

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko

Małgorzata Pilot

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

Doktor nauk biologicznych, Muzeum i Instytut Zoologii PAN, 2005: Zmienność i struktura genetyczna populacji wilka *Canis lupus* w Europie Środkowo-Wschodniej. Promotor: Prof. Jacek Goszczyński

Magister, Uniwersytet Warszawski, Wydział Matematyki, Informatyki i Mechaniki (Międzywydziałowe Studia Matematyczno-Przyrodnicze), 2004: Stochastyczna stabilność w dynamicznych modelach gry Dylemat Więźnia i gier koordynacyjnych. Promotor: Prof. Jacek Mięksiz

Magister, Uniwersytet Warszawski, Międzywydziałowe Studia Ochrony Środowiska, 1999: Rozmieszczenie i aktywność norki amerykańskiej *Mustela vison* na wybrzeżach jezior Pojezierza Mazurskiego. Promotor: Prof. Michał Kozakiewicz

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2013-obecnie	Starszy Wykładowca/Adiunkt, School of Life Sciences, University of Lincoln, Wielka Brytania
2012-2013	Wykładowca/Adiunkt, School of Life Sciences, University of Lincoln, Wielka Brytania
2009-2012	Marie Curie Research Fellow, School of Biological and Biomedical Sciences, Durham University, Wielka Brytania
2007-2009	Stanowisko typu postdoc, School of Biological and Biomedical Sciences, Durham University, Wielka Brytania
2006-2012	Adiunkt, Muzeum i Instytut Zoologii PAN
2000-2005	Asystent, Muzeum i Instytut Zoologii PAN

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Rekonstrukcja historii ewolucyjnej wilka i psa w Eurazji

b) Lista publikacji wchodzących w skład osiągnięcia

1. Pilot M., Greco C., vonHoldt B.M., Randi E., Jędrzejewski W., Sidorovich V.E., Konopiński M.K., Ostrander E.A., Wayne R.K. 2018. Widespread, long-term admixture between grey wolves and domestic dogs across Eurasia and its implications for the conservation status of hybrids. *Evolutionary Applications*, 11: 662–680. IF 4,694, punktacja MNiSW - 35, Liczba cytowań - 5

2. Pilot M., Malewski T., Moura A.E., Grzybowski T., Oleński K., Kamiński S., Fadel F.R., Alagaili A., Mohammed O., Bogdanowicz W. 2016. Diversifying selection between pure-breed and free-breeding dogs inferred from genome-wide SNP analysis. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 6: 2285-2298. IF 2,861, punktacja MNiSW - 30, Liczba cytowań - 3

3. Pilot M., Malewski T., Moura A.E., Grzybowski T., Oleński K., Ruś A., Kamiński S., Fadel F.R., Mills D.M., Alagaili A., Mohammed O., Kłys G., Okhlopkov, I., Suchecka, E., Bogdanowicz, W. 2015. On the origin of mongrels: evolutionary history of free-breeding dogs in Eurasia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282: 20152189. IF 4,823, punktacja MNiSW - 40, Liczba cytowań - 12
4. Pilot M., Greco C., vonHoldt B.M., Jędrzejewska B., Randi E., Jędrzejewski W., Sidorovich V.E., Ostrander E.A., Wayne R.K. 2014a. Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves. *Heredity* 112, 428–442. IF 3,805, punktacja MNiSW - 35, Liczba cytowań - 36
5. Pilot M., Dąbrowski M.J., Hayrapetyan V., Yavruyan E.G., Kopaliani N., Tsingarska E., Bujalska B., Kamiński S., Bogdanowicz W. 2014b. Genetic variability of the grey wolf *Canis lupus* in the Caucasus in comparison with Europe and the Middle East: Distinct or intermediary population? *PLoS ONE* 9(4): e93828. IF 3,234, punktacja MNiSW - 40, Liczba cytowań - 15
6. Moura A.E., Tsingarska E., Dąbrowski M.J., Czarnomska S.D., Jędrzejewska B., Pilot M. 2014c. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics* 15: 407-415. IF 2,185, punktacja MNiSW - 20, Liczba cytowań - 23
7. Pilot M., Jędrzejewski W., Sidorovich V. E., Meier-Augenstein W., Hoelzel A.R. 2012. Dietary differentiation and the evolution of population genetic structure in a highly mobile carnivore. *PLoS ONE* 7: e39341. IF 3,730, punktacja MNiSW - 40, Liczba cytowań - 24
8. Pilot M., Branicki W., Jędrzejewski W., Goszczyński J., Jędrzejewska B., Dykyy I., Shkvryra M., Tsingarska E. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology* 10: 104. IF 3,702, punktacja MNiSW - 32, Liczba cytowań - 65
9. Hindrikson M., Remm J., Pilot M., Godinho R., Stronen A.V., Baltrūnaitė L., Czarnomska S.D., Leonard J.A., Randi E., Nowak C., Åkesson M., López-Bao J.V., Álvares F., Llaneza L., Echegaray J., Vilà C., Ozolins J., Rungis D., Aspi J., Paule L., Skrbinšek T., Saarma U. 2017. Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. *Biological Reviews*, 92: 1601-1629. IF 11,700, punktacja MNiSW - 50, Liczba cytowań - 19

Sumaryczny *Impact Factor* wymienionych publikacji: 40,734

Sumaryczna liczba punktów MNiSW wymienionych publikacji: 312

Sumaryczna liczba cytowań wymienionych publikacji: 202 (184 bez autocytacji)

Informacja o moim wkładzie w powstanie każdej z powyższych prac znajduje się w załączniku nr 4 - Dokumentacja habilitacji. Oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac, znajdują się w załączniku nr 5.

