w puli genowej, a obserwowany rozkład zmienności genetycznej w obrębie gatunku jest wypadkową demografii, migracji, czynników losowych (mutacje/dryf genetyczny) oraz presji doboru naturalnego. Czynniki te są z sobą powiązane siecią wzajemnych oddziaływań. Demografia i migracje wprost wpływają na natężenie zmian wywołane dryfem genetycznym, oraz mogą wpływać modyfikująco na presję doboru. Dryf genetyczny ogranicza pole działania doboru usuwając niektóre warianty genów, a utrata zmienności w ważnych loci może wpłynąć na liczebność populacji. Dobór naturalny natomiast może zarówno przyczyniać się do ograniczenia liczebności populacji poprzez zwiększenie frekwencji/utrwalenie korzystnych i eliminowanie niekorzystnych wariantów (dobór kierunkowy i negatywny) lub do zwiększenia zmienności poprzez utrzymywanie wielu korzystnych wariantów (dobór równoważący). Z kolei wzrost dostosowania ułatwia ekspansję do nowych obszarów czy nisz ekologicznych.

W Europie Środkowej liczebność i rozmieszczenie gatunków zostały ukształtowane przez trzy główne czynniki: uwarunkowania historyczne (np. zmiany klimatyczne w Plejstocenie i Holocenie), zmiany zasięgu innych gatunków oraz działalność człowieka. Czynniki te niekiedy przyczyniały się do ekspansji, ale mogły też powodować redukcję liczebności, ograniczenie zasięgu lub nawet ekstynkcję całego gatunku. Ponadto, wpływ wymienionych czynników mógł ulegać zmianom na przestrzeni czasu.

Zasięg gatunku jest zależny od dostępności odpowiednich siedlisk oraz od obecności barier ograniczających rozprzestrzenianie się. Populacje na granicy zasięgu często żyją w warunkach suboptymalnych, dlatego często mają niższą liczebność niż te w centrum zasięgu [Pierce i in. 2017; Wereszczuk i in. 2017]. Zarówno ograniczona liczebność, jak i historia ekspansji do obecnych granic zasięgu sprawiają, że zmienność genetyczna w takich populacjach jest na ogół niższa niż w populacjach z centrum zasięgu [Gratton i in. 2008]. Obniżony poziom zmienności genetycznej ogranicza potencjał ewolucyjny na

skraju zasięgu, co może stanowić dodatkową przeszkodę w zajmowaniu kolejnych stanowisk poza obecnym zasięgiem [Hoffmann, Blows 1994]. Co więcej geny przynieszone przez migrantów z głębi zasięgu nie koniecznie zwiększają dostosowanie potomstwa w warunkach panujących na jego granicy.

## **Cel naukowy**

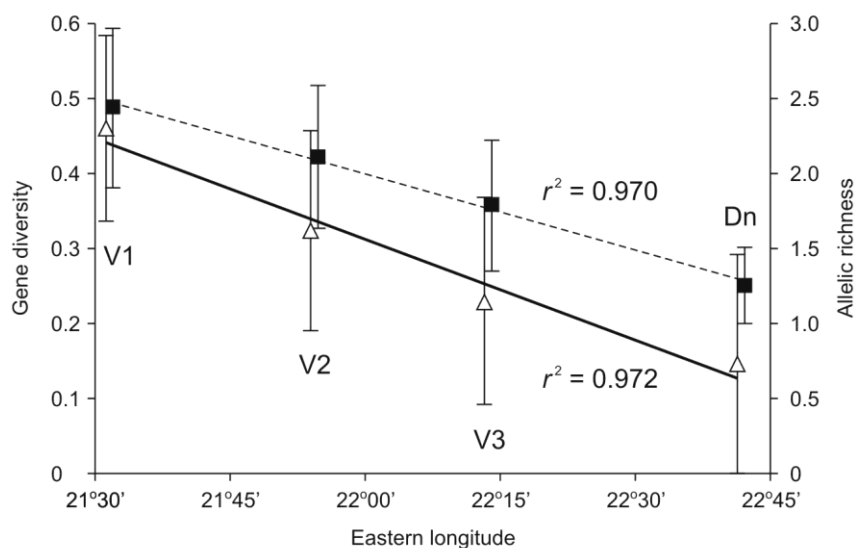
Celem badań wchodzących w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego było zbadanie mechanizmów ewolucyjnych kształtujących poziom zmienności genetycznej u gatunków dokonujących ekspansji. Przedstawione publikacje opisują genetyczny kontekst rozszerzania zasięgu w szerokiej skali czasowej - od postglacjalnej ekspansji u brzanki, po współczesne ekspansje szopa pracza w zasięgu inwazyjnym i dzika na terenach miejskich. Dzięki temu moje osiągnięcie, oprócz opisanie teoretycznych mechanizmów kształtujących zmienność genetyczną w tych specyficznych układach, ma również aspekt praktyczny. W skład osiągnięcia wchodzi również praca metodyczna, w której zbadałem właściwości miary poziomu zmienności - indeksu Shannona i zaproponowałem funkcję do obliczania indeksu na podstawie danych genetycznych. Stosowanie precyzyjnych i odpornych na błędy miar zmienności ma duże znaczenie w badaniach w dziedzinie genetyki populacyjnej.

## **Wyniki badań**

Ekspansja gatunków bywa ograniczona przez ukształtowanie terenu. W przypadku ryb słodkowodnych, przemieszczających się wzdłuż korytarzy wyznaczonych przez cieki wodne, barierę w migracji, a co za tym idzie barierę w przepływie genów stanowią wododziały. Rozprzestrzenianie się osobników mogą również ograniczać przeszkody znajdujące się w biegu rzeki. O ile oczywistą przeszkodą są np. duże wodospady, czy odcinki o bardzo szybkim nurcie, to odcinki nizinne o spokojnym nurcie nie wydają się stanowić silnej przeszkody dla migracji ryb. W pracach H1 i H2 opisałem rozkład zmienności genetycznej u brzanki (*Barbus carpathicus*), który wskazuje na istnienie właśnie takiej bariery dla osobników tego gatunku. Pracę, która stała się załącznikiem osiągnięcia habilitacyjnego opublikowałem jeszcze przed obroną doktoratu jednak nie miała ona żadnego związku z tematem rozprawy doktorskiej (**publikacja H1**: Konopiński i in. 2007). W czasie badań nad hybrydowym pochodzeniem opisywanego

przez niektórych autorów gatunku brzany karpackiej (*Barbus waleckii*) zaobserwowałem znaczne różnice w poziomie zmienności pomiędzy populacją brzany (*B. barbus*) oraz brzanki (*B. carpathicus*). Spośród 9-ciu loci polimorficznych u brzany oraz mieszańców, jedynie cztery loci były polimorficzne u brzanki. Mimo niewielkiej liczby dostępnych loci dało się zaobserwować **wyraźny gradient zmienności przejawiający się postępującym spadkiem różnorodności genetycznej** z zachodu na wschód w populacjach z dorzecza Wisły oraz w Dniestrze (Rys. 1). W dorzeczu Wisły dystans genetyczny (strunowy dystans Cavalli-Sforzy) był skorelowany z odległością pomiędzy populacjami liczoną wzdłuż cieków wodnych, co może świadczyć, że głównym mechanizmem w rozprzestrzenianiu się brzanki w tym dorzeczu były migracje przez nizinne odcinki rzek, a nie kaptáže (zmiana biegu rzeki do innej zlewni), które z kolei są najbardziej prawdopodobnym mechanizmem pokonywania wododziałów. Wyniki moich badań pokazały również, że **naturalne, niezmienione rzeki nizinne mogą być poważną barierą dla migracji niektórych gatunków ryb nawet na stosunkowo krótkich odcinkach**. Tak ostry spadek zmienności będący skutkiem naturalnych procesów na tak małym obszarze nie był wcześniej opisywany w europejskiej ichtiofaunie. W pracy, która powstała jako efekt tych badań sformułowałem hipotezę, że obserwowany wzór zmienności genetycznej to fragment większego wzoru jaki powstał w skutek postgacjalnej ekspansji brzanki.

