

Załącznik 2

Autoreferat

Dr Sebastian Tarcz

Kraków 2014

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Sebastian Tarcz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Studia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (kierunek biotechnologia) Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (1997-2002), ukończone uzyskaniem tytułu **magistra biotechnologii** z wynikiem bardzo dobrym (dnia **5.12.2002r.**).

Pracownia magisterska: Pracownia Genetyki Nowotworów (obecnie Zakład Biomedycyny Molekularnej), Instytutu Chemii Bioorganicznej, Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Tytuł pracy magisterskiej: „Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w mRNA ludzkiego genu *IT15*”, promotor prof. Włodzimierz Krzyżosiak

Międzynarodowe Studium Doktoranckie Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk w Krakowie (2003-2007), ukończone uzyskaniem stopnia **doktora nauk biologicznych specjalność: biologia** (Rada Naukowa Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie **26.11.2007r.**).

Tytuł pracy doktorskiej: „Badania zróżnicowania wewnątrzgatunkowego w obrębie *Paramecium novaurelia*, z zespołu gatunków *Paramecium aurelia* (Ciliophora, Protozoa), metodą analizy porównawczej wybranych fragmentów DNA”, promotor prof. Ewa Przyboś

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

10.2007 – 12.2007 – asystent, Zakład Zoologii Doświadczalnej, Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

12.2007 – obecnie – adiunkt, Zakład Zoologii Doświadczalnej, Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

01.2009 – obecnie – adiunkt, kierownik Pracowni Technik Molekularnych, Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego,

Jako osiągnięcie wynikające 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.), wskazuję cykl sześciu publikacji oryginalnych na temat:

„Kod kreskowy DNA jako narzędzie oceny zmienności genetycznej wybranych gatunków rodzaju *Paramecium* (Orzęski, Pierwotniaki)”

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1. Przyboś E., **Tarcz S.** , Pothekin A., Rautian M., Prajer M. 2012. A two-locus molecular characterization of *Paramecium calkinsi*. *Protist* 163: 263-273
IF₂₀₁₂= 4.140; MNiSW=35
2. **Tarcz S.** , Pothekin A., Rautian M., Przyboś E. 2012. Variation in ribosomal and mitochondrial DNA sequences demonstrates the existence of intraspecific groups in *Paramecium multimicronucleatum* (Ciliophora, Oligohymenophorea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 500-509
IF₂₀₁₂= 4.066; MNiSW=30
3. Przyboś E., **Tarcz S.** , Prajer M., Surmacz M., Rautian M., Sawka N. 2012. Does high intraspecific variability of two genome fragments indicate a recent speciation process of *Paramecium dodecaurelia* (*P. aurelia* species complex, Ciliophora, Protozoa)? *Systematic and Biodiversity* 10(3): 289–304
IF₂₀₁₂=1.884; MNiSW=30
4. **Tarcz S.** , Przyboś E., Surmacz M. 2013. An assessment of haplotype variation in ribosomal and mitochondrial DNA fragments suggests incomplete lineage sorting in some species of the *Paramecium aurelia* complex (Ciliophora, Protozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 255-265
IF₂₀₁₂= 4.066; MNiSW=30
5. Przyboś E., **Tarcz S.**  2013. Three-locus analysis in conjunction with strain crosses confirms the existence of reproductively isolated populations in *Paramecium jenningsi* (Diller and Earl 1958). *Systematics and Biodiversity* 11: 507–523
IF₂₀₁₂= 1.884; MNiSW=30

6. **Tarcz S.** ✉, Rautian M., Potekhin A., Sawka N., Beliavskaya A., Kiselev A., Nekrasova I., Przyboś E. 2014. *Paramecium putrinum* (Ciliophora, Protozoa): The first insight into the variation of two DNA fragments – Molecular support for the existence of syngens. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 73: 140-145
IF₂₀₁₂= 4.066; MNiSW=30

Łączna suma punktów z listy MNiSW (część A) dla wskazanego osiągnięcia wynosi **185**
Sumaryczny Impact Factor (IF) wskazanego osiągnięcia wynosi **20,106**

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

Osiągnięcie naukowe to cykl sześciu oryginalnych artykułów opublikowanych w latach 2012-2014 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, w których przedstawiłem wyniki moich badań związane z zastosowaniem fragmentów DNA w rozwiązywaniu problemów dotyczących specjacji u orzęsków z rodzaju *Paramecium*. W trzech publikacjach jestem pierwszym, a we wszystkich sześciu autorem korespondencyjnym.

Uzasadnienie podjęcia tematu oraz cel naukowy

W linneuszowskiej klasyfikacji organizmów gatunek jest najmniejszą jednostką taksonomiczną. Jednakże dywergencja jednego gatunku na dwa lub więcej gatunków potomnych nie jest zjawiskiem nagłym, co w konsekwencji prowadzi do wniosku, że każdy gatunek znajduje się w trakcie specjacji. Badając organizmy żyjące wokół nas można zauważyć, że w niektórych gatunkach taksonomicznych daje się wyodrębnić jednostki o jeszcze niższej randze określane mianem gatunków bliźniaczych, które są znane zarówno u organizmów wyższych (Hebert i wsp., 2004) jak i u mikroorganizmów eukariotycznych (Amato i wsp., 2007), włączając orzęski (Schmidt i wsp, 2006). Po raz pierwszy obecność izolowanych rozrodczo populacji w obrębie jednego gatunku orzęsków stwierdzono u *Paramecium aurelia* (Sonneborn, 1937). W przypadku rodzaju *Paramecium* takie izolowane płciowo grupy określane są terminem „syngeny”. Jedynie u *P. aurelia* syngeny zostały

opisane jako zespół 14 niezależnych gatunków bliźniaczych (Sonneborn, 1975). W późniejszym czasie, do tej grupy jako piętnasty gatunek zespołu został dołączony *P. sonneborni* (Aufderheide i wsp., 1983).

Orzęski z rodzaju *Paramecium* (pantofelki) są modelowymi mikroorganizmami eukariotycznymi w badaniach z zakresu biochemii, biologii komórki, fizjologii, a także genetyki. Mimo to nie ma pełnej informacji na temat filogenetycznych zależności międzygatunkowych w obrębie rodzaju, biogeografii oraz zmienności genetycznej populacji żyjących w naturalnych siedliskach. Brak jednolitej definicji oraz złożona struktura gatunku, jak również niewielka ilość danych o naturalnych populacjach mikroorganizmów eukariotycznych (w tym *Paramecium*) powodują, że określenie granic pomiędzy gatunkami oraz wyjaśnienie przebiegu specjacji wydaje się być jednym spośród najważniejszych problemów współczesnej protozoologii. Obecność w obrębie gatunków morfologicznych *Paramecium* (i innych orzęsków) izolowanych rozrodczo populacji zwanych syn genami lub gatunkami bliźniaczymi czyni je idealnym obiektem do badań nie tylko w dziedzinie ewolucji i specjacji, ale również genetyki populacji.

Rodzaj *Paramecium* obejmuje 13 gatunków morfologicznych i cztery tzw. gatunki afrykańskie (Fokin i wsp. 2004). Na podstawie cech morfologicznych i danych biologicznych (Fokin 2010/2011), oraz porównania fragmentów małej podjednostki rDNA (Strüder-Kypke i wsp. 2000) lub genu *COI* mtDNA (Strüder-Kypke i Lynn 2010), wszystkie gatunki w obrębie rodzaju są podzielone na pięć podrodzajów: *Chloroparamecium* (gatunek *P. bursaria*), *Helianter* (gatunki *P. duboscqui* i *P. putrinum*), *Cypriostomum* (gatunki *P. calkinsi*, *P. nephridiatum*, *P. polycarium* i *P. woodruffi*), *Paramecium* (zespół gatunków *P. aurelia*, *P. caudatum*, *P. jenningsi*, *P. multimicronucleatum*, *P. schewiakoffi*) i rzadkie gatunki „afrykańskie”: *P. africanum*, *P. jankowski*, *P. ugandae* i *P. wichtermanni* (Fokin i wsp. 2004). Ostatnim podrodzajem jest *Viridoparamecium*, w obrębie którego wyróżnia się tylko jeden gatunek - *P. chlorelligerum* (Kreutz i wsp., 2012).

W omawianych poniżej wynikach przynależność gatunkową u *Paramecium* określano w oparciu o kształt i wielkość komórki, budowę aparatu jądrowego i wodniczek tętniących oraz obecność lub brak endosymbiontów. Natomiast klasyfikacja do odpowiedniego syngenu lub gatunku bliźniaczego odbywała się na podstawie oceny zdolności do koniugacji ze szczepem standardowym reprezentującym syngen lub gatunek bliźniaczy. Stosowane od lat w celu identyfikacji krzyżówki testowe są techniką wymagającą żywych kultur

w odpowiedniej fazie dojrzałości płciowej reprezentujących uzupełniające się typy koniugacyjne oraz szczepów standardowych, co znacząco komplikuje oznaczenie gatunków bliźniaczych lub syngenów.