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

Wstęp

Tematem przewodnim prac wchodzących w skład opisanego tu osiągnięcia jest historia ewolucyjna wilka szarego (*Canis lupus*) i jego udomowionego podgatunku – psa domowego (*Canis lupus familiaris*). Wilk jest jednym z nielicznych dużych ssaków drapieżnych, które przeżyły okres wymierania megafauny w Późnym Plejstocenie i zachowały szeroki zasięg geograficzny w Holarktyce. Podobnie jak inne gatunki dużych ssaków, wilk doświadczył globalnego spadku liczebności populacji pod koniec Plejstocenu (Pilot et al. 2014, Fan et al. 2016), co wiązało się z wyginięciem ekotypów różniących się od współczesnych przedstawicieli tego gatunku pod względem cech morfologicznych i składu pokarmu, oraz zmianami w strukturze filogeograficznej gatunku (Leonard et al. 2007, Pilot et al. 2010, Kobl Müller et al. 2016).

Pod koniec Plejstocenu, gdy wilk doświadczał tych zmian, jedna z jego linii ewolucyjnych rozpoczęła proces adaptacji do nowej niszy ekologicznej – padlinożercy żywiącego się resztkami żywności pozostawionej przez

ludzi, co zapoczątkowało proces ewolucji psa domowego (Freedman i Wayne 2017 - przegląd literatury). Według jednej z wiodących teorii dotyczących udomowienia wilka, proces ten był skutkiem zmian ekologicznych w populacjach tego gatunku zachodzących pod koniec Plejstocenu, a jego początkowy etap niekoniecznie musiał być skutkiem umyślnej działalności człowieka w celu stworzenia udomowionego podgatunku (Frantz i Larson 2018). W przeszłości wiele badań zakładało, że ewolucja psa domowego odbywała się głównie pod wpływem sztucznego doboru; to założenie utrudniało zrozumienie złożonej historii ewolucyjnej tego podgatunku.

Pies był pierwszym udomowionym zwierzęciem i jedynym dużym ssakiem drapieżnym, który został udomowiony. Sukces ewolucyjny udomowionego podgatunku miał istotny wpływ na pozostałe populacje wilka, prowadząc do konkurencji o zasoby pokarmowe, przenoszenia chorób oraz hybrydyzacji (Lescureux i Linnell 2014). Ze względu na unikalną historię ewolucyjną, wilk jest ważnym gatunkiem modelowym w badaniu odpowiedzi ewolucyjnej zwierząt na zmiany ekologiczne i antropogeniczne. Pies jest z kolei ważnym gatunkiem modelowym w dziedzinie genomiki funkcjonalnej i genomiki medycznej (Ostrander et al. 2018). Zapewnia to dostępność licznych zasobów danych genetycznych (np. sekwencja genomu z kompletną anotacją, komercyjnie dostępne mikromacierze do analizy polimorfizmu pojedynczych nukleotydów), które mogą być wykorzystywane w badaniach nad historią ewolucyjną wilka.

Cel pracy

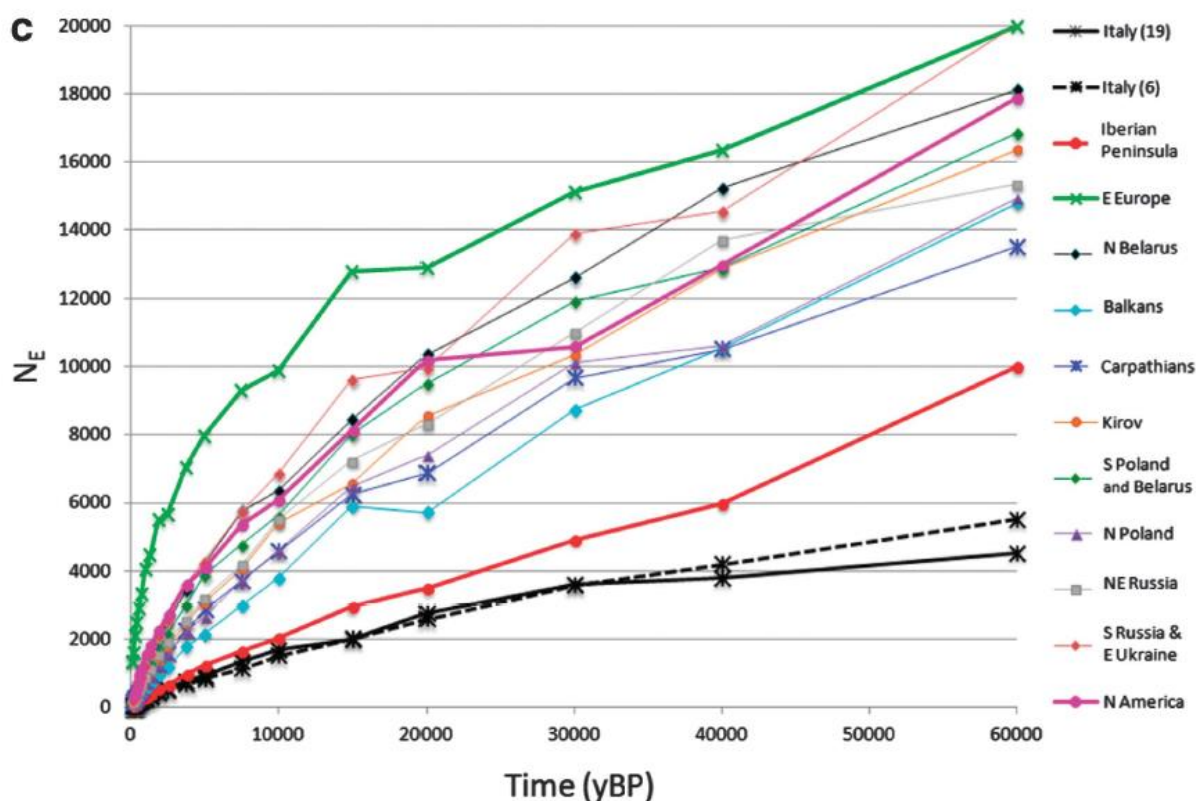
Celem prac wchodzących w skład osiągnięcia było zrozumienie wpływu czynników ekologicznych i antropogenicznych na historię ewolucyjną wilka (*Canis lupus*) i jego udomowionego podgatunku – psa domowego (*Canis lupus familiaris*). Cel ten został osiągnięty w kilku etapach:

- Analiza historii ewolucyjnej dzikich populacji wilków i czynników ją kształtujących (Pilot et al. 2010, 2012, 2014a,b, Moura et al. 2014, Hindrikson et al. 2017)
- Analiza historii ewolucyjnej psów domowych i czynników ją kształtujących (Pilot et al. 2015, 2016)
- Analiza przyczyn i konsekwencji krzyżowania się między wilkami a psami (Moura et al. 2014, Pilot et al. 2018)

Wyniki tych prac poszerzyły wiedzę na temat wpływu czynników ekologicznych oraz działalności człowieka na zmiany ewolucyjne u dzikich i udomowionych ssaków oraz na interakcje między dzikimi a udomowionymi populacjami.

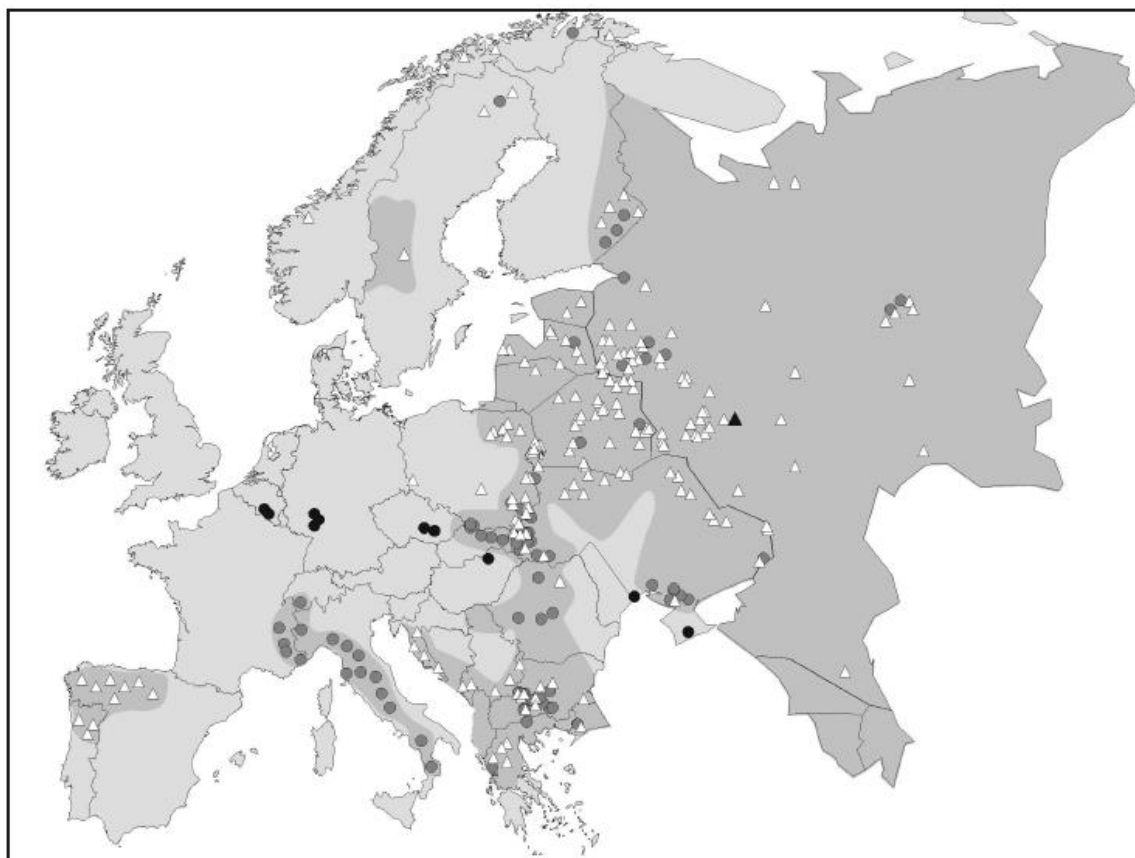
Wyniki

Porównanie zmienności genetycznej w mitochondrialnym DNA między współczesnymi wilkami reprezentującymi wszystkie populacje europejskie a wilkami z Późnego Plejstocenu z obszaru centralnej Europy pokazało, że współcześnie żyjące linie ewolucyjne wilka reprezentują tylko niewielką część różnorodności genetycznej gatunku z czasu Późnego Plejstocenu (Pilot et al. 2010). Wynik ten jest zgodny z wynikami badań innych autorów, które pokazały, że gatunek *Canis lupus* w Późnym Plejstocenie charakteryzował się większą zmiennością morfologiczną i szerszą niszą pokarmową niż obecnie (Leonard et al. 2007, Germonpre et al. 2009). Z kolei prowadzone przeze mnie badania zmienności genetycznej współczesnych wilków europejskich w obrębie całego genomu jądrowego, oparte o analizę zmienności pojedynczych nukleotydów (SNP), pokazały, że liczebność tych populacji systematycznie spadała od Późnego Plejstocenu do czasów współczesnych (Pilot et al. 2014a; Rycina 1). Mimo że wilk – w przeciwieństwie do wielu innych gatunków dużych ssaków – przeżył okres drastycznych zmian klimatycznych i ekologicznych na przełomie Plejstocenu i Holocenu, powyższe wyniki pokazują, że doświadczył on w tym okresie silnego spadku liczebności oraz utraty różnorodności fenotypowej i genetycznej.