Aby przetestować hipotezę postwioną w pierwszej pracy pozyskałem środki na przeprowadzenie badań w całym zasięgu brzanki (Grant MNISW nr NN 304 229035 realizowany we współpracy z dr hab. Antonim Amirowiczem oraz prof. dr hab. Krzysztofem Kukułą). Nawiązałem również współpracę z badaczami z Czech (Petr Kotlik) i Słowacji (Alena Sediva i Ladislav Pekarik). Efektem realizacji tego grantu jest **publikacja H2** (Konopiński i in. 2013). W badaniach wykorzystałem polimorfizm długości 9-ciu loci mikrosatelitarnych oraz zmienność sekwencji 3 genów mitochondrialnych (oksydazy cytochromowej, ATPazy podjednostki 6. i 8. oraz dehydrogenazy NADH podjednostki 2) łącznie obejmujących ok. 15 % genomu mitochondrialnego. Analizę zmian demograficznych przeprowadziłem przy użyciu programu Beast, który wykorzystuje metodę Bayesa oraz teorię koalescencji do odtworzenia przebiegu zmian liczebności

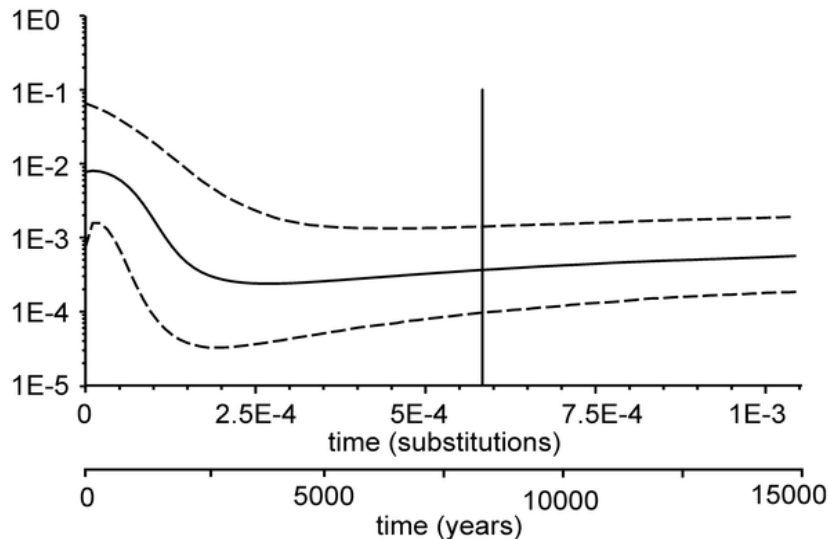


Rys. 1. Klin zmienności obserwowany w czterech kolejnych populacjach brzanki (rysunek 3. z publikacji nr 1). Białe trójkąty/linia ciągła - różnorodność genetyczna Nei'ego; czarne kwadraty/linia przerywana - bogactwo alleli; wąsy - błąd standardowy.

populacji na podstawie obecnej różnorodności sekwencji. Strukturę genetyczną populacji analizowałem na podstawie rozmieszczenia zmienności genetycznej loci mikrosatelitarnych. Interpretacja uzyskanych wyników pozwoliła mi wykazać, że refugia glacialne brzanki znajdowały się w południowo wschodniej części zlewni Cisy. Populacje z rumuńskich rzek Someș i Iza charakteryzował najwyższy poziom zmienności, a wszystkie pozostałe stanowiska miały obniżony poziom zmienności w stosunku do tych dwóch populacji. **Klin zmienności dało się obserwować zarówno w kolejnych dopływach Cisy jak i pomiędzy Dunajcem, który był prawdopodobnie pierwszą rzeką zasiedloną przez brzankę po północnej stronie Karpat, a kolejnymi dopływami Wisły znajdującymi się na wschód i zachód od Dunajca.** Nie jest jasne jaki mechanizm odpowiada za rozprzestrzenianie się gatunków ryb przez wododziały. Aby skolonizować obecny zasięg brzanka przynajmniej kilkukrotnie pokonywała barierę wododziału. Co więcej, w obecnym zasięgu brzanki można znaleźć ślady przynajmniej dwóch fal ekspansji - populacje brzanki znajdujące się w 3 skrajnych lokalizacjach poza zlewnią Cisy, choć są rozdzielone populacjami wyraźnie od nich odmiennymi, posiadają te same haplotypy mitochondrialne i są grupowane przez algorytmy przypisania (program Structure). **Czas do najbliższego wspólnego przodka (tMRCA) całego gatunku *B. carpathicus* został określony na ok. 7 tys. lat, a więc na początek holocenu** (Rys. 2). Niski poziom zmienności u brzanki jest prawdopodobnie



efektem wąskiego gardła demograficznego, które miało miejsce w tamtym czasie. Podobne zjawisko zostało wcześniej opisane u gepardów [Menotti-Raymond, O'Brien 1993], jednak publikacja H2 jest pierwszym przykładem w ichtiofaunie europejskiej.



Rys. 2. Wykres *Bayesian Skyline* dynamiki zmian demograficznych populacji brzanki (rysunek 6. z publikacji nr 2). Krzywe pokazują relatywne zmiany efektywnej wielkości populacji (przerwanymi liniami pokazany jest 95% przedział ufności, linią ciągłą mediana) w stosunku do czasu liczonego w liczbie podstawień oraz w latach do chwili obecnej. Pionowa linia - mediana oszacowania czasu do najbliższego wspólnego przodka.

Publikacje H1 i H2 dotyczą gatunku, który dokonał ekspansji w czasach historycznych. Obecnie, ze względu regulację i przegradzanie rzek oraz zanieczyszczenia środowiska, brzanka jest uznawana za gatunek narażony (kategoria IUCN: VU). Mimo, że zasięgi wielu gatunków ulegają ograniczeniu w skutek przekształcania środowiska przez ludzi, zdarza się, że to właśnie dzięki działalności człowieka gatunki się rozprzestrzeniają. Przenoszenie zwierząt między odległymi terenami bywa początkiem ekspansji w nowym środowisku. Gatunki przeniesione przez człowieka, które rozprzestrzeniają się na nowych terenach i wywierają negatywny wpływ na rodzime ekosystemy nazywamy inwazyjnymi gatunkami obcymi (IGO). Posiadają one cechy, które umożliwiają im ekspansję w obcym dla nich miejscu. Nie zostały wyposażone w toku koewolucji w elementy dostosowania do nowych warunków środowiskowych, a mimo to ich rozprzestrzenianie postępuje bardzo szybko. Wiele populacji gatunków inwazyjnych zostało założonych z niewielkiej grupy osobników. W takich sytuacjach efekt założyciela i dryf genetyczny mogą znacznie ograniczyć zmienność genetyczną w populacji założycielskiej, zaś obniżony poziom zmienności może niekorzystnie wpływać na

dostosowanie osobników. Jeśli mimo to gatunek zachowuje zdolność do ekspansji i staje się gatunkiem inwazyjnym, można postawić hipotezę, że zachował on poziom zmienności w loci umożliwiającą adaptację, lub też zmienność ta nie jest konieczna. Genami, które powinny mieć znaczenie dla funkcjonowania w nowym siedlisku, są te związane z odpowiedzią immunologiczną. Gatunek inwazyjny wchodzi w kontakt z patogenami, z którymi nie miał wcześniej styczności, a więc geny układu odpornościowego nie miały szansy się do nich dostosować. Dodatkowo zmienność genów związanych z odpornością mogła ulec ograniczeniu w procesie powstawania populacji inwazyjnej. Z drugiej strony, według hipotezy uwolnienia od wrogów, brak w zasięgu inwazyjnym patogenów z naturalnego zasięgu mogłaby pozwolić na ograniczenie inwestycji w odporność i również ograniczenie presji doboru. We współpracy z dr hab. Aleksandrą Biedrzycką podjąłem badania nad poziomem zmienności w genach immunologicznych w europejskiej populacji szopa pracza (*Procyon lotor*), czego efektem są publikacje H3 i H4 (Biedrzycka i in. 2020 oraz Konopiński i in. 2022). Inwazyjna populacja szopa istnieje w Europie od niecałych 100 lat. Początek populacji środkowoeuropejskiej dały osobniki, które zostały celowo wypuszczone w latach 30-tych XX wieku w Niemczech. Od tego czasu doszło do kilku kolejnych introdukcji [Biedrzycka i in. 2014; Fischer i in. 2017]. Populacja niemiecka stopniowo zaczęła rozszerzać zasięg w wielu kierunkach, a front ekspansji na wschód dotarł do Polski.