Pewnym ułatwieniem było wprowadzenie do badań technik biologii molekularnej tj. rozdziału elektroforetycznego izoenzymów (Allen i wsp., 1973), RAPD (Stoeck i Schmidt 1998), RFLP, ARDRA (Przyboś i wsp., 2007) PFGE (Rautian i Potekhin 2002). Zasadniczą wadą powyższych analiz jest stosunkowo niska powtarzalność oraz brak możliwości bezpośredniego porównania wyników uzyskanych przez różne zespoły badawcze. Dopiero zastosowanie techniki sekwencjonowania fragmentów DNA oraz obecność uzyskanych przez dany zespół badawczy sekwencji w ogólnodostępnych bazach danych (np. GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov) rozwiązało ten problem. Słabą stroną opublikowanych analiz (Barth i wsp., 2008, Coleman 2005, Maciejewska 2007) była ich wybiórczość (badania dotyczyły tylko 1-3 przedstawicieli danego gatunku *Paramecium*, co wiązało się z brakiem możliwości oceny zmienności wewnątrzgatunkowej) oraz brak spójności (w każdej pracy analizowano inny fragment genomu, co uniemożliwiało wspólną analizę wyników uzyskanych dla różnych gatunków). Dodatkowo powyższe badania koncentrowały się głównie wokół zespołu *Paramecium aurelia* złożonego z 15 gatunków bliźniaczych, które są morfologicznie nierozróżnialne, ale izolowane płciowo i razem z *Paramecium caudatum* są najczęściej wykorzystywane w badaniach naukowych. Z kolei pozostałe gatunki *Paramecium* pozostawały dotychczas praktycznie niezbadane pod względem zmienności genetycznej.

W wielu przypadkach sekwencjonowanie wybranych fragmentów genomu pozostaje podstawowym narzędziem służącym do wyznaczenia granic pomiędzy gatunkami mikroorganizmów eukariotycznych (Caron i wsp., 2013). Ma to szczególnie znaczenie, gdy przedmiotem badań są morfologicznie nierozróżnialne gatunki bliźniacze lub syngeny, przy jednoczesnym braku szczepów standardowych dla poszczególnych izolowanych rozrodczo populacji.

Celem prezentowanego jednotematycznego cyklu prac była ocena przydatności kodu kreskowego DNA do identyfikacji gatunkowej i oceny bioróżnorodności rodzaju *Paramecium*, a także oszacowania zmienności genetycznej pomiędzy i w obrębie gatunków tego rodzaju.

Strategią, jaką realizowałem w prezentowanym osiągnięciu naukowym, było uzyskanie sekwencji homologicznych z możliwie jak największej ilości reprezentantów każdego gatunku *Paramecium*. Do badań wybrane zostały dwa niezależne fragmenty genomu *Paramecium* tj. odcinek rybosomalnego DNA (ITS1-5.8S-ITS2-5'LSU rDNA) oraz fragment genu kodującego pierwszą podjednostkę oksydazy cytochromowej (*COI*). Powyższe markery są obecnie najczęściej stosowane nie tylko u orzęsków, ale także u innych Protista (Pawłowski i wsp., 2012) jako tzw. kod kreskowy DNA. Użycie przynajmniej dwóch niezależnych fragmentów genomu zmniejsza ryzyko błędu spowodowanego wyborem analizowanej sekwencji DNA (Dunthorn i wsp., 2011). W badaniach dotyczących podrodzaju *Paramecium* jako markera dodatkowego użyłem sekwencji genu mitochondrialnego kodującego cytochrom b (*CytB*). Z kolei do amplifikacji fragmentu 5'LSU zaprojektowałem i opublikowałem startery do reakcji PCR, które z powodzeniem zastosowałem we wszystkich gatunkach *Paramecium*. Pozostałe oligonukleotydy zostały zapożyczone z literatury.

Należy zwrócić uwagę na fakt, iż dotychczas w obrębie badanego rodzaju orzęsków nie przeprowadzano tak kompleksowej i spójnej analizy. **W cyklu prac prezentowanym przeze mnie jako główne osiągnięcie naukowe postępowania habilitacyjnego po raz pierwszy przeprowadziłem analizy molekularne gatunków dotychczas nie zbadanych pod kątem zmienności genetycznej (*P. calkinsi*, *P. multimicronucleatum*, *P. putrinum*). Ponadto wykonałem bardziej szczegółowe badania gatunków *P. jenningsi* oraz zespołu *P. aurelia*.**

Powyższa strategia pozwoliła po pierwsze porównać wyniki sekwencjonowania z klasyfikacją opartą na krzyżówkach (zespół *P. aurelia*, *P. jenningsi*) i odpowiedzieć na pytanie czy zastosowane markery mogą służyć do identyfikacji syngenów lub gatunków bliźniaczych, a po drugie w przypadku gatunków bez szczepów standartowych dla znanych z literatury syngenów (*P. calkinsi*, *P. multimicronucleatum*, *P. putrinum*) dała możliwość wstępnego pogrupowania badanego materiału i ewentualnej, późniejszej weryfikacji za pomocą krzyżówek genetycznych.

Ocena zależności filogenetycznych u jak największej liczby przedstawicieli *Paramecium* w oparciu o powyższe dwa fragmenty genomu, otwiera drogę do dalszych, bardziej szczegółowych badań z zakresu genetyki populacji, biogeografii mikroorganizmów eukariotycznych oraz interakcji gospodarz (*Paramecium*) – endosymbiont (glony z rodzaju *Chlorella*, bakterie z rodzajów *Holospira*, *Caedibacter*).

Materiał

Materiałem do przeprowadzonych przeze mnie analiz molekularnych były żywe kultury wszystkich opisanych do chwili obecnej gatunków *Paramecium*. Większość z nich znajduje się w kolekcji ISEZ PAN. Dużą część kolekcji stanowią kultury zespołu gatunków *P. aurelia* (ponad 300 ze wszystkich kontynentów z wyjątkiem Antarktydy), *P. jenningsi* (12 – są to wszystkie znane obecnie stanowiska), a także kilka szczepów *P. caudatum* i po jednym szczepie (jedyne opisane stanowiska) *P. schewiakoffi* oraz *P. chlorelligerum*. Dzięki współpracy międzynarodowej (Uniwersytet w Petersburgu) mogłem włączyć do badań po kilkanaście-kilkadziesiąt przedstawicieli *P. calkinsi*, *P. multimicronucleatum*, *P. putrinum* oraz po 1-2 szczepy *P. duboscqui*, *P. nephridiatum*, *P. polycaryum* oraz *P. woodruffi*. We współpracy krajowej (Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie) i międzynarodowej (Uniwersytet w Petersburgu) realizowałem badania dotyczące *P. bursaria*.

Omówienie osiągniętych wyników

1. Przyboś E., Tarcz S.✉, Potheikin A., Rautian M., Prajer M. 2012. A two-locus molecular characterization of *Paramecium calkinsi*. Protist 163: 263-273 IF₂₀₁₂= 4.140; MNiSW=35

Paramecium calkinsi (Woodruff, 1921) jest gatunkiem euryhalicznym, po raz pierwszy zidentyfikowanym w siedliskach słodkowodnych, ale później izolowanym także z wód brakicznych. Jako jedyny charakteryzuje się pływaniem w kierunku zgodnym ze wskazówkami zegara, co jest cechą diagnostyczną wyróżniającą ten gatunek spośród innych w rodzaju *Paramecium*. Posiada komórki o długości 110 do 140 μm oraz endosomalne mikrojądra (1 do 5, zwykle 2). Został opisany z terenów Ameryki Północnej (Woodruff 1921), Europy i Azji (Fokin 2001, 2004). Jednak szczepy z powyższych lokalizacji nie istnieją i z tego powodu nie były włączone do obecnych analiz. W obrębie *P. calkinsi* opisano istnienie dwóch syngenów (Wichterman 1986).

Obecna praca jest pierwszą oceną zmienności genetycznej szczepów *P. calkinsi* zebranych z odległych siedlisk z terenu Rosji w latach 2004-2010 (Ryc. 1). W analizie fragmentu rDNA (Ryc. 4) wykazano, że *P. calkinsi* stanowi monofiletyczny, ale zróżnicowany

wewnętrznie kład. W przypadku fragmentu *COI*, gdy do analiz włączono uzyskane z GenBanku sekwencje innych gatunków podrodzaju *Helianter* stwierdzono, że *P. calkinsi* stanowi grupę polifiletyczną (**Ryc. 5**). Mimo różnic morfologicznych, bliskie pokrewieństwo pomiędzy *P. calkinsi*, *P. nephridiatum*, *P. polycaryum* oraz *P. woodruffi* było postulowane wcześniej (Fokin i wsp., 2004). **Otrzymane przez nas wyniki analiz molekularnych wskazują, że jest to przykład niekompletnego sortowania linii filogenetycznych w obrębie rodzaju *Paramecium*** (szczegółowe omówienie tego zjawiska przedstawiłem w artykule nr 4). W celu weryfikacji powyższej hipotezy wymagana jest jednak kompleksowa analiza zależności pomiędzy *P. calkinsi*, *P. nephridiatum*, *P. polycaryum* oraz *P. woodruffi* z użyciem przynajmniej kilku-kilkunastu szczepów każdego z powyższych gatunków, przy jednoczesnej dokładnej analizie morfologicznej oraz przeprowadzeniu krzyżówek testowych.

Obserwowane dystanse genetyczne pomiędzy badanymi szczepami *P. calkinsi* są porównywalne z odległościami pomiędzy syngenami u *P. bursaria* (rDNA) lub pomiędzy gatunkami bliźniaczymi *P. aurelia* (*COI*). Pomimo braku przeprowadzonych krzyżówek testowych stwierdzono, że klady na drzewach filogenetycznych mogą odzwierciedlać syngeny lub rasy geograficzne w obrębie *P. calkinsi*.