Rycina 1. Zmiany efektywnej wielkości populacji (N_E) w europejskich populacjach wilków w porównaniu z wilkami z Ameryki Północnej w okresie od 60 tysięcy lat temu do czasów współczesnych. Jest to panel C Ryciny 5 z pracy Pilot et al. 2014a.

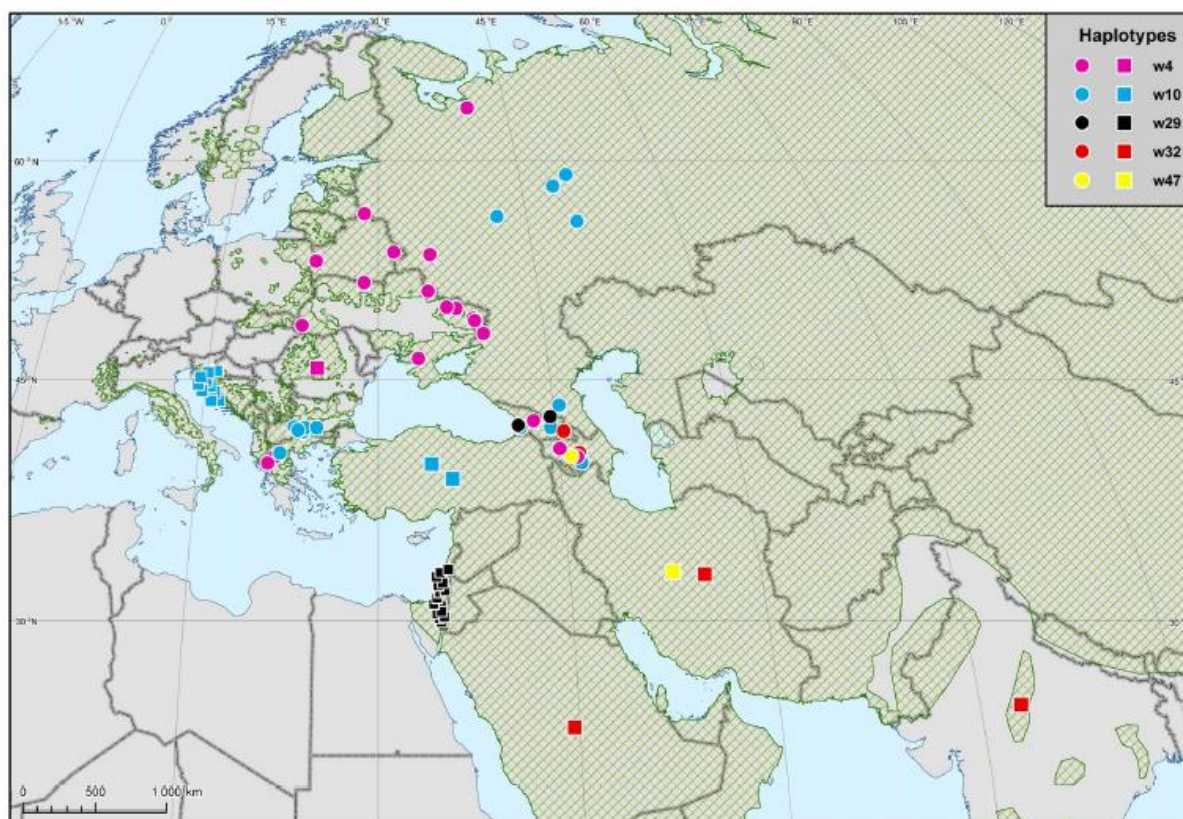
Jedną z moich prac (Pilot et al. 2010) badała wpływ zmian klimatycznych pod koniec Plejstocenu na historię ewolucyjną wilka w Europie. W tej pracy analizowane były haplotypy mitochondrialnego DNA (mtDNA) 947 współczesnych wilków z całej Europy, uzyskane w wyniku połączenia nowo wygenerowanych danych z danymi wcześniej opublikowanymi w innych pracach. Te dane zostały porównane z wcześniej opublikowanymi haplotypami mtDNA 23 wilków z Późnego Plejstocenu i jednego wilka datowanego na 1200 lat temu. Nasze badania pokazały, że haplotypy mtDNA współczesnych wilków należą do dwóch grup filogenetycznych, 1 i 2, których zasięgi geograficzne częściowo się pokrywają, lecz których frekwencje różnią się znacznie między populacjami z południowo-zachodniej a wschodniej Europy. Obie haplogrupy występują również w Azji, podczas gdy współczesne wilki z Ameryki Północnej reprezentują tylko haplogrupę 1. Wszystkie wilki z Późnego Plejstocenu pochodzące z Zachodniej Europy należały do haplogrupy 2, sugerując długotrwałą dominację tej haplogrupy w tym regionie (Pilot et al. 2010; Rycina 2). Porównanie współczesnych i dawnych frekwencji i rozmieszczenia dwóch grup haplotypów w Europie sugeruje, że haplogrupa 1 przewyższyła liczebnie haplogrupę 2 w ciągu ostatnich kilku tysięcy lat. Podobna, lecz kompletna wymiana grup haplotypów miała miejsce w Ameryce Północnej, gdzie haplogrupa 2 została zupełnie zastąpiona przez haplogrupę 1 (Leonard et al. 2007). Podobieństwo diety wilków europejskich i północno-amerykańskich z Późnego Plejstocenu sugeruje, że zmiany w strukturze genetycznej na obu kontynentach były związane ze zmianami ekologicznymi mającymi miejsce po zakończeniu ostatniego pleniglacjału (Pilot et al. 2010).