**Publikacja H3** dotyczy zmienności w genach głównego kompleksu zgodności tkankowej (MHC). Są to geny odpowiedzialne za powstawanie specyficznej adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej kręgowców. Na ogół charakteryzuje je bardzo wysoki poziom zmienności. Loci są zwykle wielokrotnie zduplikowane, z różną liczbą kopii u osobników tego samego gatunku. U niektórych gatunków, np. ptaków wróblowych pojedynczy osobnik może mieć nawet kilkadziesiąt alleli [np. Biedrzycka i in. 2017]. Do odczytania sekwencji genu MHC-DRB szopa pracza wykorzystaliśmy masowe sekwencjonowanie przy użyciu systemu Illumina. Analizie poddaliśmy fragment 184 par zasad egzonu drugiego, który koduje aminokwasy odpowiedzialne za rozpoznawanie antygenów. Jako punkt odniesienia dla zmienności funkcjonalnej genu MHC-DRB użyliśmy neutralnej zmienności w dziewięciu loci mikrosatelitarnych. Wykazaliśmy, że **populacja europejska posiada znacznie niższy niż populacja**

**amerykańska poziom zmienności na poziomie allelicznym w badanym fragmencie genu MHC-DRB** (Tabela 1). Mimo, że liczba zbadanych próbek z populacji inwazyjnej była o rząd wielkości wyższa ( $N = 317$ ) niż tych z populacji rodzimej ( $N = 21$ ), liczba znalezionych alleli populacji europejskiej była niższa niż w próbkach od szopów z Florydy (odpowiednio 20 alleli i 32 allele). Jeszcze większą różnicę zaobserwowaliśmy w bogactwie alleli ( $A_R$ ), które pozwala uwzględnić liczebność próby - w populacji inwazyjnej wyniosło ono 8,83 podczas gdy w populacji rodzimej było ponad dwa razy wyższe i wyniosło 22,06. Różnorodność nukleotydowa sekwencji w obu populacjach była zbliżona, co oznacza, że **populacja europejska, mimo mniejszej liczby alleli w badanych loci, zachowała allele o dużym zróżnicowaniu sekwencji**. W populacjach inwazyjnych najwyższa  $A_R$  została znaleziona w środkowych Niemczech ( $A_R = 9,00$  w populacji D2) a najniższa w najdalej wysuniętej na wschód populacji PL2 ( $A_R = 5,72$ ). **Ten spadek poziomu zmienności odzwierciedla proces ekspansji szopów, których zasięg obecnie rozszerza się gwałtownie na wschód**. Aby wyjaśnić, jak spadek liczby alleli wpływa na funkcjonalne warianty genu, stworzyłem model, przy pomocy którego porównano rzeczywisty rozkład tzw. supertypów w populacjach do symulowanego rozkładu losowego.

Tabela. 1. Różnorodność genetyczna w rodzimej i inwazyjnych populacjach szopa pracza (Tabela 1 z publikacji H4).

|    | N  | Polimorficzne SNP | Polimorficzne geny | $D$ Tajimy Syn       | $D$ Tajimy NS        | $\pi$ Syn                 | $\pi$ NS              |
|----|----|-------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| FL | 27 | 76,1 %            | 98,1 %             | -0,4044<br>(0,82668) | -0,4568<br>(0,93030) | 0,00065<br>(0,000577<br>) | 0,00053<br>(0,000817) |
| CE | 30 | 44,5 %            | 90,0 %             | -0,0026<br>(0,83217) | 0,2390<br>(1,01521)  | 0,00050<br>(0,000591<br>) | 0,00049<br>(0,000678) |
| CZ | 30 | 30,0 %            | 76,4 %             | 0,6147<br>(0,97675)  | 0,3981<br>(1,15200)  | 0,00043<br>(0,000664<br>) | 0,00045<br>(0,000818) |

N – Liczba osobników, Polimorficzne SNP i geny - udział polimorficznych SNP/genów względem wszystkich badanych SNP/genów,  $D$  Tajimy Syn/NS - średnie  $D$  Tajimy w obrębie badanych populacji.  $\pi$  Syn and  $\pi$  NS – średnia synonimowa i niesynonimowa różnorodność nukleotydów w obrębie badanych populacji. Odchylenia standardowe  $D$  Tajimy oraz  $\pi$  w nawiasach.

Supertypy MHC to grupy alleli kodujące białka, które w miejscu przyłączania antygenów posiadają zbliżoną pod względem biochemicznym sekwencję aminokwasów, przez co wszystkie wersje allelu należące do jednego supertypu wykrywają podobny rodzaj antygenów, odmienny od antygenów wykrywanych przez pozostałe supertypy. Wśród wykrytych przez nas alleli znaleźliśmy 10 supertypów liczących od 2 do 16 alleli. Liczba supertypów wykrytych w osobnikach mieściła się w zakresie od dwóch do czterech w populacji florydzkiej oraz od dwóch do sześciu w populacjach europejskich. Średnia liczba alleli i supertypów w przeliczeniu na osobnika wynosiła odpowiednio 3,13 i 2,51 w populacji rodzimej oraz 3,43 i 2,81 w populacjach inwazyjnych. W wyniku symulacji udało się stwierdzić, że w populacjach niemieckich i polskich liczba supertypów w osobnikach jest wyższa niż wynikałoby to z rozkładu losowego alleli, jednak jest niższa niż w symulacjach zakładających istnienie sprzężeń między allelami. Oznacza to, że **u szopów istnieją mechanizmy, które promują genotypy bardziej zróżnicowane pod względem liczby supertypów**. Choć natura tych mechanizmów jest nieznana można podejrzewać, że allele należące do różnych supertypów są z sobą sprzężone. Nie można jednak wykluczyć, że wewnątrzosobnicza różnorodność supertypów wynika z nielosowego krzyżowania się osobników. Oba te mechanizmy prowadzą jednak do podobnego efektu, który sprzyja utrzymywaniu się wysokiego poziomu funkcjonalnej zmienności genetycznej, w tym przypadku pozwalającego na związanie większej liczby antygenów pochodzących od patogenów napotykanym w zasięgu inwazyjnym. Zjawisko to, umożliwiające szerszą odpowiedź immunologiczną, powinno potencjalnie ułatwić ekspansję gatunku na dalsze tereny.