2. Tarcz S. ✉, Potheikin A., Rautian M., Przyboś E. 2012. Variation in ribosomal and mitochondrial DNA sequences demonstrates the existence of intraspecific groups in *Paramecium multimicronucleatum* (Ciliophora, Oligohymenophorea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 500-509 IF₂₀₁₂= 4.066; MNiSW=30

Podobne założenie jak w przypadku *P. calkinsi* przedstawiłem w pracy dotyczącej wewnątrzgatunkowej zmienności *Paramecium multimicronucleatum* (Powers i Mitchell, 1910). *P. multimicronucleatum* charakteryzuje się komórkami w kształcie cygara o długości 180 do 310 µm. Należy więc do największych w obrębie *Paramecium*. Cechą diagnostyczną oprócz wielkości komórki jest obecność kilku (3 do 12, zwykle 4) pęcherzykowatych mikrojąder. Pod względem filogenetycznym zaliczany jest do podrodzaju *Paramecium* razem z *P. caudatum*, *P. schewiakoffi*, *P. jenningsi* oraz zespołem gatunków *P. aurelia*. Według Sonneborna (1970) w obrębie tego gatunku można wyróżnić cztery do pięciu syngenów. Dotychczas opublikowano jedynie kilka prac, w których analizowano fragmenty DNA uzyskane z 2 do 8 szczepów (Barth i wsp., 2006, Strüder-Kypke i Lynn, 2010). **Prezentowane przeze mnie wyniki badań są pierwszą analizą filogenetyczną ponad trzydziestu**

przedstawicieli *P. multimicronuclatum* izolowanych z odległych stanowisk (Tab. 1). W powyższej pracy zaprojektowałem i opublikowałem sekwencje starterów do amplifikacji zmiennego fragmentu 5'-końca genu kodującego dużą podjednostkę rDNA, który razem z fragmentem ITS1-5.8S-ITS2 został zastosowany przeze mnie również w badaniach innych gatunków rodzaju *Paramecium*.

Obserwowana zmienność ($p = 0.025$ dla rDNA i $p = 0.082$ dla *COI*) badanych sekwencji DNA pomiędzy wyodrębnionymi grupami *P. multimicronucleatum* jest większa niż pomiędzy pięcioma syngenami *P. bursaria* ($p = 0.015$ dla rDNA i $p = 0.063$ dla *COI*).

W oparciu o wyniki badań innych gatunków *Paramecium*, na przykład gatunku *P. bursaria*, u którego obecność syngenów została udowodniona przy pomocy krzyżówek genetycznych i analizy trzech fragmentów DNA (II.A.15), uważam że **uzyskane w obecnej pracy wyniki (Ryc. 1,2) wskazują, że badane szczepy *P. multimicronucleatum* mogą należeć do kilku izolowanych rozrodczo grup.** W celu ostatecznego potwierdzenia wskazane byłoby przeprowadzenie krzyżówek testowych i oznaczenie szczepów standartowych dla każdego syngenu.

3. Przyboś E., Tarcz S. ✉, Prajer M., Surmacz M., Rautian M., Sawka N. 2012. Does high intraspecific variability of two genome fragments indicate a recent speciation process of *Paramecium dodecaurelia* (*P. aurelia* species complex, Ciliophora, Protozoa)? Systematic and Biodiversity 10(3): 289–304 IF₂₀₁₂=1.884; MNiSW=30

W powyższej pracy wykazano, że mimo dużego zróżnicowania genetycznego między odległymi populacjami *P. dodecaurelia*, są one zdolne do koniugacji. W oparciu o drzewa filogenetyczne skonstruowane na podstawie fragmentów rDNA i *COI* stwierdzono, że *P. dodecaurelia* nie tworzy kładu monofiletycznego w stosunku do innych gatunków zespołu tj. *P. primaurelia*, *P. tetraurelia*, *P. tredecaurelia*, a także gatunków taksonomicznych *P. jenningsi*, *P. schewiakoffi* (Ryc. 4,5). **Pomimo, że wyniki klasyfikacji na podstawie biologicznej i filogenetycznej definicji gatunku nie są spójne, to uważam, że w oparciu o rezultaty krzyżówek genetycznych (wysoka przeżywalność pokolenia F₁ i F₂) *P. dodecaurelia* powinien być traktowany jako odrębny gatunek.** Uzyskane przez nas rezultaty popierają hipotezę, że *P. dodecaurelia* jest gatunkiem polifiletycznym z szeregiem haplotypów podobnych lub identycznych jak u innych gatunków zespołu *P. aurelia*. Obecność w blisko spokrewnionych gatunkach identycznych haplotypów przy jednoczesnym

braku przepływu genów jest charakterystyczna dla niedawno wyodrębnionych taksonów oraz określana mianem niekompletnego sortowania linii filogenetycznych (ang. *incomplete lineage sorting*) (Avice i Ball, 1990). Takie zjawisko mogło mieć miejsce także **w przypadku *P. dodecaurelia***, u którego **izolacja płciowa nastąpiła zanim różne warianty badanych loci (ITS1-5.8S-ITS2-5'LSU i *COI*) zostały kompletnie rozdzielone pomiędzy gatunki potomne zespołu *P. aurelia***. Pomimo, że wysoka zmienność genetyczna u *P. dodecaurelia* była dotychczas intensywnie badana przy użyciu różnych markerów molekularnych (II.A.3, II.A.6) jednak dopiero w powyższej pracy zaproponowaliśmy wyjaśnienie uzyskanych wyników.

4. Tarcz S. ✉, Przyboś E., Surmacz M. 2013. An assessment of haplotype variation in ribosomal and mitochondrial DNA fragments suggests incomplete lineage sorting in some species of the *Paramecium aurelia* complex (Ciliophora, Protozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 255-265 IF₂₀₁₂= 4.066; MNiSW=30

W celu oceny stopnia polimorfizmu gatunków zespołu *P. aurelia* oraz możliwości ich identyfikacji **przeprowadziłem kompleksową analizę dwóch niezależnych fragmentów genomu (rDNA i *COI*) u ponad 120 szczepów należących do wszystkich 15 gatunków bliźniaczych zespołu *P. aurelia***. Wykazano w niej różny stopień zmienności genetycznej **w obrębie poszczególnych gatunków**. W przeciwieństwie do powyżej omawianego *P. dodecaurelia*, gatunki *P. triaurelia*, *P. undecaurelia*, *P. tredecaurelia* oraz *P. quadecaurelia* stanowią kłady monofiletyczne na skonstruowanych drzewach (Ryc. 1,2). Zasugerowałem, że wyjaśnieniem obserwowanego monofiletyzmu mogą być dwie hipotezy: po pierwsze, są to dobrze wyodrębnione gatunki z kompletnie rozdzielonymi liniami filogenetycznymi dwóch analizowanych fragmentów rDNA i *COI*, a po drugie, że w badanej próbie nie wykryto znacznie różniących się haplotypów, których obecność spowodowałaby, że *P. triaurelia*, *P. undecaurelia*, *P. tredecaurelia* oraz *P. quadecaurelia* nie stanowiłyby kładów monofiletycznych na drzewie filogenetycznym *P. aurelia*.

W pozostałych gatunkach bliźniaczych zespołu *P. aurelia* wykazano różny stopień niezgodności pomiędzy uzyskanymi haplotypami a wcześniejszymi wynikami klasyfikacji w oparciu o krzyżówki genetyczne (Ryc. 1,2). **Według mojej opinii najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem obserwowanej niezgodności może być niekompletne sortowanie linii filogenetycznych fragmentów rDNA i *COI***.

Proces sortowania linii filogenetycznych zakłada, że wszystkie haplotypy charakterystyczne dla danego gatunku posiadają wspólny haplotyp ancestralny (Heckman i wsp. 2007). Jeżeli proces specjacji jest zakończony to analiza jakichkolwiek sekwencji homologicznych z dwóch porównywanych gatunków, które uległy dywergencji powinna spełniać kryterium wzajemnego monofiletyzmu (Kizirian i Donnelly, 2004). W przypadku niekompletnego sortowania linii filogenetycznych wiele haplotypów w dzielącej się populacji jest obecnych w dwóch lub więcej gatunkach. Uzyskane przeze mnie rezultaty popierają hipotezę, o szybkiej i niedawnej specjacji w zespole gatunków bliźniaczych *P. aurelia*. Proces niekompletnego sortowania linii filogenetycznych jest znany także poza orzęskami - opisano go u odległych filogenetycznie organizmów na przykład u muszki owocowej *Drosophila* (Pollard i wsp., 2006), czy sosny *Pinus* (Willyard i wsp., 2009).