Haplotypes from haplogroup 1: △ Extant ▲ Ancient
Haplotypes from haplogroup 2: ● Extant ● Ancient

Rycina 2. Rozmieszczenie dwóch grup haplotypów mitochondrialnego DNA we współczesnych populacjach Europejskich wilków oraz u wilków zamieszkujących Europę 44000-1200 lat temu. Historyczny wilk noszący haplotyp z haplogrupy 1 (oznaczony jako czarny trójkąt) był datowany na 1200 lat temu. Jest to Rycina 3 z pracy Pilot et al. 2010.

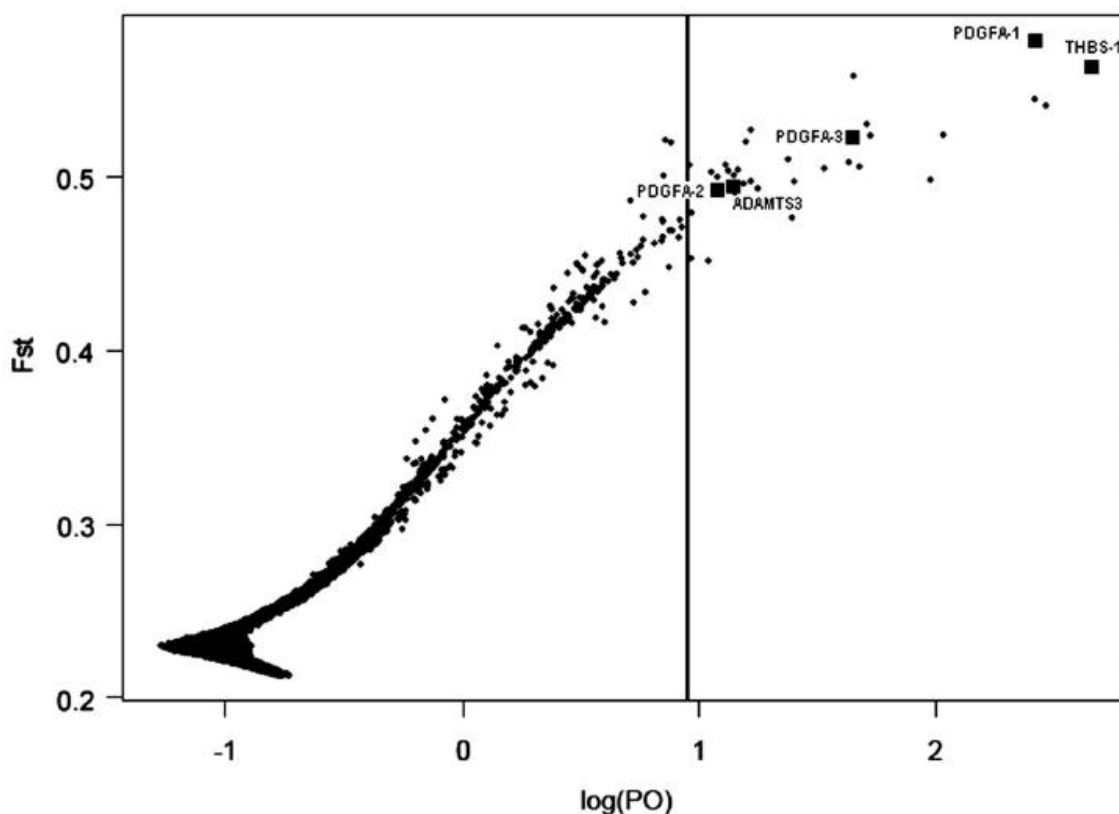
Pomimo utraty różnorodności genetycznej i fenotypowej od czasów Późnego Plejstocenu, współczesne wilki nie są jednolite fenotypowo, lecz wykazują znaczne zróżnicowanie morfologiczne między populacjami z różnych regionów geograficznych. W oparciu o te różnice morfologiczne wyróżnione zostały podgatunki wilka (Nowak 2003). Prowadzi to do pytania, czy podział na podgatunki jest zgodny z genetyczną strukturą populacji wilka. Jedną z moich prac (**Pilot et al. 2014a**) szukała odpowiedzi na to pytanie na przykładzie wilków z Kaukazu, zaklasyfikowanych jako podgatunek *Canis lupus cubanensis*. W pracy tej analizowana była zmienność genetyczna wilków z Kaukazu w porównaniu z populacjami z Europy i Bliskiego Wschodu w oparciu o analizy mitochondrialnego DNA, loci mikrosatelitarnych oraz polimorfizmu pojedynczych nukleotydów w genomie jądrowym. Wyniki tej pracy pokazały, że populacja wilków z Kaukazu ma wspólne haplotypy mitochondrialnego DNA zarówno z populacjami z Europy Wschodniej jak i tymi z Bliskiego Wschodu, sugerując przepływ genów między tymi populacjami współcześnie lub w przeszłości (**Pilot et al. 2014a**; Rycina 3). Analiza mikrosatelitów również wskazała na przepływ genów między wilkami z Kaukazu i z Europy Wschodniej. Rekonstrukcja zmian demograficznych w oparciu o analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów pokazała, że podobnie jak populacje europejskie, populacja z Kaukazu doświadczyła długotrwałego spadku liczebności. Wyniki te pokazały, że populacja wilków z Kaukazu nie jest genetycznie izolowana od innych euroazjatyckich populacji i że doświadcza ona podobnych trendów demograficznych. Zatem w przypadku tej populacji odrębność morfologiczna nie jest związana z izolacją genetyczną ani ekologiczną (**Pilot et al. 2014a**).