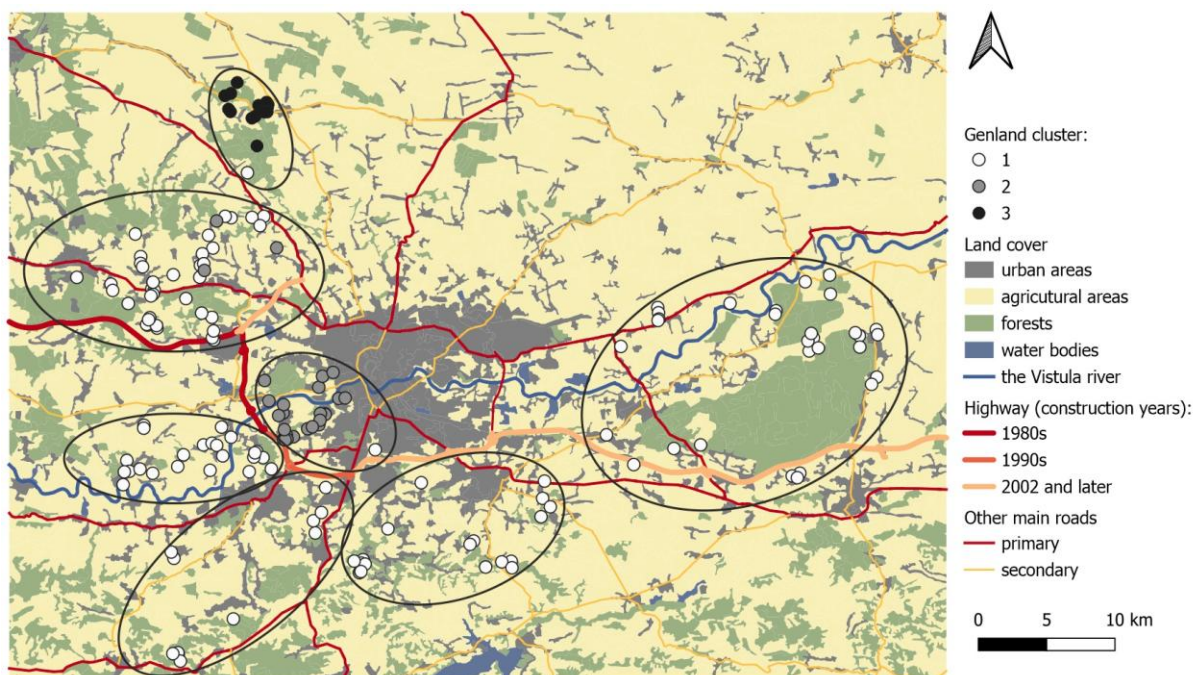
W ramach kontynuacji badań nad genami immunologicznymi szopa pracza wzięłam udział w realizacji kolejnych badań wraz dr hab. Aleksandrą Biedrzycką (we współpracy z dr Anną Fijarczyk z Université Laval w Kanadzie). Celem projektu było określenie jak zmienia się presja doboru naturalnego w nowym zasięgu gatunku. Efektem tych prac jest **publikacja H4**. Na podstawie transkryptomów pozyskanych od 4 osobników zaprojektowaliśmy zestaw sond do metody sekwencjonowania metodą MIP (ang. *molecular inversion probes*) fragmentów egzonów 254 genów związanych z systemem odpornościowym szopa pracza. Do analiz wykorzystaliśmy sekwencje 27 osobników z populacji amerykańskiej (FL) oraz po 30 osobników z populacji czeskiej (CZ) oraz niemiecko-polskiej (CE). W analizach posłużyliśmy się tradycyjnymi metodami jak test

Tajimy, czy zmiany różnorodności nukleotydowej, jak również analizami obserwacji odstających (ang. *outlier analysis*) w programach *pcadapt* i *FLK*. Pierwotny zestaw 254 fragmentów genów został odfiltrowany na dwa sposoby. Do obliczeń Tajimy *D* oraz różnorodności nukleotydowej aby uzyskać wiarygodny wynik wykorzystaliśmy wyłącznie fragmenty o długości niemniejszej niż 150 par zasad oraz zawierające przynajmniej 3 miejsca polimorficzne, co dało 624 miejsca polimorficzne (SNP) zawarte w 110 genach. Do analiz obserwacji odstających w programach *FLK* i *pcadapt* odfiltrowaliśmy wszystkie miejsca polimorficzne zawierające mniej niż 3 allele, przez co pozostało 423 miejsca polimorficzne zawarte w 154 genach. Podobnie jak w przypadku genów MHC, badane geny miały **ogólnie niższy poziom zmienności w populacjach inwazyjnych niż w oryginalnym zasięgu**. Różnice były widoczne w niższej liczbie SNP i mniejszej proporcji polimorficznych genów u europejskich szopów. Populacja CZ ponownie charakteryzowała się najniższym poziomem zmienności spośród wszystkich zbadanych. Badana przez nas czeska populacja szopa została założona na początku XXI wieku przez osobniki, które uciekły z jednej hodowli. Jest to kolejne potwierdzenie wpływu efektu wąskiego gardła przy tworzeniu się populacji inwazyjnych szopa. Co ciekawe utrata zmienności **w populacji CE, która prawdopodobnie powstała w skutek wymieszania osobników z kilku niezależnych introdukcji** [Biedrzycka i in. 2014; Fischer i in. 2017], **w większym stopniu dotyczyła miejsc synonimowych niż niesynonimowych**. Mogłoby to świadczyć, że dobór naturalny utrzymuje w populacji zmienność funkcjonalną, mimo, że dryf genetyczny pozbawił ją zmienności neutralnej. We wszystkich badanych populacjach wartości *D* Tajimy dla większości genów nie odbiegały istotnie od zera, czyli nie wykazywały wpływu ani procesów demograficznych ani działania doboru naturalnego. Widoczne jednak były pewne, nieoczywiste wzorce w rozkładzie *D*. W amerykańskiej populacji szopa wartości *D* częściej były niższe od zera niż w populacjach europejskich. Taki wynik może wskazywać na ekspansję populacji lub na działanie doboru negatywnego, który usuwa większość nowych wariantów, przez co występują one w niskiej częstości. Ponieważ populacja ta jest od lat stabilna, można ten wynik uznać za efekt działania doboru. Co ciekawe, geny o wartościach  $D < -1$  w amerykańskiej populacji często były monomorficzne w populacjach inwazyjnych, a utrwalony allel był najliczniejszym w populacji rodzimej. Wysunęliśmy hipotezę, że takie **genetyczne oczyszczanie z niekorzystnych wariantów genów poprzez dryf genetyczny w chwili zakładania populacji inwazyjnej może być korzystne dla**

**gatunku inwazyjnego** ułatwiają osobnikom dalszą ekspansję. Wysokie wartości  $D$  Tajimy oraz różnorodności nukleotydydowej w populacji CE, mimo obserwowanej ekspansji, która powinna prowadzić do spadku  $D$  są prawdopodobnie skutkiem krzyżowania się osobników sprowadzonych z różnych części zasięgu naturalnego. Na podstawie różnorodności nukleotydydowej oraz wartości  $D$  Tajimy zidentyfikowaliśmy sześć genów, które przejawiały wzór zmienności typowy dla działania doboru naturalnego. Mimo utraty zmienności w populacjach europejskich, **wzór zmienności w tych genach w większości wskazywał na działanie doboru równoważącego**. Pod wpływem doboru równoważącego znajdowały się geny należące do trzech grup: receptory *toll-like*, cytokiny oraz związane z cytokinami geny odpowiedzialne za powstawanie stanu zapalnego. Są to geny odporności wrodzonej, która jest pierwszą linią obrony jeszcze przed wykształceniem odporności nabytej. Wykazaliśmy w ten sposób, że nie tylko zmienność adaptacyjna (locus MHC-DRB) ale również odporność wrodzona ma znaczenie w czasie szybko postępującej ekspansji gatunku inwazyjnego.