Z drugiej strony, obserwowane różnice między wynikami analiz molekularnych (filogenetyczna definicja gatunku) i wynikami uzyskanymi na podstawie krzyżówek genetycznych (biologiczna definicja gatunku) mogą sugerować niedawne procesy hybrydyzacji i introgresji w zespole gatunków *P. aurelia*. Oba te procesy są uważane za jedne z istotniejszych czynników wpływających na ewolucję organizmów (Mallet, 2007). Badania przeprowadzane na organizmach wielokomórkowych sugerują wystąpienie tych zjawisk u 10% gatunków zwierząt (Mallet 2005) oraz 25% gatunków roślin (Schwenk i wsp., 2008). W przypadku mikroorganizmów eukariotycznych informacje na ten temat są obecnie rzadko spotykane i dotyczą gatunków pasożytniczych na przykład *Trypanosoma cruzi* (Messenger i wsp., 2012). Poparciem dla hipotezy zakładającej wystąpienie tych zjawisk w zespole *P. aurelia* może być zdolność do wchodzenia w międzygatunkowe reakcje płciowe przez niektóre gatunki zespołu. Najsilniejsze opisano pomiędzy *P. primaurelia* i *P. pentaurelia* oraz *P. tetraurelia* i *P. octaurelia*, jednak powstałe w wyniku krzyżówek genetycznych pokolenie F1 jest bezpłodne (Sonneborn, 1975). Na skonstruowanych drzewach filogenetycznych (**Ryc. 1,2**) *P. primaurelia* i *P. pentaurelia* tworzą klady siostrzane, z kolei szczepy *P. tetraurelia* posiadają bardzo podobne i nawet identyczne haplotypy jak *P. octaurelia*. Obecność introgresji i hybrydyzacji w naturalnych populacjach *Paramecium* nie może być wykluczona, jednak obecnie nie ma dowodów na poparcie lub odrzucenie powyższej hipotezy.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują ponadto, że zmienność fragmentu *COI* w zespole *P. aurelia* jest największa w porównaniu do innych gatunków *Paramecium*.

Wyjaśnieniem tak dużej zmienności genetycznej w obrębie *P. aurelia* jest według Aury i wsp. (2006), ostatni z trzech procesów duplikacji genomu, który nastąpił po rozdzieleniu linii filogenetycznych prowadzących do zespołu *P. aurelia* oraz do *P. caudatum* i *P. multimicronucleatum*. W oparciu o analizę drzew filogenetycznych rodzaju *Paramecium* (**Ryc. 3,4**) wykazano, że jedynie podrodzaje *Paramecium* i *Chloroparamecium* są kladami monofiletycznymi, a pozostałe dwa tj. *Cypristomum* i *Helianter* cechuje parafiletyzm (w tej analizie nie uwzględniono jeszcze podrodzaju *Viridoparamecium* Kreutz i wsp., 2012).

5. Przyboś E., Tarcz S.✉ 2013. Three-locus analysis in conjunction with strain crosses confirms the existence of reproductively isolated populations in *Paramecium jenningsi* (Diller and Earl 1958). Systematics and Biodiversity 11: 507–523 IF₂₀₁₂= 1.884; MNiSW=30

Paramecium jenningsi (Diller i Earl, 1958) należy do podrodzaju *Paramecium* razem z zespołem gatunków *P. aurelia*, *P. schewiakoffi*, *P. caudatum* oraz *P. multimicronucleatum* (Fokin i wsp., 2004). Jest rzadko spotykany, opisany z mniej niż 20 stanowisk (głównie ze strefy międzyzwrotnikowej) znajdujących się na obydwu półkulach (**Ryc. 1**). Chociaż bariera temperaturowa prawdopodobnie wpływa na zasięg występowania *P. jenningsi*, to jego obecność odnotowano także w Japonii na wyspach Honsiu i Okinawa.

W powyższej pracy, w oparciu o wyniki krzyżówek genetycznych (**Tab. 3**) i sekwencjonowanie trzech loci (ITS1-5.8S-ITS2-5'LSU, *COI*, *CytB*) (**Ryc. 4,5,6**), **wyodrębniono u *P. jenningsi* trzy syngeny (PJ1, PJ2 i PJ3)**. W przeciwieństwie do poprzednich badań (Skotarczak i wsp., 2004; Maciejewska 2006), dzięki zastosowanej przeze mnie strategii badawczej po raz pierwszy porównano *P. jenningsi* z blisko spokrewnionym z nim *P. schewiakoffi* i zespołem *P. aurelia*, na tle innych gatunków *Paramecium* (**Ryc. 4,5,6,7**).

W wyniku analizy wzajemnych zależności filogenetycznych pomiędzy zespołem gatunków wykazałem, że *P. aurelia* i *P. jenningsi* są taksonami parafiletycznymi, z wyjątkiem drzewa *COI* (**Ryc. 5**), na którym *P. jenningsi* stanowi kład monofiletyczny. Pomimo że, powyższe taksony spełniają kryteria odrębnych gatunków morfologicznych (wielkość komórki, budowa aparatu jądrowego) i biologicznych (brak zdolności do koniugacji), nie mogą być w pełni wyodrębnione przy pomocy zastosowanych przez mnie trzech fragmentów genomu ITS1-5.8S-ITS2-5'LSU, *COI* i *CytB* (**Ryc. 7**).

Wyjaśnieniem otrzymanych wyników może być, podobnie jak w przypadku niektórych gatunków zespołu *Paramecium aurelia*, proces niekompletnego sortowania linii filogenetycznych. W niniejszej pracy zwróciłem uwagę na fakt, iż powyższe zjawisko występuje nie tylko u gatunków bliźniaczych zespołu *P. aurelia*, ale także pomiędzy gatunkami różniącymi się cechami morfologicznymi. Uzyskane wyniki popierają hipotezę, że radiacja, która nastąpiła po ostatniej z trzech duplikacji genomu obejmowała nie tylko zespół *P. aurelia* (jak sugeruje Aury i wsp., 2006), ale także syngeny *P. jenningsi* i *P. schewiakoffi*.

6. Tarcz S. ✉, Rautian M., Potekhin A., Sawka N., Beliauskaya A., Nekrasova I., Przyboś E. 2014. *Paramecium putrinum* (Ciliophora, Protozoa): The first insight into the variation of two DNA fragments – Molecular support for the existence of syngens. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 73: 140-145 IF₂₀₁₂= 4.066; MNiSW=30

Paramecium putrinum (Claparede i Lachmann, 1858) to słodkowodny gatunek kosmopolityczny znany z terenów o klimacie zimnym lub umiarkowanym ze stref Palearktycznej i Nearktycznej. Prawdopodobnie nie występuje w strefie międzyzwrotnikowej. Jego komórki o kształcie wąskim i jajowatym mają długość 80 do 140µm, w związku z czym *P. putrinum* należy do najmniejszych w obrębie rodzaju *Paramecium*. Według badań z lat siedemdziesiątych XX w. uważa się, że w obrębie *P. putrinum* istnieje 4 lub 5 syngenów (Jankowski, 1972). Prezentowane przeze mnie badania opierają się na 27 nowo oznaczonych na podstawie cech morfologicznych szczepów *P. putrinum* zebranych z odległych stanowisk z terenu Palearktyki (**Ryc. 1**) (kolekcja żywych kultur *P. putrinum* z lat 70 zaginęła). **Na uwagę zasługuje fakt, że jest to pierwsza ocena genetycznej zmienności wewnątrzgatunkowej u *P. putrinum*.** W celu przedstawienia pełniejszego obrazu zależności filogenetycznych w obrębie tego gatunku badania poszerzono o analizę porównawczą sekwencji ITS1-5.8S-ITS2-5'LSU, *COI* uzyskanych od blisko spokrewnionych z nim *P. bursaria* i *P. duboscqui*.

Zastosowane dwa markery genetyczne (rDNA i *COI*) pokazały (**Ryc. 1a,1b**), że *P. putrinum* stanowi grupę monofiletyczną i siostrzaną w stosunku do *P. duboscqui*, natomiast długość gałęzi terminalnych prowadzących do poszczególnych kładów (Pu A, Pu B, Pu C, Pu D, i Pu E) jest podobna do długości gałęzi prowadzących do pięciu syngenów u *P. bursaria*. Średnia zmienność fragmentu *COI* wśród badanych szczepów *P. putrinum*

($N = 27$, p -distance = 0.068) jest porównywalna do średniej zmienności pomiędzy syngenami *P. bursaria* ($N = 26$, p -distance = 0.063) (**II.A.15**). Z kolei średnia zmienność w obrębie *P. duboscqui* ($N = 7$, p -distance = 0.034) jest znacznie niższa i przypuszcza się, że w jego obrębie istnieje tylko jeden syngen (Boscaro i wsp., 2012). Ponadto analiza sieci haplotypów skonstruowanych dla obydwu badanych fragmentów genomu (**Ryc. 2a,b**) wykazała obecność pięciu grup oznaczonych Pu A, Pu B, Pu C, Pu D i Pu E. W związku z tym założono, że **poszczególne haplogrupy reprezentują pięć izolowanych rozrodczo populacji (syngenów) *P. putrinum***. Przypuszczenia te potwierdzają się w oparciu o wstępne wyniki krzyżówek genetycznych. Okazało się, że przedstawiciele dwóch populacji uzyskanych z jeziora Chanka (daleki wschód Rosji, **Tab. 1**) mogą należeć do jednego syngenu (haplogrupa Pu B). Podobnie możliwy jest przepływ genów pomiędzy szczepami BM 4-1 i BMK 3-2, (rejon Morza Białego, Rosja) (haplogrupa Pu C), czy szczepami z półwyspu Kamczatka (haplogrupa Pu E). Pozostałe krzyżówki dały wynik negatywny, który oprócz braku przynależności do jednego syngenu może także oznaczać niedojrzałość płciową lub nieodpowiedni typ płciowy któregoś z testowanych szczepów *P. putrinum*. W związku z tym negatywny rezultat krzyżówki genetycznej nie dowodzi braku przynależności do określonego syngenu. Z punktu widzenia dalszych badań krzyżówki międzysyngenowe są rzadko spotykane – obserwowano je tylko 3 razy na 113 badanych szczepów syngenu 1 i 59 szczepów syngenu 2 (Jankowski 1962). To wskazuje na prawie całkowitą izolację rozrodczą syngenów u *P. putrinum*, które jak uważam, mogą w przyszłości zostać podniesione do rangi gatunków bliźniaczych.