Rycina 3. Rozmieszczenie geograficzne haplotypów mitochondrialnego DNA występujących zarówno w populacjach wilków z Kaukazu jak i w innych regionach Eurazji, na tle zasięgu geograficznego wilka (zacięniowanego zieloną kratką). Próbkę, których lokalizacja geograficzna jest precyzyjna, są oznaczone symbolem koła, zaś próbki, dla których znany jest tylko kraj pochodzenia, są oznaczone symbolem kwadratu. Jest to Rycina 2 z pracy Pilot et al. 2014a.

Populacja z Kaukazu znajduje się w obrębie ciągłego zasięgu wilka obejmującego wschodnią Europę oraz północną i zachodnią Azję, co umożliwia przepływ genów między populacjami z tych regionów. W przypadku populacji znajdujących się w długotrwałej izolacji geograficznej, odrębność genetyczna i fenotypowa może być skutkiem dryfu genetycznego. W Europie długotrwały trend spadku liczebności populacji wilka w połączeniu z tępieniem tego gatunku przez człowieka doprowadził do jego wygnięcia z północno-zachodniej części kontynentu i izolacji geograficznej populacji z Półwyspu Iberyjskiego i Półwyspu Apenińskiego. Populacje te różnią się morfologicznie od populacji z Europy Wschodniej i są klasyfikowane jako odrębne podgatunki *Canis lupus signatus* i *Canis lupus italicus* (Nowak 2003). Wskutek długotrwałej izolacji obie populacje charakteryzują się niską zmiennością genetyczną i silną nierównowagą sprzężenia (linkage disequilibrium). Mają one jednak stosunkowo niewiele segmentów autozygotycznych w genomie, co wyraźnie odróżnia je od populacji, które doświadczyły drastycznych spadków liczebności w ciągu ostatnich pokoleń (Pilot et al. 2014b). Charakterystyka genetyczna wilków iberyjskich i apenińskich wskazuje, że obie te populacje doświadczyły długich okresów niskiej liczebności, które spowodowały silny efekt szyjki od butelki (bottleneck).

Mimo że długotrwały dryf genetyczny w wyniku izolacji geograficznej i niskiej liczebności był głównym czynnikiem ewolucyjnym różnicującym europejskie populacje wilków, zmienność genetyczna w 35 loci odbiegała w sposób istotny statystycznie od zmienności w pozostałych fragmentach genomu, sugerując wpływ doboru naturalnego na zróżnicowanie między populacjami. Dwa spośród tych 35 loci znajdują się w pobliżu genu *PDGFA* kodującego czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego, który bierze udział w regulacji rozwoju kości i może mieć wpływ na różnice w wielkości ciała między wilkami iberyjskimi i apenińskimi a wilkami z Europy Wschodniej (Pilot et al. 2014b; Rycina 4).

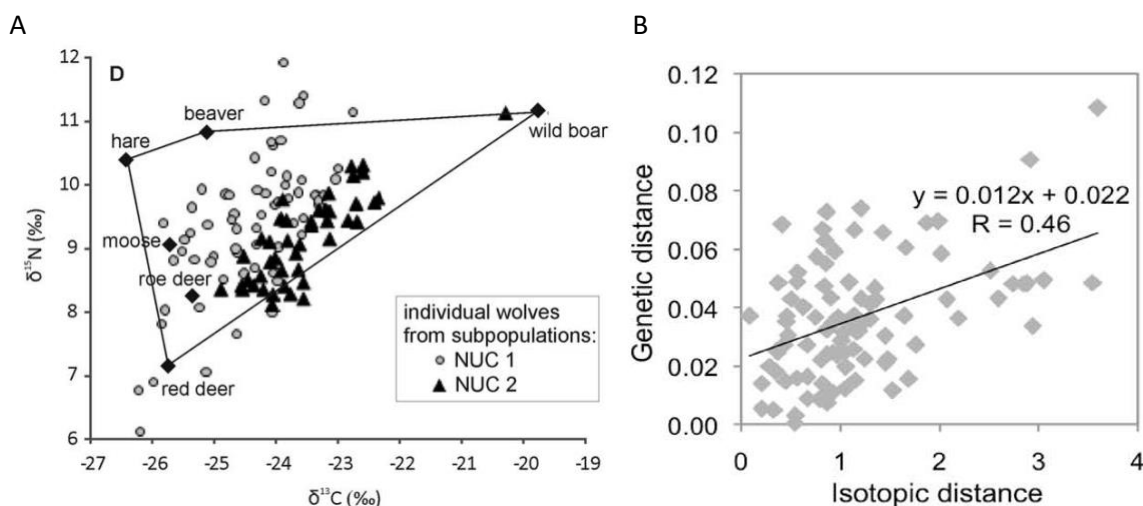


Rycina 4. Detekcja loci znajdujących się pod wpływem doboru różnicującego w populacjach wilków z Półwyspu Iberyjskiego i Apenińskiego oraz Europy Wschodniej, przy użyciu programu BAYESCAN. Oś pionowa reprezentuje średnie wartości współczynnika F_{ST} między tymi populacjami, a oś pozioma - logarytm dziesiętny różnic *a posteriori* ($\log(PO)$). Gruba linia pionowa wskazuje wartość $\log(PO)$, dla której częstość nieprawidłowej identyfikacji loci pod wpływem doboru wynosi 0.05. Loci po prawej stronie tej linii są prawdopodobnie pod wpływem doboru. Znajdują się wśród nich trzy loci położone w pobliżu genu *PDGFA* (kodującego podjednostkę A czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego) i jeden locus położony w pobliżu genu *THBS1* (kodującego trombospondynę-1). Jest to Rycina 6 z pracy Pilot et al. 2014b.