Procesy ekspansji oraz inwazji mają miejsce nie tylko w dużej skali przestrzennej (regionów, kontynentów). Ekspansja dzików (*Sus scrofa*) w miastach, podobnie jak rozprzestrzenianie się szopa pracza w Europie ma związek z działalnością ludzką, jednak w przeciwieństwie do ekspansji szopa, jest to powrót gatunku na dawniej zajmowane tereny, a nie wprowadzenie do nowego środowiska. Zajmowanie przez człowieka coraz większych obszarów zmusza gatunki dzikie do wycofania się lub adaptacji do panujących warunków. Rekolonizacja terenów miejskich przez gatunki dzikie została zaobserwowana w wielu miejscach na świecie i można się spodziewać, że gatunków takich będzie przybywać. Piąta praca przedstawionego osiągnięcia habilitacyjnego dotyczy ekspansji populacji dzika na obszarze dużego miasta (**publikacja H5**: Konopiński i in. 2022). W skutek presji ze strony człowieka dziki zostały wyparte z obecnych terenów miejskich w wielu miejscach na świecie. Współczesna populacja dzika w Krakowie ma swoje początki w latach dziewięćdziesiątych XX wieku, kiedy ponownie zaczęto obserwować dziki w zachodniej części miasta. W tamtym czasie zbudowano obwodnicę miasta od strony zachodniej, a później południowej, co ograniczyło podmiejskim populacjom dostęp do terenów miejskich. Mimo to liczebność dzików w Krakowie w dalszym ciągu się zwiększa. Obwodnica autostradowa nie stanowi szczelnej bariery - pod estakadami nad Wisłą i

Rudawą istnieją szerokie przejścia łączące tereny miejskie z podmiejskimi, a dziki były wielokrotnie obserwowane na wiaduktach nad autostradą. W celu zbadania czy trwająca ekspansja demograficzna wynika z imigracji, czy jest wyłącznie efektem rozwijania się populacji miejskiej, przeprowadziłem badania genetyczne próbek pobranych od osobników upolowanych na terenie miasta oraz terenach otaczających Kraków. Badania te były częścią projektu "Kolonizacja obszarów miejskich przez dziki - problemy ekologiczne i społeczne" (grant nr N N304 382138), którego byłem wykonawcą odpowiedzialnym za część związaną z analizami genetycznymi. Analizując polimorfizm 12 loci mikrosatelitarnych wykazałem, że **populacja miejska jest odizolowana od populacji podmiejskich** (Rys. 3). Odrębność populacji krakowskiej kontrastuje z niską różnorodnością międzypopulacyjną osobników zamieszkujących tereny podmiejskie wyrażoną w niskim  $F_{ST}$ , brakiem rozgraniczenia populacji w analizie głównych składowych w testach przypisania (ang. *assignment tests*). Na terenie Krakowa nie stwierdzono genotypów podobnych do tych występujących poza miastem, natomiast kilka genotypów zbliżonych do krakowskich wykryto na terenach na zachód od Krakowa.



Rys. 3. Przestrzenna struktura genetyczna populacji dzika w Krakowie i na terenach otaczających (Rycina 4 z publikacji H5). Wyniki testu przypisania wykonanego w programie *Genland* dla zakładanej liczby populacji  $K = 3$ .

Ponieważ obwodnica może być pokonywana przez dziki, a te z kolei nie są zwierzętami terytorialnymi, wydaje się, że istnieje jakiś inny mechanizm powodujący izolację populacji miejskiej. Drugą najbardziej odmienną populacją na badanym obszarze jest ta zamieszkująca tereny Ojcowskiego Parku Narodowego (OPN). Jest to stosunkowo niewielki obszar sąsiadujący z terenami o podobnym charakterze przyrodniczym. To co z pewnością odróżnia OPN od pobliskich terenów, to nasilona obecność ludzi. Park narodowy skupia ogromne zainteresowanie i jest odwiedzany przez setki tysięcy turystów rocznie. Na tej podstawie sformułowałem hipotezę, że to właśnie **oswojenie się z bliskością ludzi stanowi czynnik prowadzący do behawioralnej izolacji dzików żyjących w pobliżu siedzib ludzkich.**

Ostatnią publikacją mojego osiągnięcia habilitacyjnego jest praca teoretyczna dotycząca jednej z miar stosowanych przy określaniu poziomu zmienności genetycznej - wskaźnika różnorodności Shannona (ang. *Shannon Diversity Index*; **publikacja H6**, Konopiński 2020). Procesowi ekspansji często towarzyszy powstawanie różnic w poziomie zmienności genetycznej. Przykłady takich różnic można znaleźć we wszystkich publikacjach wchodzących w skład przedstawionego cyklu. Aby wykryć istnienie różnic należy zastosować miarę, która pozwoli w wiarygodny sposób określić zmienność w populacjach. Istnieje wiele wskaźników poziomu zmienności. Współczynnik różnorodności Shannona ( $H$ ) należy do miar obliczonych na podstawie frekwencji alleli w populacji. Stworzony został w połowie XX wieku przez Claude'a Shannona z myślą o analizie informacji [Shannon 1948]. Indeks różnorodności bardzo szybko zyskał popularność w naukach biologicznych i stał się jedną z najczęściej stosowanych miar różnorodności biologicznej [Pielou 1966]. Wraz z rozwojem genetyki populacyjnej zaczął być również wykorzystywany do oceny poziomu różnorodności genetycznej. Kiedy zaczęto badać jego właściwości okazało się, że oryginalny wzór na wskaźnik Shannona  $H'$  (w pracy oznaczony  $H_{MLE}$ ) jest wrażliwy na wielkość próby i przy małej próbie wynik jest zaniżony. W 1977 roku Zahl opublikował nowy sposób obliczania wskaźnika Shannona niewrażliwy na wielkość próby (Zahl, 1977, w mojej pracy oznaczony  $H_Z$ ). W ostatnich latach opublikowano dwie kolejne metody obliczania nieobciążonego współczynnika Shannona: Chao and Shen, 2003 ( $H_{CS}$ ) oraz Chao et al., 2013 ( $H_{Chao}$ ). Mimo tych odkryć w najpopularniejszych programach do genetyki populacyjnej wciąż stosuje się tradycyjny wzór na obliczanie indeksu Shannona.



Postanowiłem zbadać jak poziom zmienności wpływa na oszacowanie  $H$  dla prób różniących się wielkością. Dane do analiz wygenerowałem przy pomocy programu *fastsimcoal2* [Excoffier i in. 2021]. Ponieważ nie znalazłem żadnej funkcji, która pozwoliłaby obliczyć wszystkie 4 estymatory indeksu Shannona na podstawie danych genetycznych stworzyłem własną funkcję, którą opublikowałem w serwisie GitHub (<https://github.com/konopinski/Shannon>). Obliczone indeksy porównałem z wartością parametryczną obliczoną na podstawie wszystkich osobników w populacji. Zgodnie z przewidywaniami, że **oryginalny wzór na indeks Shannona ( $H_{MLE}$ ) prowadzi do niedoszacowania indeksu** - mediana względnego odchylenia oszacowania wynosiła ponad -20% w najmniejszej próbie. Estymatory nieobciążone charakteryzowały się znacznie mniejszym odchyleniem. W przypadku estymatorów  $H_Z$  i  $H_{Chao}$  błąd systematyczny był bardzo mały i bardziej widoczny jedynie przy obliczeniach na podstawie najmniejszych prób. Aby ocenić jak poszczególne parametry zmienności genetycznej wpływają na oszacowanie indeksu Shannona zastosowałem uogólniony model liniowy, w którym, jako zmienne, uwzględniłem wielkość próby, limit liczby alleli w locus, tempo mutacji, oraz heterozygotyczność, które odniosłem do średniego względnego błędu kwadratowego ( $MRLE$ ). **Przy małej próbie największy wpływ na błąd miała maksymalna liczba alleli w locus** - loci o potencjalnie dużej liczbie alleli charakteryzowały się większym błędem. Jest to skutkiem "pominięcia" w pobranej próbie alleli występujących w małych frekwencjach co prowadzi do zaniżenia oszacowania. Efekt liczby alleli najlepiej był widoczny w przypadku oryginalnego estymatora. **Przy dużych próbach błąd był bardzo mały jednak w wyższym stopniu zależał on od tempa mutacji niż od liczby alleli w locus**. Prawdopodobnie wynika to z większej liczby nowych wariantów pojawiających się w skutek mutacji, a tym samym występujących w małej frekwencji. Większość symulowanych populacji przeszła przez wąskie gardło liczebnościowe, co musiało doprowadzić do utraty części zmienności. Co ciekawe efekt ten był najbardziej widoczny w przypadku estymatora nieobciążonego  $H_{CS}$ . W pracy wykazałem, że korzystanie z oryginalnego estymatora w badaniach genetycznych jest błędem, gdyż z wyjątkiem bardzo dużych wielkości prób (rzędu setek osobników z populacji) oryginalne równanie niepoprawnie szacuje wielkość indeksu Shannona.