Odrębnym zagadnieniem poruszonym przeze mnie w powyższych publikacjach jest biogeografia mikroorganizmów eukariotycznych. Obecnie ich występowanie w różnych typach nisz ekologicznych jest opisywane przez dwie hipotezy: „każdy gatunek mikroorganizmów eukariotycznych z racji swoich rozmiarów jest kosmopolityczny” (Finlay i wsp., 2006.) oraz „przynajmniej 30% gatunków mikroorganizmów ma charakter endemiczny” tzw. „umiarkowany endemizm” (Foissner 2008).

To właśnie ten drugi model lepiej opisuje występowanie badanych gatunków *Paramecium*. **W kilku przebadanych gatunkach zaobserwowaliśmy obecność gatunków bliźniaczych/syngenów/haplogrup o zasięgu kosmopolitycznym, a także endemicznym.** W obrębie zespołu *P. aurelia* (**4**) przykładem gatunków o szerokim zasięgu jest *P. tetraurelia* (znany z terenów Europy, Azji, obu Ameryk czy Australii), a występowanie endemiczne jest

charakterystyczne dla *P. undecaurelia* (trzy stanowiska z Missisipi i Teksasu w USA). W przypadku *P. jenningsi* (5) syngen PJ1 posiadał zasięg kosmopolityczny (Azja, Afryka czy Ameryka Północna), a syngen PJ2 jest znany tylko z jednego stanowiska w Indiach. Z kolei u *P. putrinum* (6) szczepy należące do haplogrupy Pu B były izolowane ze zbiorników wodnych znajdujących się zarówno w Europie (Chorwacja) jak i na dalekim wschodzie Rosji (półwysep Kamczatka), a występowanie reprezentantów haplogrupy Pu C ograniczone było do niewielkiego obszaru nad Morzem Białym (północna Rosja).

Ciekawym zagadnieniem poruszonym w prezentowanym cyklu prac jest sposób rozprzestrzeniania i zasiedlania nowych ekosystemów przez badane gatunki *Paramecium*. Nie stwierdzono dotychczas istnienia cyst, które ułatwiałyby bierne pokonywanie dużych odległości, w związku z tym komórka musi być przeniesiona w niewielkiej ilości wody. W powyższych artykułach zwrócono uwagę na fakt, że w obrębie jednego gatunku identyczne haplotypy np. (ITS1-5.8S-ITS2) posiadały szczepy *P. multimicronucleatum* (2 - Ryc. 1) pochodzące z terenu Europy, Azji, Hawajów czy Ameryki Południowej. **To mogłoby sugerować niedawne rozprzestrzenienie się i kolonizację nowych siedlisk przez jedną, dużą populację tego gatunku.** Z kolei odmienną sytuację zaobserwowano u *P. putrinum*, gdzie na niewielkim obszarze półwyspu Kamczatka zidentyfikowano siedem haplotypów *COI* należących do trzech z pięciu opisanych haplogrup (6 – Tab.1, Ryc. 2a,b). **Otrzymane wyniki wskazują, że obszar półwyspu Kamczatka może być miejscem, z którego populacje *P. putrinum* rozprzestrzeniły się na Północną Europę.**

Istotnym problemem w badaniach biogeograficznych orzęsków z rodzaju *Paramecium* jest brak dokładnych informacji na temat występowania zarówno w skali globalnej (większość danych pochodzi z terenu Północnej Europy, natomiast poza pojedynczymi stanowiskami półkula południowa jest niezbadana), jak i lokalnej (występowanie i zmienność genetyczna populacji w poszczególnych zbiornikach naturalnych).

Podsumowując, zgłoszony przeze mnie jednotematyczny cykl oryginalnych artykułów naukowych jest obszernym opracowaniem, poruszającym zagadnienia związane nie tylko z przebiegiem specjacji w obrębie rodzaju *Paramecium*, ale także dostarczającym wielu użytecznych danych dla przyszłych badań z zakresu biogeografii oraz badań populacyjnych innych mikroorganizmów eukariotycznych. Co więcej, trzy spośród przedstawionych prac należą do nielicznych, w których wykorzystano trzy niezależne metody rozróżnienia blisko spokrewnionych taksonów tj. krzyżówki genetyczne (biologiczna definicja

gatunku), analizę budowy aparatu jądrowego (morfologiczna koncepcja gatunku) oraz sekwencjonowanie dwóch-trzech fragmentów genomu (filogenetyczna koncepcja gatunku). Takie podejście daje możliwość otrzymania pełniejszego obrazu wzajemnych zależności ewolucyjnych pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami orzęsków.

Realizacja poszczególnych zadań badawczych w zakresie omawianych prac prowadzona była (oprócz działalności statutowej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN) w ramach trzech grantów:

- 1) Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (numer N N303 415636) (2009 - 2011); tytuł grantu: „Identyfikacja i określenie stopnia pokrewieństwa pomiędzy gatunkami orzęsków należących do zespołu *Paramecium aurelia* (Ciliophora, Protozoa)”; kierownik grantu: dr Sebastian Tarcz
- 2) Grant Iuventus Plus Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (numer IP2011 055971) (2012 - 2014); tytuł grantu: „Ocena bioróżnorodności rodzaju *Paramecium* w oparciu o kod kreskowy DNA”; kierownik grantu: dr Sebastian Tarcz
- 3) Grant OPUS Narodowego Centrum Nauki (numer 2012/05/B/NZ8/00387) (2013 - 2015); tytuł grantu: „*Paramecium jenningsi* - struktura gatunku i charakterystyka syngenów w oparciu o krzyżówki genetyczne, badania cytologiczne oraz analizę wybranych fragmentów genomu”; kierownik grantu: prof. Ewa Przyboś

Opublikowane w powyższych pracach wyniki zostały również zaprezentowane na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. Badania wykonywane były we współpracy z naukowcami z innych jednostek krajowych (m.in. Instytutu Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie) oraz zagranicznych (m.in. Uniwersytetu w Petersburgu).

Literatura

W autoreferacie uwzględniono tylko wybrane pozycje z literatury przedmiotu. Szczegółowe odnośniki do badań innych autorów znajdują się w tekstach moich prac.

Aufderheide, K.J., Daggett, P., Nerad, T.A., 1983. *Paramecium sonneborni* n. sp. A new member of *Paramecium aurelia* species-complex. J. Protozool. 30, 128-131.

Aury, J.M., Jaillon, O., Duret, L., Noel, B., Jubin, C., Porcel, B.M., Seguerens, B., Daubin, V., Anthouard, V., Aiach, N., Arnaiz, O., Billaut, A., Beisson, J., Blanc, I., Bouhouche, K., Camara, F., Duharcourt, S., Guido, R., Gogendeau, D., Katinka, M., Keller, A.M., Kissmehl, R., Klotz, C., Koll, F., Le Mouel, A., Lepere, G., Malinsky, S., Nowacki, M., Nowak, J.K., Plattner, H., Poulain, J., Ruiz, F., Serrano, V., Zagulski, M., Dessen, P., Betermier, M., Weissenbach, J., Srapelli, C., Schachter, V., Sperling, L., Meyer, E., Cohen, J., Wincker, P. 2006. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. Nature 444, 171-178.

Avise, J.C., Ball, R.M. Jr. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. Oxf. Surv. Evol. Biol. 7, 45-67.

Barth, D., Krenek, S., Fokin, S.I., Berendonk, T. U., 2006. Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 20-25.

Barth, D., Przyboś, E., Fokin, S.I., Schlegel, M., Berendonk, T.U., 2008. Cytochrome b sequence data suggest rapid speciation within the *Paramecium aurelia* species complex. Mol. Phylogenet. Evol. 49, 669-673.

Coleman, A.W., 2005. *Paramecium aurelia* revisited. J. Eukaryot. Microbiol. 52, 68-77.

Fokin, S.I., 2010/2011. *Paramecium* genus: biodiversity, some morphological features and the key to the main morphospecies discrimination. Protistology 6, 227-235.

Fokin, S.I., Przyboś, E., Chivilev, S.M., Beier, C.L., Horn, M., Skotarczak, B., Wodecka, B., Fujishima, M., 2004. Morphological and molecular investigations of *Paramecium schewiakoffi* nov. spec. (Ciliophora, Oligohymenophorea) and current status of *Paramecium* distribution, and taxonomy of *Paramecium* spp. Europ. J. Protistol. 40, 225-243.

Hebert, P.D., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 14812-14817.

Heckman, K.L., Mariani, C.L., Rasoloarison, R., Yoder, A.D., 2007. Multiple nuclear loci reveal patterns of incomplete lineage sorting and complex species history within western mouse lemurs (*Microcebus*). Mol. Phylogenet. Evol. 43, 353-367.

Kizirian, D., Donnelly, M.A., 2004. The criterion of reciprocal monophyly and classification of nested diversity at the species level. Mol. Phylogenet. Evol. 32, 1072-1076.

Kreutz, M., Stoeck, T., Foissner, W., 2012. Morphological and Molecular Characterization of *Paramecium* (*Viridoparamecium* nov. subgen.) *chlorelligerum* Kahl (Ciliophora). J. Eukaryot. Microbiol. 59: 548-563

Mallet, J., 2007. Hybrid speciation. Nature 446, 279-283.