W ciągu ostatnich 20 lat powstały liczne prace dotyczące zmienności genetycznej wilka w różnych krajach Europy lub w skali geograficznej całego kontynentu. Pojawiła się zatem potrzeba systematycznego przeglądu tych prac w celu zidentyfikowania najważniejszych trendów występujących w europejskich populacjach wilka. Uczestniczyłam w pracach nad takim przeglądem literatury, który powstał w wyniku współpracy 22 naukowców z 14 krajów Europy zajmujących się genetyką populacji wilka (**Hindrikson et al. 2017**). Praca ta została opublikowana w czasopiśmie *Biological Reviews* – jednym z najważniejszych czasopism publikujących prace przeglądowe dotyczące aktualnych tematów we wszystkich dyscyplinach biologii. Artykuł ten podsumowuje i dyskutuje wyniki badań genetycznych nad wilkami oparte o analizy mitochondrialnego DNA, chromosomu Y oraz autosomalnych loci mikrosatelitarnych i polimorfizmu pojedynczych nukleotydów. W celu zbadania wielkoskalowych trendów w zmienności genetycznej europejskich populacji wilków przeprowadzona została metaanaliza w oparciu o wcześniejsze dane o zmienności loci mikrosatelitarnych w połączeniu z nowymi danymi, łącznie zawierającymi dane z 19 krajów Europy. Wyniki tej analizy wskazały na trend wzrostu zmienności genetycznej populacji w kierunku z południowego zachodu (niska heterozygotyczność) na północny wschód (wysoka heterozygotyczność). Zasięg przestrzennej autokorelacji zmienności genetycznej wynosił 650-850 km, sugerując, że zmienność genetyczna lokalnej populacji wilków jest zależna od innych populacji w promieniu do 850 km, wskutek przepływu genów. Wynika z tego, że zarówno odstrzał wilków jak i działania w kierunku ochrony tego gatunku w poszczególnych krajach europejskich mają znaczny wpływ na populacje wilków z sąsiednich krajów (**Hindrikson et al. 2017**).

Zasięg geograficzny wilka obejmuje różne strefy klimatyczne i różnorodne ekosystemy, a zatem gatunek ten nie powinien być wrażliwy na zmiany klimatu. Badania wykonane w ramach mojej pracy doktorskiej pokazały jednak, że genetyczna struktura populacji wilków jest kształtowana przez czynniki ekologiczne takie jak rozmieszczenie biomów i skład pokarmu wilka (Pilot et al. 2006). W mojej późniejszej pracy związek różnic w składzie pokarmu ze zróżnicowaniem genetycznym między populacjami wilka był badany za pomocą analizy stabilnych izotopów. Profile izotopów $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ posłużyły do odtworzenia proporcji różnych gatunków ofiar w diecie tych samych osobników, dla których wykonane zostały analizy genetyczne. Umożliwiło to ilościową ocenę relacji między indywidualną dietą a genotypem, która wykazała istotną korelację między dystansami genetycznymi a zróżnicowaniem pokarmu (Pilot et al. 2012; Rycina 5). Wyniki te pokazują, że wybór gatunków ofiar i związany z tym wybór ekosystemów, z którymi te gatunki są związane, ma silny wpływ na genetyczną strukturę populacji dużych ssaków drapieżnych, mimo ich dużej mobilności umożliwiającej dyspersję między różnymi typami środowisk. Tłumaczy to, dlaczego poszczególne populacje wilków mogą być wrażliwe na zmiany ekologiczne mimo szerokiego rozmieszczenia geograficznego tego gatunku.

Wynik ten pozwolił na wyjaśnienie przyczyn opisanej wcześniej utraty różnorodności fenotypowej i genetycznej wilka na przełomie Plejstocenu i Holocenu. Prace innych autorów pokazały, że w diecie wilków zamieszkujących północną Europę oraz północną część Ameryki Północnej w Późnym Plejstocenie przeważały duże ssaki kopytne takie jak żubr, bizon i koń, które doświadczyły drastycznych spadków liczebności pod koniec Plejstocenu (Leonard et al. 2007, Germonpre et al. 2009). Spadek liczebności tych gatunków był prawdopodobną przyczyną wyginięcia ekotypów wilka, które żywiły się tymi dużymi ssakami kopytnymi. Zostały one zastąpione współczesnymi ekotypami, które żywią się głównie mniejszymi gatunkami kopytnych, takimi jak przedstawiciele rodzin Cervidae i Suidae oraz mniejsze gatunki z rodziny Bovidae (Newsome et al. 2016). Specjalizacja pokarmowa poszczególnych linii ewolucyjnych wilka doprowadziła do wyginięcia niektórych z nich w odpowiedzi na spadek liczebności ofiar, pomimo szerokiej niszy pokarmowej wilka jako gatunku.