## Podsumowanie

Prace wchodzące w skład przedstawianego przeze mnie osiągnięcia habilitacyjnego prezentują wyniki badań nad genetycznymi aspektami ekspansji trzech różnych gatunków. Wykazały one duże zróżnicowanie zjawiska ekspansji na poziomie molekularnym. Ekspansje następowały w różnych okresach, z różną prędkością i różne były przyczyny ekspansji jednak we wszystkich przypadkach zwiększanie zasięgu wiązało się z utratą zmienności genetycznej. Mimo to dwa spośród badanych gatunków - szopa pracz i dzik - doskonale sobie radzą w swoich nowych zasięgach i środowiskach, a brzanki zagrożone są głównie działalnością człowieka, a nie skutkami utraty zmienności. Badania, które przeprowadziłem na brzankach wykazały, że populacje skrajne posiadają bardzo niski poziom zmienności, co jest skutkiem ekspansji, która nastąpiła po ekstremalnym spadku liczebności na przełomie holocenu i plejstocenu. Rozprzestrzenianie się brzanki nie zostało zahamowane przez brak zmienności. Można podejrzewać, że w populacjach refugialnych zachowana została zmienność w genach kluczowych dla utrzymania dostosowania osobników.

Przykład szopa pracza pokazuje, że mogą istnieć mechanizmy ewolucyjne mogące powstrzymać spadek zmienności w loci będących pod wpływem doboru. Zarówno w genach MHC jak i w niektórych genach odpornościowych z innych grup u szopa pracza zachowana różnorodność pozwala na skuteczną obronę przed patogenami napotykanymi w nowym zasięgu. Wobec postępującego ocieplenia klimatu następują zmiany zasięgu różnych patogenów [Altizer i in. 2013], skutkiem czego gatunki będą musiały się konfrontować z wirusami, bakteriami czy pasożytami, których nie miały wcześniej szansy spotkać. Dlatego badania takie jak te nad ekspansją populacji szopa mogą okazać się przydatne, aby zrozumieć jaki rodzaj zmienności jest istotny dla długotrwałego przetrwania gatunku w zmieniającym się środowisku. Paradoksalnie badania gatunków ekspansywnych i inwazyjnych mogą zostać również wykorzystane w aktywnej ochronie gatunków zagrożonych. Poznanie mechanizmów kształtujących zmienność genomową populacji inwazyjnych może poprawić skuteczność reintrodukcji gatunków ginących [Sax i in. 2007].

W przypadku dzików spadek poziomu zmienności genetycznej nie jest tak wyraźny jak u brzanki czy szopa i dotyczy jedynie populacji miejskiej, dlatego nie stanowi on

zagrożenia dla dzików jako gatunku. Co więcej populacja dzika w Krakowie wciąż się powiększa. Dalsza ekspansja dzików coraz częściej prowadzi do powstawania konfliktów z człowiekiem, dlatego konieczne jest wypracowanie odpowiedniej strategii zarządzania populacją dzików w mieście. Przedstawione wyniki badań wskazują, że populacja miejska funkcjonuje zupełnie niezależnie od populacji otaczających miasto i dlatego może również być kontrolowana niezależnie. Dziki w mieście są poddawane bardzo dużej presji łowieckiej. Co roku na terenie Krakowa zabija się od 100 do 200 dzików, ale ze względu na szybki rozród nie wpływa to na spadek liczebności dzików w mieście. Sama presja łowiecka jest jak widać niewystarczająca do kontrolowania populacji. Bez wiedzy na temat relacji międzypopulacyjnych nie sposób wprowadzać skutecznego zarządzania dzikimi populacjami, dlatego badania takie jak zaprezentowane w publikacji H5 są niezwykle ważne z praktycznego punktu widzenia.

Ostatni artykuł mojego osiągnięcia habilitacyjnego jest w pewnym sensie kłamrą spinającą podejmowane przeze mnie tematy. W publikacji H2 do opisanía zmienności w badanych populacjach wykorzystałem indeks różnorodności Shannona obliczony według oryginalnego wzoru, natomiast w publikacji H5 wykorzystałem moją funkcję do obliczania nieobciążonych estymatorów  $H$ . Poprawne oszacowanie poziomu zmienności jest w oczywisty sposób ważne w badaniach populacyjnych. Indeks Shannona doskonale nadaje się do opisywania zmienności ze względu na swoją czułość, wyższą niż w przypadku heterozygotyczności. Niedawno został on zaproponowany jako uniwersalna miara bioróżnorodności na wielu poziomach organizacji od genów po ekosystemy [Gaggiotti i in. 2018].

### **Perspektywy dalszych badań**

Badania na brzankach prowadziłem z użyciem loci neutralnych, które doskonale nadają się do prześledzenia historii ekspansji, ale nie dają odpowiedzi na temat cech genomu istotnych dla szans przetrwania gatunku. Dlatego rozpocząłem pilotażowy projekt finansowany przez Instytut Ochrony Przyrody (budżet: 50 000 zł), w ramach którego planuję wykonanie analiz genomu brzanki metodą RAD-seq. Założeniem projektu jest, że w genomie brzanki istnieją miejsca, w których zachował się wyższy poziom zmienności niż we wcześniej badanych przeze mnie loci neutralnych. Ponadto planuję sprawdzić czy okazjonalne krzyżowanie się brzany i brzanki pozostawiło ślad horyzontalnego

transferu genów w genomach tych gatunków – szczególnie u brzanki, u której podniesienie zmienności w skutek krzyżowania się może znacznie zmieniać dostosowanie osobników w populacjach pozbawionych zmienności. Po uzyskaniu wyników planuję złożenie większego grantu (np. w Narodowym Centrum Nauki), w którym zamierzam zbadać szczegółowo różnorodność genomową brzanki w populacjach o odmiennym poziomie zmienności. Planuję również rozwinąć współpracę międzynarodową w celu przeprowadzenia paneuropejskich badań kompleksu gatunków z rodzaju *Barbus* sp. Są to gatunki w różnym stopniu spokrewnione i wykorzystujące różne biotopy. Niektóre gatunki krzyżują się w środowisku naturalnym. Co więcej, jak większość ryb karpiowatych są one tetraploidami. Stwarza to doskonałą okazję do zbadania funkcjonowania genomu, różnicowania funkcji genów, tempa powstawania reorganizacji w genomie, czy mechanizmów powstawania izolacji rozrodczej.

Obecnie jestem wykonawcą w kolejnym projekcie dotyczącego inwazyjnej populacji szopa pracza ("Badanie zmienności genomowej w kontekście sukcesu gatunku inwazyjnego na przykładzie szopa pracza." 2020/37/B/NZ8/03801, kierownik: dr hab. Aleksandra Biedrzycka). W trakcie tych badań wykonujemy analizy genomu szopa przy użyciu metody RAD-seq oraz exome-capture. Badamy również prokariotyczne i eukariotyczne patogeny jelitowe szopów z użyciem metabarkodingu.

Kolejne zagadnienie, które chciałbym szerzej rozwijać w przyszłości to bioinformatyczne badania symulacyjne w środowiskach R i Python. Badania symulacyjne pozwalają opracować nowe metody analityczne, sprawdzać poprawność założeń różnych koncepcji oraz testować hipotezy, które są trudne do weryfikacji empirycznie. W szczególności chciałbym testować dwa zagadnienia: wpływ standaryzacji miar zmienności w loci charakteryzujących się różnym poziomem różnorodności na moc testów statystycznych porównujących poziom zmienności w populacjach, oraz wpływ wyboru metody resamplingu danych na oszacowania różnych miar zmienności. W związku z rozwojem zainteresowań w kierunku genomiki planuję również badania nad wpływem błędów systematycznych w danych z urządzeń do masowego sekwencjonowania na miary zmienności oraz testy statystyczne oceniające migracje, zmiany demograficzne, czy przynależność osobników do populacji (testy przypisania).