Przyboś, E., Prajer, M., Greczek-Stachura, M., Skotarczak, B., Maciejewska, A., Tarcz, S., 2007. Genetic analysis of the *Paramecium aurelia* species complex (Protozoa: Ciliophora) by classical and molecular methods. Syst. Biodiv. 5, 417-434.

Stoeck, T., Przyboś, E., Schmidt, H.J., 1998. Combination of genetics with inter- and intra-strain crosses and RAPD-fingerprints reveals different population structures within the *Paramecium aurelia* species complex. Eur. J. Protistol. 34, 348-355.

Strüder-Kypke, M.C., Wright, A.-D.G., Fokin, S.I., Lynn, D.H., 2000. Phylogenetic relationships of the genus *Paramecium* inferred from small subunit rRNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 14, 122-130.

Strüder-Kypke, M.C., Lynn, D.L., 2010. Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. Syst. Biodiv. 8, 131-148.

Sonneborn, T.M., 1975. The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species. Trans. Amer. Microsc. Soc. 94, 155-178.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

W czasie studiów (biotechnologia na Uniwersytecie Adama Mickiewicza w Poznaniu) moje zainteresowania badawcze skupiały się na analizie zmienności fragmentów DNA przy pomocy technik biologii molekularnej. Na III roku studiów brałem udział w projekcie badawczym realizowanym w Pracowni Genetyki Nowotworów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, polegającym na modelowaniu *in-silico* struktur drugorzędowych mRNA genów, w których ekspansja ciągów trójnukleotydowych odpowiada za powstawanie szeregu chorób neurodegeneracyjnych u ludzi. W pracy magisterskiej, pisanej pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Krzyżosiaka, zaprezentowałem wyniki badań dotyczących występowania polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) w mRNA genu *IT15*. Ekspansja ciągu powtórzeń trójnukleotydowych w tym genie powoduje wystąpienie płasawicy Huntingtona. Uzyskane wyniki były częścią większego projektu, w którym badano częstość występowania różnych wariantów nukleotydowych w poszczególnych miejscach polimorficznych u osób zdrowych i chorych na płasawicę.

Od 2003 roku pracuję naukowo w Instytucie Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN w Krakowie, w którym w ramach Międzynarodowego Studium Doktoranckiego Nauk Przyrodniczych PAN rozpocząłem badania nad zmiennością genetyczną orzęsków należących do zespołu gatunków bliźniaczych *Paramecium aurelia*.

W powyższych analizach stosowałem metody biologii molekularnej oparte na reakcjach

PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) tj. Analizę Losowo Amplifikowanego Polimorficznego DNA (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD), ocenę Polimorfizmu Długości Fragmentów Restrykcyjnych (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) oraz zmodyfikowaną technikę RFLP, zwaną ARDRA (ang. *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), czyli trawienie enzymami restrykcyjnymi uprzednio amplifikowanego fragmentu DNA kodującego podjednostki rybosomowe.

Przy pomocy technik RAPD i ARDRA wykazałem istnienie polimorfizmu fragmentów DNA u pięciu szczepów *P. septaurelia* pochodzących z delty Wołgi (Rosja) oraz Alabamy (USA) (II.A.1), a także u *P. novaurelia*, u którego technika RAPD wykazała dużą zmienność genetyczną pomiędzy badanymi szczepami (II.A.2). Analizy RAPD, RFLP oraz ARDRA, przeprowadzane przez nasz zespół, których wyniki częściowo opracowywałem, zastosowano u dwunastu gatunków zespołu *P. aurelia*. Pozwoliły one na wyciągnięcie pełniejszych wniosków dotyczących zmienności genetycznej w obrębie całego zespołu oraz ustalenie dalszych planów badawczych (II.A.5). **Wykazaliśmy, że poszczególne gatunki bliźniacze cechują się różnym stopniem polimorfizmu genetycznego.** Wszystkie zastosowane metody molekularne wykazały, że w obrębie zespołu *P. aurelia* można wyróżnić trzy grupy, które odzwierciedlają podział ze względu na sposób dziedziczenia typów płciowych. **Gatunkiem, na który zwróciliśmy szczególną uwagę jest *P. dodecaurelia*. Cechował się on największym polimorfizmem genetycznym w obrębie zespołu.**

Kolejne moje zadanie badawcze (II.A.3), było związane właśnie z tym gatunkiem i dotyczyło jego charakterystyki molekularnej w oparciu o analizę porównawczą dwóch fragmentów rDNA: 3'SSU rDNA-ITS1 (210pz) oraz 5'LSU rDNA (350pz). **Wartym podkreślenia jest fakt, że w 2006 roku były to jedne z pierwszych analiz sekwencji DNA u *Paramecium* i pierwsze, które miały na celu ocenę zmienności wewnątrzgatunkowej u badanych gatunków bliźniaczych zespołu *P. aurelia*.** Bazując na sekwencjach z Banku Genów (ang. GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov) zaprojektowałem część starterów (II.A.3, Tabela 2) użytych do amplifikacji wyżej wymienionych fragmentów DNA. Uzyskane przez nas wyniki pokazały znaczną zmienność sekwencji u *P. dodecaurelia* (6 badanych szczepów), brak polimorfizmu u *P. tredecaurelia* (2 szczepy) oraz niewielką zmienność między dwoma szczepami *P. quadecaurelia* – 3 substytucje nukleotydowe we fragmencie 5'LSU. Wykazałem ponadto, że zmienność fragmentu dużej podjednostki rDNA (5'LSU) jest większa niż w przypadku często stosowanego fragmentu ITS1 (ang. *Internal transcribed Spacer 1*). Zastosowanie

fragmentu 5'LSU rDNA pozwoliło na odróżnienie trzech badanych w powyższej pracy gatunków bliźniaczych. W związku z tym zaproponowałem użycie zmiennego fragmentu 5'LSU rDNA jako markera genetycznego zarówno w zespole gatunków *P. aurelia* jak i w całym rodzaju *Paramecium*. Dodatkowo uzyskane sekwencje 5' LSU rDNA pozwoliły na wstępne testowanie hipotez dotyczących biogeografii *P. dodecaurelia*. Stwierdziliśmy, że najbardziej odległy genetycznie i geograficznie jest szczep z Hawajów (HHS), a szczepy europejskie (G, IE i TR) tworzą grupę monofiletyczną na drzewach skonstruowanych w oparciu o analizę porównawczą fragmentu 5' LSU rDNA.

Jednak ówczesnym głównym celem moich badań, a jednocześnie tematem pracy doktorskiej, była analiza zmienności wewnątrzgatunkowej u *P. novaurelia* (Beale i Schneller, 1954). Jest to gatunek o dużych możliwościach adaptacyjnych do środowiska. Dotychczas znany był wyłącznie na kontynencie europejskim, gdzie występuje najczęściej (z wyjątkiem jednego stanowiska w azjatyckiej części Turcji). Drugie pozaeuropejskie stanowisko tego gatunku (Boston, USA) stworzyło możliwość sprawdzenia, czy izolacja geograficzna wpływa na zwiększenie różnic w badanych sekwencjach (II.A.4). Oprócz dwóch użytych w poprzedniej publikacji markerów genetycznych, **do analiz włączyłem po raz pierwszy fragment genu mitochondrialnego kodującego pierwszą podjednostkę oksydazy cytochromowej (COI)**. Była to druga praca (po Barth i wsp., 2006), w której wykazano dużo większą zmienność tego fragmentu u *Paramecium* nawet przy jednoczesnym braku polimorfizmu analizowanych fragmentów rybosomalnych (II.A.4, Tabela 3a, 3b).

5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

Wyniki z pracy doktorskiej opublikowałem w postaci jednego artykułu (II.A.16). **Były to pierwsze badania zmienności genetycznej 25 szczepów w obrębie jednego z gatunków bliźniaczych zespołu *P. aurelia***. Przeprowadzona przeze mnie analiza trzech fragmentów genomu tj. ITS1-5.8S-ITS2, 5'LSU rDNA oraz COI mtDNA wykazała, że obserwowana zmienność wewnątrz *P. novaurelia* jest porównywalna do zmienności w obrębie całego zespołu *P. aurelia*. Wcześniejsze badania (Hori i wsp. 2006) sugerowały, że *P. novaurelia* należy do gatunków o umiarkowanym stopniu kojarzenia krewniaczego (dłuższy okres niedojrzałości płciowej), a to z kolei może się przekładać się na rozszerzenie jego zasięgu.

Mimo, to zasugerowałem w pracy, że *P. novaurelia* ma zasięg ograniczony tylko do Europy, a szczep opisany poprzednio (II.A.4) z Północnej Ameryki mógł być tam zawleczony.

W prowadzonych przez nasz zespół badaniach byłem osobą odpowiedzialną za zastosowanie markerów molekularnych do oceny zmienności genetycznej i identyfikacji gatunków z zespołu *Paramecium aurelia*. Kolejne artykuły, w których byłem współautorem, koncentrowały się na analizach molekularnych poszczególnych gatunków zespołu.

W trzech przypadkach tj. *P. dodecaurelia* (II.A.6), *P. tetraurelia* (II.A.8), *P. octaurelia* (II.A.9) oprócz ujawnionego różnego stopnia polimorfizmu wewnątrzgatunkowego wykazałem, że na drzewach filogenetycznych badane gatunki nie stanowią kładów monofiletycznych. Pomimo tego „odległe” filogenetycznie szczepy posiadały zdolność do koniugacji w obrębie jednego gatunku bliźniaczego. W przypadku wyników uzyskanych dla *P. tetraurelia* (II.A.8) i *P. octaurelia* (II.A.9) brak wzajemnego monofiletyzmu próbowano wyjaśnić przy pomocy obecności w obydwu gatunkach tego samego (cytoplazmatycznego) sposobu dziedziczenia typów płciowych oraz zdolności do wchodzenia w reakcje płciowe jednak bez prawdziwej koniugacji (tj. wymiany mikrojąder).