## Literatura

- Altizer S., Ostfeld R. S., Johnson P. T. J., Kutz S., Harvell C. D. 2013.** Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. *Science*, 341 (6145), 514–519. DOI: 10.1126/science.1239401
- Biedrzycka A., O'Connor E., Sebastian A., Migalska M., Radwan J., Zając T., Bielański W., Solarz W., Ćmiel A., Westerdahl H. 2017.** Extreme MHC class I diversity in the sedge warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*); selection patterns and allelic divergence suggest that different genes have different functions. *BMC Evolutionary Biology*, 17 (1), 159. DOI: 10.1186/s12862-017-0997-9
- Biedrzycka A., Zalewski A., Bartoszewicz M., Okarma H., Jedrzejewska E. 2014.** The genetic structure of raccoon introduced in Central Europe reflects multiple invasion pathways. *Biological Invasions*, 16 (8), 1611–1625. DOI: 10.1007/s10530-013-0595-8
- Chao A., Shen T.-J. 2003.** Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. *Environmental and Ecological Statistics*, 10 (4), 429–443. DOI: 10.1023/A:1026096204727
- Chao A., Wang Y. T., Jost L. 2013.** Entropy and the species accumulation curve: a novel entropy estimator via discovery rates of new species. *Methods in Ecology and Evolution*, 4 (11), 1091–1100. DOI: 10.1111/2041-210X.12108
- Excoffier L., Marchi N., Marques D. A., Matthey-Doret R., Gouy A., Sousa V. C. 2021.** fastsimcoal2: demographic inference under complex evolutionary scenarios. *Bioinformatics*, 37 (24), 4882–4885. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab468
- Fischer M. L., Salgado I., Beninde J., Klein R., Frantz A. C., Heddergott M., Cullingham C. I., Kyle C. J., Hochkirch A. 2017.** Multiple founder effects are followed by range expansion and admixture during the invasion process of the raccoon (*Procyon lotor*) in Europe. *Diversity and Distributions*, 23 (4), 409–420. DOI: 10.1111/ddi.12538
- Gaggiotti O. E., Chao A., Peres-Neto P., Chiu C.-H., Edwards C., Fortin M.-J., Jost L., Richards C. M., Selkoe K. A. 2018.** Diversity from genes to ecosystems: A unifying framework to study variation across biological metrics and scales. *Evolutionary Applications*, 11 (7), 1176–1193. DOI: 10.1111/eva.12593
- Gratton P., Konopiński M. K., Sbordoni V. 2008.** Pleistocene evolutionary history of the Clouded Apollo (*Parnassius mnemosyne*): genetic signatures of climate cycles and a 'time-dependent' mitochondrial substitution rate. *Molecular Ecology*, 17 (19), 4248–4262. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03901.x
- Hoffmann A. A., Blows M. W. 1994.** Species borders: ecological and evolutionary perspectives. *Trends in Ecology & Evolution*, 9 (6), 223–227. DOI: 10.1016/0169-5347(94)90248-8
- Menotti-Raymond M., O'Brien S. J. 1993.** Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (8), 3172–3176.
- Pielou E. C. 1966.** Shannon's Formula as a Measure of Specific Diversity: Its Use and Misuse. *The American Naturalist*, 100 (914), 463–465. DOI: 10.1086/282439
- Pierce A. A., Gutierrez R., Rice A. M., Pfennig K. S. 2017.** Genetic variation during range expansion: effects of habitat novelty and hybridization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284 (1852), 20170007. DOI: 10.1098/rspb.2017.0007

- Sax D. F., Stachowicz J. J., Brown J. H., Bruno J. F., Dawson M. N., Gaines S. D., Grosberg R. K., Hastings A., Holt R. D., Mayfield M. M., O'Connor M. I., Rice W. R. 2007.** Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22 (9), 465–471. DOI: 10.1016/j.tree.2007.06.009
- Shannon C. E. 1948.** A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379–423, 623–656.
- Wereszczuk A., Leblois R., Zalewski A. 2017.** Genetic diversity and structure related to expansion history and habitat isolation: stone marten populating rural-urban habitats. *Bmc Ecology*, 17, 46. DOI: 10.1186/s12898-017-0156-6
- Zahl S. 1977.** Jackknifing An Index of Diversity. *Ecology*, 58 (4), 907–913. DOI: 10.2307/1936227

#### 4. Przebieg kariery naukowej

##### 4.1. Kariera naukowa przed uzyskaniem doktoratu

Po ukończeniu studiów magisterskich na Uniwersytecie Jagiellońskim w 1997 roku podjąłem pracę w firmie Arbor Instruments zajmującej się importem i dystrybucją odczynników i aparatury do badań genetycznych. Praca w tej firmie pozwoliła mi na poszerzenie wiadomości na temat ówczesnych nowinek technicznych w dziedzinie biologii molekularnej, co spowodowało, że, jako ekolog, zacząłem interesować się genetyką ekologiczną. W październiku 1998 roku zdecydowałem się na powrót do nauki - znalazłem pracę na stanowisku technicznym w Laboratorium Genetycznym Katedry Hodowli Roślin i Nasiennictwa Akademii Rolniczej w Krakowie, jednak z przyczyn ekonomicznych byłem zmuszony zrezygnować z tej pracy i powróciłem do pracy w firmie Arbor Instruments. W tamtym czasie nawiązałem kontakt z prof. dr hab. Henrykiem Okarmą. Profesor Okarma był zainteresowany prowadzeniem badań nad rysiami z użyciem metod genetyki molekularnej, co bezpośrednio wiązało się z moimi zainteresowaniami. Posiadałem wiedzę w tym zakresie, co w tamtych czasach wciąż było stosunkową rzadkością wśród ekologów. W ramach współpracy podjąłem się zadania stworzenia laboratorium molekularnego w Instytucie Ochrony Przyrody PAN. W roku 2000 zostałem zatrudniony na stanowisku badawczo-technicznym jako wykonawca w grantie prof. Zbigniewa Witkowskiego dotyczącym niepylaka mnemozyny. W latach 1999-2002 udało mi się pozyskać środki i zorganizować Laboratorium Różnorodności Genetycznej w Instytucie. W 2001 roku odbyłem sześciomiesięczny staż w Laboratorium Genetyki Ewolucyjnej na Uniwersytat de Barcelona. W trakcie stażu prowadziłem badania nad zmiennością sekwencji genów receptorów węchowych u *Drosophila melanogaster* i *D. pseudoobscura*. Pobyt w Barcelonie pozwolił mi zdobyć wiedzę, którą trudno byłoby mi zdobyć w tamtym czasie w Polsce.

W 2008 roku obroniłem doktorat p.t. "Zmienność genetyczna i asymetria fluktuacyjna u niepylaka mnemozyny *Parnassius mnemosyne* L." Badania zostały sfinansowane z grantu

promotorskiego, który pozyskaliśmy razem z moim promotorem prof. Okarmą. Jak się okazało podobne badania do doktoratu prowadził w tamtym czasie Paolo Gratton z Uniwersytetu "Tor Vergata" w Rzymie. Efekt naszych badań opublikowaliśmy we wspólnej pracy (Gratton, Konopiński, Sbordonni 2008), która, jak na pracę o niemodelowym gatunku owadów, do dziś cieszy się stosunkowo dużym zainteresowaniem (70 cytowań do 15 stycznia 2023).