Z kolei odmienną sytuację zaobserwowaliśmy u innych gatunków tj. *P. tredecaurelia* (II.A.19), *P. quadecaurelia* (II.A.17) oraz *P. sonneborni* (II.A.21), z których każdy, pomimo różnego stopnia zmienności wewnątrzgatunkowej, charakteryzował się monofiletyzmem w obrębie badanych szczepów. Fakt ten pozwolił mi w pierwszej kolejności sklasyfikować nowe szczepy *Paramecium aurelia* do powyższych gatunków w oparciu o markery molekularne (ITS1-5.8S-ITS2-5-LSU rDNA, *COI*, *CytB*). Dopiero później możliwa była weryfikacja uzyskanych wyników przy pomocy krzyżówek genetycznych. **Dodatkową wartością tych prac jest fakt, że dotyczą one gatunków „rzadkich”, opisywanych dotychczas tylko z jednego do dwóch stanowisk głównie ze strefy tropikalnej, słabo zbadanej pod względem zasięgu i występowania gatunków z rodzaju *Paramecium*.**

W przypadku *P. tredecaurelia* (II.A.19) oraz *P. sonneborni* (II.A.21) ujawniliśmy brak lub niewielką (do 6 miejsc polimorficznych) zmienność analizowanych fragmentów genomu, co w połączeniu z pochodzeniem badanych szczepów (Meksyk, Tajlandia, Francja, Madagaskar dla *P. tredecaurelia* oraz USA, Cypr dla *P. sonneborni*) mogłoby wskazywać na fakt, że populacje obydwu tych gatunków były bardzo małe, a ich obecne rozprzestrzenienie nastąpiło stosunkowo niedawno. Innym wyjaśnieniem uzyskanych przez nas wyników może być wysoka presja selekcyjna warunkowana temperaturami panującymi

w danym siedlisku (w tym przypadku strefa międzyzwrotnikowa), która prowadzi do zredukowanej zmienności wewnątrzgatunkowej (Sung i wsp., 2012).

W przeciwieństwie do dwóch powyższych gatunków (**II.A.19, II.A.21**), trzeci z nich *P. quadecaurelia* (**II.A.17**) pomimo, że tworzy grupę monofiletyczną wobec innych gatunków zespołu *P. aurelia*, charakteryzuje się zróżnicowaniem genetycznym większym niż pomiędzy niektórymi gatunkami zespołu na przykład pomiędzy *P. primaurelia* i *P. pentaurelia*. Zasugerowaliśmy, że tak znaczne zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe oraz duże dystanse dzielące poszczególne populacje *P. quadecaurelia* (Ekwador, Namibia, Tajlandia, Australia) mogą prowadzić w przyszłości do ich podziału na izolowane genetycznie linie.

Wykorzystanie homologicznych fragmentów DNA uzyskanych z jak największej liczby przedstawicieli poszczególnych gatunków *Paramecium* pozwoliło po raz pierwszy na ocenę zależności filogenetycznych *P. sonneborni* oraz pozostałych gatunków należących do zespołu *P. aurelia*, jak również blisko spokrewnionych gatunków *P. jenningsi* i *P. schewiakoffi* (**II.A.21**). **Uzyskane wyniki analiz opartych nie tylko na podstawie danych molekularnych (filogenetyczna definicja gatunku), ale także krzyżówek genetycznych (biologiczna definicja gatunku) oraz preparatów cytologicznych (morfologiczna definicja gatunku) pozwoliły nam na postawienie pytania: czy *P. sonneborni* powinien być zaliczany do zespołu *P. aurelia*?** Skonstruowane drzewa filogenetyczne pokazały, że *P. sonneborni* włączony na podstawie cech morfologicznych przez Aufderheide i wsp. (1983) do zespołu *P. aurelia* tworzy kład monofiletyczny razem z *P. jenningsi* i *P. schewiakoffi*, a jednocześnie odrębny od pozostałych gatunków zespołu *P. aurelia*. Wyjaśnieniem powyższych niezgodności zająłem się szerzej w jednej z publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (**4**).

Naturalną konsekwencją prowadzonych przeze mnie analiz molekularnych było rozszerzenie ich na inne gatunki rodzaju *Paramecium*. Jednym z nich jest *P. bursaria*, który najwcześniej wyodrębnił się z rodzaju *Paramecium* (Fokin i wsp., 2004) i podobnie jak w przypadku większości gatunków należących do rodzaju opisano w nim obecność syngenów (Bomford 1966). Wyjątkową cechą tego gatunku jest obecność we wnętrzu komórki symbiotycznych glonów z rodzaju *Chlorella*. Wstępne analizy molekularne 10 szczepów *P. bursaria* w oparciu o techniki RAPD, ARDRA wykazały znaczne zróżnicowanie genetyczne (większe niż w obrębie zespołu *P. aurelia*), a skonstruowane przez nas drzewo fragmentu ITS1-5.8S-ITS2 pokazało istnienie odrębnych kładów (**II.A.10**). **Zasugerowaliśmy, że poszczególne klady mogą odpowiadać różnym syngenom.** Jednak dopiero wykonanie

przez naszych kolegów z Petersburga testów koniugacyjnych pomiędzy poszczególnymi szczepami *P. bursaria* dało możliwość wyodrębnienia izolowanych rozrodczo grup.

Moim zadaniem w powyższym projekcie była charakterystyka molekularna 26 nowo zebranych szczepów *P. bursaria*. W związku z faktem, że nie ma obecnie poprzedniej kolekcji, na podstawie której wyodrębniono 6 syngenów (Bomford, 1966), nie było możliwości uzyskania i bezpośredniego porównania danych molekularnych. **We wspólnej publikacji (II.A.15) zaproponowaliśmy nową numerację dla pięciu syngenów, ich opis oraz wprowadzenie nowej kolekcji standardowej *P. bursaria* (przechowywanej na Uniwersytecie w Petersburgu). Jest to tym ważniejsze, że oprócz opisanie nowych syngenów (gatunków kryptycznych) po raz pierwszy przedstawiono ich charakterystykę molekularną w oparciu o trzy niezależne loci tj. ITS1-5.8S-ITS2-5-LSU rDNA, *COI* mtDNA i fragment genu kodującego podjednostkę histonu *H4*. Skonstruowane na podstawie powyższych markerów drzewa filogenetyczne wykazały, że poszczególne klady odzwierciedlają podział na syngeny. W związku z tym nasze badania pokazały użyteczność powyższych fragmentów DNA jako narzędzi służących identyfikacji nierozróżnialnych morfologicznie a izolowanych rozrodczo populacji w obrębie *P. bursaria*.**

Podobnie jak w przypadku zespołu gatunków *P. aurelia* stwierdziliśmy, że niektóre z syngenów charakteryzują się szerokim a inne ograniczonym zasięgiem. Syngeny kosmopolityczne tj. R1 i R2 były izolowane ze zbiorników wodnych od Wielkiej Brytanii do Syberii, a syngen R3 zasiedla ekosystemy na wschodzie Rosji, w Chinach oraz na terenie USA. Z kolei syngen R4 jest ograniczony do terytorium Ameryki Północnej, a syngen R5 jest znany z tylko z dwóch stanowisk w europejskiej części Rosji: z okolic Petersburga i delty Wołgi (II.A.15).

Zmienność genetyczna orzęsków z rodzaju *Paramecium* pochodzących z jednego zbiornika wodnego

Informacje na temat przestrzennej i sezonowej zmienności genetycznej mikroorganizmów jednokomórkowych zasiedlających niewielki akwen są stosunkowo rzadko spotykane (Barth i wsp., 2008a). W celu zbadania tego zagadnienia w zespole *Paramecium aurelia* zastosowaliśmy jako markery trzy fragmenty DNA (ITS1-5.8S-ITS2-5_LSU rDNA, *COI*, *CytB*). Do badań wybrano dwa zbiorniki wodne znajdujące się na terenie Krakowa tj. sztuczny - w śródmiejskim parku oraz naturalny - usytuowany na obrzeżach miasta. W ciągu dwóch

lat, w różnych porach roku pobierano próbki wody ze ściśle określonych miejsc. Następnie izolowano z nich orzęski, oznaczano gatunek w oparciu o cechy budowy morfologicznej oraz krzyżówki genetyczne. Moją rolą była charakterystyka molekularna wyizolowanych szczepów.

W sztucznym stawie (osuszonym na okres zimowy) wykryto obecność dwóch gatunków bliźniaczych z zespołu *P. aurelia* tj. *P. dodecaurelia* (II.A.7) w latach 2006-2007 oraz *P. pentaurelia* (II.A.13) w roku 2005 i 2008. W oparciu o analizę porównawczą badanych markerów molekularnych stwierdziliśmy nie tylko brak zmienności wewnątrzgatunkowej, ale także międzygatunkowej tj. obecność identycznych haplotypów w obydwu badanych taksonach. **Uzyskane wyniki mogłyby wskazywać na możliwość przepływu genów pomiędzy gatunkami bliźniaczymi zasiedlającymi ten sam ekosystem.** Pomimo, że w warunkach laboratoryjnych stwierdza się brak zdolności do koniugacji między różnymi gatunkami bliźniaczymi, nie można wykluczyć tego typu procesów zachodzących w naturalnych siedliskach. Drugim wyjaśnieniem obserwowanych wyników może być zjawisko niekompletnego sortowania linii filogenetycznych, opisane szerzej w osiągnięciu naukowym (4). Co ważne, pantofelki z badanego stawu posiadały identyczne haplotypy jak pantofelki zebrane z europejskiej części Rosji. **To mogłoby sugerować szerokie rozprzestrzenienie i stosunkowo szybką kolonizację nowych ekosystemów przez daną populację orzęsków (II.A.7, II.A.13).** Zidentyfikowane gatunki *Paramecium* cechują się stosunkowo dużym zasięgiem występowania, co wskazywałoby na ich kosmopolityczny charakter (Finlay i wsp., 2006).

Analiza próbek wody z naturalnego zbiornika wodnego wykazała obecność pięciu gatunków z zespołu *Paramecium aurelia* (oznaczonych za pomocą krzyżówek genetycznych i markerów molekularnych) (II.A.14). Większość ze zidentyfikowanych gatunków tj. *P. biaurelia*, *P. triaurelia*, *P. tetraurelia*, *P. pentaurelia* nie wykazywała różnic wewnątrzgatunkowych w obrębie badanych fragmentów DNA. Zmienność wewnątrzgatunkową, zarówno przestrzenną jak i sezonową, stwierdzono jedynie u *P. dodecaurelia*, u którego zidentyfikowałem obecność trzech różnych wariantów fragmentu *CytB*. Można to wytłumaczyć faktem zasiedlania stawu przez nowe populacje *P. dodecaurelia* zawleczone przez ptactwo wodne (obecność kaczek, łabędzi czy perkozów w badanym stawie) z innych akwenów. Drugim, mniej prawdopodobnym wyjaśnieniem, jest szybka mutacja fragmentu *CytB* u tego gatunku, u którego ponadprzeciętna zmienność

genetyczna była opisywana w poprzednich pracach (Barth i wsp., 2008a,b). Pomimo sympatrycznego występowania w badanym stawie pięciu gatunków zespołu *P. aurelia*, nie stwierdzono identycznych haplotypów obecnych w więcej niż jednym taksonie (II.A.14).

Taksonomia rodziny Tortricidae (zwójkowate)

Odrębnym wynikiem moich badań z zastosowaniem analiz DNA, nie związanym z orzęskami, są publikacje dotyczące występujących na całym świecie motyli z rodziny Tortricidae. Dotychczas opisano prawie 10000 gatunków, z których duża liczba nie ma jasno określonej pozycji taksonomicznej. Jednak ogromna ich liczba to synonimy. Około połowa gatunków znana jest z pojedynczych okazów, większość z nich pochodzi z tropików. Systematyka Tortricidae jest oparta na cechach morfologicznych postaci dorosłych osobników (imago) oraz budowie ich genitaliów. Mimo to zaliczenie wielu gatunków do poszczególnych plemion a nawet rodzajów jest wątpliwe. Techniki analiz DNA są nadal rzadko stosowane w systematyce Tortricidae. Większość opublikowanych dotychczas badań dotyczy zmienności populacyjnej gatunków ważnych z punktu widzenia gospodarki. Wiele z nich jest szkodnikami – np. gąsienice rodzaju *Cydia*, które powodują robaczywienie owoców.

W prezentowanych badaniach sprawdzałem przydatność sekwencji genu *COI* do wstępnych analiz mających na celu udoskonalenia systematyki Tortricidae. **We wszystkich opublikowanych przez nasz zespół publikacjach po raz pierwszy zastosowano techniki sekwencjonowania DNA dla analizy zmienności genetycznej badanych taksonów.** Uzyskane wyniki razem ze wcześniejszą wiedzą morfologiczną pozwoliły na weryfikację i synonimizację rodzajów *Croesia* i *Phylacophora* w plemienu Tortricini (II.A.12), czy synonimizację plemion Endotherniini (rodzaj *Endothernia*) z Bactrini (rodzaj *Bactra*) (II.D.1).

Ponadto, w oparciu o cechy morfologiczne i molekularne, wykazaliśmy przynależność neotropikalnego rodzaju *Orthocomotis* do plemienu Euliini (II.A.18). W ostatnim artykule, na podstawie danych morfologicznych oraz przeprowadzonej przeze mnie analizy molekularnej fragmentu genu *COI* (II.A.20), stwierdziliśmy odrębność plemienu Enarmoniini od plemion Olethreutini, Eucosmini i Grapholitini.

Podsumowując, połączenie analiz molekularnych opartych nawet na jednym fragmencie DNA razem z danymi morfologicznymi powinno ułatwić klasyfikację systematyczną tej słabo

zbadanej rodziny Microlepidoptera. Uzyskane wyniki dają potencjalną możliwość identyfikacji licznych gatunków dymorficznych. Dotychczas takie stwierdzenia były możliwe tylko drogą hodowli z jaj uzyskiwanych od samic przy zupełnym braku wiedzy o ich roślinach żywicielskich (próby na sztucznych pożywkach). Ponadto proponowane przez nas analizy mogą w przyszłości być stosowane do szybkiej identyfikacji szkodników np. w tropikalnym leśnictwie i sadownictwie.

Omówienie pracy dydaktycznej, organizacyjnej i działalności popularyzatorskiej

Pomimo, że dydaktyka nie była istotnym elementem mojej działalności, to w ramach edukacji akademickiej prowadziłem zajęcia z zakresu technik biologii molekularnej oraz mikrobiologii.

Na Uniwersytecie Rzeszowskim (Zamiejscowy Instytut Biotechnologii Stosowanej i Nauk Podstawowych UR w Weryni) był to fakultatywny cykl ćwiczeń dla I roku biotechnologii zatytułowany „Wprowadzenie do technik biologii eksperymentalnej”, realizowany w ramach projektu „Studenci kierunku Biotechnologia akceleratoremi Gospodarki Opartej na Wiedzy”. Celem opracowanych przeze mnie zajęć było zapoznanie studentów z podstawowymi technikami stosowanymi w biologii molekularnej, a ich dokumentacją był napisany przeze mnie skrypt pod tytułem: „Wprowadzenie do biologii eksperymentalnej”.

Drugi przedmiot, „Podstawy mikrobiologii z immunologią”, był prowadzony przeze mnie dla studentów III roku biologii oraz II roku chemii w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie. W ramach wykładów i ćwiczeń, oprócz zagadnień typowo mikrobiologicznych, studenci zapoznali się między innymi z technikami identyfikacji bakterii w oparciu o analizę polimorficznych fragmentów DNA.

Jestem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr Natalii Sawki zatytułowanej „Molekularne mechanizmy determinacji typów płciowych u wybranych gatunków *Paramecium aurelia*”. Ponadto byłem opiekunem praktyk studenckich pani Anny Radlickiej - studentki III roku biologii na Uniwersytecie Jagiellońskim.

Od 2009 roku kieruję Pracownią Technik Molekularnych ISEZ PAN, w której jestem odpowiedzialny za organizację pracy badawczej oraz prowadzenie dokumentacji administracyjnej i finansowej związanej z działalnością laboratorium. W roku 2011 zostałem

wybrany na sekretarza Rady Naukowej Instytutu Systematyki i Ewolucji Zwierząt i funkcję tę pełnię do chwili obecnej.

Brałem udział w organizacji imprez naukowych (Noc Biologów, Festiwal Nauki) współorganizowanych przez ISEZ PAN, które miały na celu zainteresowanie uczestników, w tym głównie dzieci i młodzieży gimnazjalnej, biologią pantofelków oraz zastosowaniem technik biologii molekularnej w identyfikacji organizmów. Współorganizowałem również „VII Sympozjum Polskiego Towarzystwa Taksonomicznego” w Ojcowie (17-20 czerwca 2006) oraz „Fifth Meeting of the GDRE Paramecium Genomics” w Krakowie (5-8 grudnia 2009). Kilukrotnie recenzowałem artykuły do czasopism znajdujących się w bazie Journal Citation Reports - Protist, Folia Biologica (Kraków), Molecular Biology Reports.

Uzyskane w trakcie prowadzonych przeze mnie analiz molekularnych sekwencje fragmentów DNA zostały przeze mnie zdeponowane w postaci 824 rekordów (stan na 30.05.2014) na stronie GenBanku (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Dane bibliometryczne (stan na 30.05.2014)

- Liczba opublikowanych prac: **28 (w tym 27 z listy JCR)**
- Sumaryczny Impact Factor (zgodny z rokiem opublikowania) wszystkich pozycji literaturowych: **42,365**
- Sumaryczna liczba cytowań według bazy Web of Science: **65 (bez autocytowań)**
- Indeks Hirscha według bazy Web of Science: **8**
- Sumaryczna liczba punktów MNiSW: **500**

Publikacje	Liczba publikacji	Impact Factor zgodny z rokiem opublikowania	Liczba punktów MNiSW
Przed uzyskaniem stopnia doktora	5	2,058	40
Po uzyskaniu stopnia doktora	17	20,201	275
Osiągnięcie naukowe	6	20.106	185
Razem	28	42,365	500

Szczegółowy wykaz dotychczasowych osiągnięć naukowych, dydaktycznych i organizacyjnych przedstawiłem w załączniku 6.

Kraków, 30.05.2014

Sebastian Tarcz