Oprócz badań związanych z doktoratem angażowałem się w wiele innych projektów. Obok niepylaka mnemozyny, zajmowałem się tak różnorodnymi taksonami jak ryś, wilk, żbik, suseł perełkowany, rokitniczka, oraz dwa gatunki ryb (brzanka i brzana) oraz ich mieszańce. W latach 2004-2007 realizowałem grant dotyczący oceny liczebności wilków w Karpatach. Były to jedne z pierwszych takich badań prowadzonych w Polsce. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane na V Europejskim Kongresie Mammologicznym w Sienie (Konopiński, Okarma, Jędrzejewski 2007) oraz wykorzystane w publikacjach, które ukazały się już po uzyskaniu przeze mnie stopnia doktora (Czarnomska, i in. 2013, Pilot i in. 2018). W latach 2002-2007 współpracując z prof. Hermanem Ansorge, Gesą Kluth i Ilką Reinhard prowadziłem pierwsze badania genetyczne nowopowstałej populacji wilków we wschodnich Niemczech (Otto et al. 2008).

W latach 2002-2008 byłem zaangażowany w prowadzone przez Aleksandrę Biedrzycką badania nad genetyką populacyjną susła perełkowanego w Polsce i na Ukrainie.

Następnie, w 2006 roku podjąłem współpracę z dr hab. Antonim Amirowiczem dotyczącą problemu pochodzenia opisywanego przez część badaczy gatunku z rodzaju *Barbus*, tj. brzany Waleckiego (*Barbus waleckii*). Wyniki tych badań zostały przedstawione na Europejskim Kongresie Ichtiologicznym w 2007 roku w Cavtacie (Chorwacja, Konopiński, Kukuła, Amirowicz 2007).

#### 4.2. **Kariera naukowa po uzyskaniu stopnia doktora.**

Po uzyskaniu stopnia doktora zajmowałem się w dużej mierze kontynuacją tematów rozpoczętych w latach poprzedzających obronę. W roku 2008 razem z Aleksandrą Biedrzycką opublikowaliśmy wyniki badań nad susłem perełkowanym (Biedrzycka i Konopiński 2008). W kolejnych latach ukazały się dwie prace kończące moje badania nad rysiem (Schmidt, Ratkiewicz i Konopiński 2011 oraz Ratkiewicz, i in. 2012) i wilkiem (Czarnomska i in. 2013, Pilot i in. 2018).

W związku z prowadzeniem Laboratorium Różnorodności Genetycznej podjąłem również szereg nowych tematów badawczych. We współpracy z dr hab. Antonim Amirowiczem rozpocząłem badania nad mieszańcami płoci i leszcza w zbiorniku retencyjnym w Dobczycach, na rzece Rabie (Konopiński i Amirowicz 2015, Konopiński i Amirowicz 2017).

W roku 2012 wziąłem udział w dwutygodniowym szkoleniu dotyczącym technik sekwencjonowania nowej generacji w Czeskim Krumlovie. Po ukończeniu tego szkolenia swoje zainteresowania rozszerzyłem w kierunku badań genomowych.

W 2014 roku rozpocząłem trwającą 2 lata współpracę z pracownikami Katedry Immunologii Collegium Medicum UJ. Prowadziliśmy badania nad mechanizmami powstawania stanu zapalnego oraz jego rolą w systemie odpornościowym (Biedroń i in. 2015, Peruń i in. 2016).

Zaangażowałem się również w prowadzone w Instytucie Ochrony Przyrody badania nad niedźwiedziem brunatnym w zespole prof. Nurii Selvy. W ramach współpracy z tym zespołem brałem udział w badaniach dotyczących szkód powodowanych przez niedźwiedzie (Berezowska i in., *praca złożona do recenzji*) oraz prowadziłem badania dotyczące filogeografii niedźwiedzia w Europie w ramach projektu BearConnect.

Równoległe do badań genetycznych rozwijałem swoją znajomość programowania w językach Python i R. W tym celu w 2016 roku odbyłem 3 miesięczny staż w firmie Ericsson Polska na stanowisku programisty. Nauka programowania zaowocowała dwiema publikacjami dotyczącymi teoretycznych aspektów genetyki populacyjnej (praca H6 oraz Konopiński 2022)

Oprócz badań ściśle naukowych brałem również udział w wykonywaniu ekspertyz przyrodniczych dotyczących rozróżnienia wilków i psów oraz ich mieszańców w Polsce Zachodniej oraz we wschodnich Niemczech, introdukcji susła moręgowanego na Opolszczyźnie, liczebności wilka w trzech ostojach w sieci Natura 2000 (Bory Dolnośląskie, Gorce i Beskid Sądecki) oraz liczebności niedźwiedzia w Bieszczadach i Tatrach.

## **5. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.**

Choć prowadzenie dydaktyki jest ograniczone w jednostkach PAN, to korzystałem z każdej nadarzającej się okazji do dzielenia się moją wiedzą. W latach 2003-2017 wygłaszałem wykłady w ramach kilku kursów dla studentów Uniwersytetu Jagiellońskiego: Naukowe podstawy ochrony przyrody (WBNZ-710), Practical aspects of environmental conservation (WB.INS-5). Prowadziłem również wykłady w ramach Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. W 2004 roku dla członków kół łowieckich wygłosiłem dwa wykłady na temat badań genetycznych.

Jestem również autorem pięciu rozdziałów w książkach o charakterze popularno-naukowym dotyczących ochrony przyrody (Zajac, Gondek, Konopiński 2002, Konopiński 2003, Konopiński 2004, Konopiński 2007a i b) oraz dwóch artykułów popularno-naukowych (Konopiński 2021, Konopiński i Biedrzycka 2021)



W latach 2011-2014 kilkakrotnie prowadziłem wykłady na temat różnorodności genetycznej dla uczniów VI Liceum Ogólnokształcącego w Krakowie.

Troje magistrantów wykonujących prace magisterskie w Instytucie Ochrony Przyrody PAN (Aleksandrę Gondek, Alicję Babst-Kostecką, Wojciech Groblickiego) oraz trzy pracownice techniczne zatrudnione przez Instytut (Magdalenę Poznańską, Joannę Kudłek oraz Joannę Reszkę) od podstaw nauczyłem pracy w laboratorium genetyki populacyjnej.

## **6. Aktywność naukowa w innych jednostkach naukowych.**

### *Przed uzyskaniem stopnia doktora*

Od początku mojej pracy w nauce nawiązywałem kontakty z uczonymi z wielu ośrodków naukowych w Europie. W 2001 roku spędziłem 6 miesięcy na stypendium przeddoktorskim *Marie Curie Fellowship* na Universitat de Barcelona na wydziale Genetyki, Mikrobiologii i Statystyki w grupie prof. Montserrat Aguade w ramach projektu: "Detecting the effects selection on olfactory receptors in *Drosophila melanogaster*." Efektem tego pobytu jest prezentacja na konferencji ESEB w 2005 roku (Konopiński, Gondek, Pabijan, Aguade 2005). Prowadziłem badania nad wschodnio-niemiecką populacją wilka we współpracy z Senckenberg Museum für Naturkunde, Görlitz (Niemcy). W ramach współpracy odbyłem wyjazd do Görlitz w celu wygłoszenia seminarium na temat genetyki populacyjnej (w 2008 roku).

### *Po uzyskaniu stopnia doktora*

W latach 2014-2016 brałem udział w badaniach prowadzonych na Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Katedrze Immunologii. Badania te dotyczyły funkcjonowania receptorów białkowych w systemie odpornościowym myszy. W 2016 roku spędziłem dwa tygodnie w Forschungsinstitut Senckenberg w Gelnhausen (Niemcy), gdzie prowadziłem badania nad wykorzystaniem mikrochipów Fluidigm do identyfikacji osobniczej niedźwiedzi. Od 2019 roku jestem uczestnikiem projektu COST (CA18134 - Genomic Biodiversity Knowledge for Resilient Ecosystems) w ramach którego w marcu 2020 roku w stacji terenowej Stockholm Universitet w Tovetorp brałem udział w pracach nad meta-analizą danych z publikacji na temat zmian poziomu różnorodności genetycznej organizmów wolnożyjących.