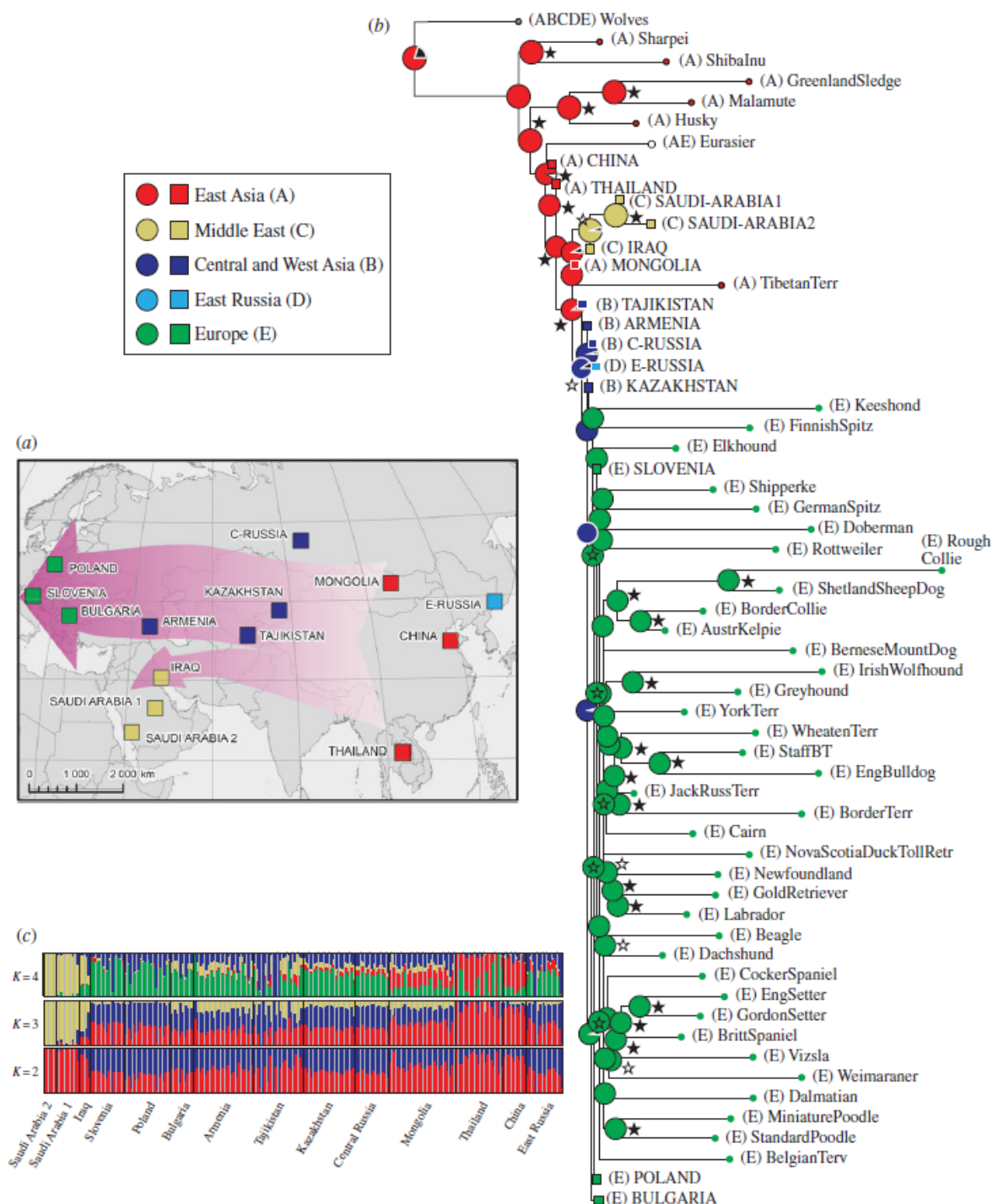


Rycina 5. Związek między dietą a zróżnicowaniem genetycznym wilków w Europie Wschodniej. (A) Graf przedstawiający proporcje gatunków ofiar w diecie wilków oszacowanych o oparciu o analizę stabilnych izotopów przy użyciu programu IsoSource. Graf przedstawia wartości $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ dla indywidualnych wilków oraz średnie wartości dla poszczególnych gatunków ich ofiar. Wartości wzbogacenia troficznego 1.3‰ dla $\delta^{13}\text{C}$ i 4.6‰ dla $\delta^{15}\text{N}$ zostały dodane do średnich wartości $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ dla ofiar. Przynależność wilków do dwóch genetycznych subpopulacji wilka obecnych w badanym regionie została oznaczona za pomocą odrębnych symboli. (B) Związek między zróżnicowaniem diety a dystansami genetycznymi między lokalnymi populacjami wilka. Różnice diety między populacjami zostały oszacowane jako odległość między średnimi wartościami $\delta^{13}\text{C}$ i $\delta^{15}\text{N}$ traktowanymi jako dwuwymiarowe współrzędne kartezjańskie. Korelacja przedstawiona na rycinie jest statystycznie istotna ($p = 0.005$). Prezentowane ryciny to Rycina 2D i Rycina 3A z pracy Pilot et al. 2012.

Zróżnicowanie genetyczne między populacjami różniącymi się składem pokarmu prawdopodobnie odgrywało też ważną rolę w procesie udomowienia wilka. Proces, który doprowadził do powstania psa domowego, rozpoczął się w Późnym Plejstocenie, gdy populacje wilka doświadczały drastycznych spadków liczebności i lokalnego wymierania, których przyczyną – jak wspomniano powyżej – był prawdopodobnie spadek liczebności ich ofiar (**Pilot et al. 2010**). Zmiana niszy pokarmowej ze szczytowego drapieżnika na padlinożercę żywiącego się resztkami żywności pozostawionej przez ludzi mogła doprowadzić do izolacji genetycznej tej populacji wilka, zapoczątkowując odrębną linię ewolucyjną. Wiedza o mechanizmach różnicowania genetycznego populacji wilków pozwala zatem na lepsze zrozumienie procesu udomowienia tego gatunku.

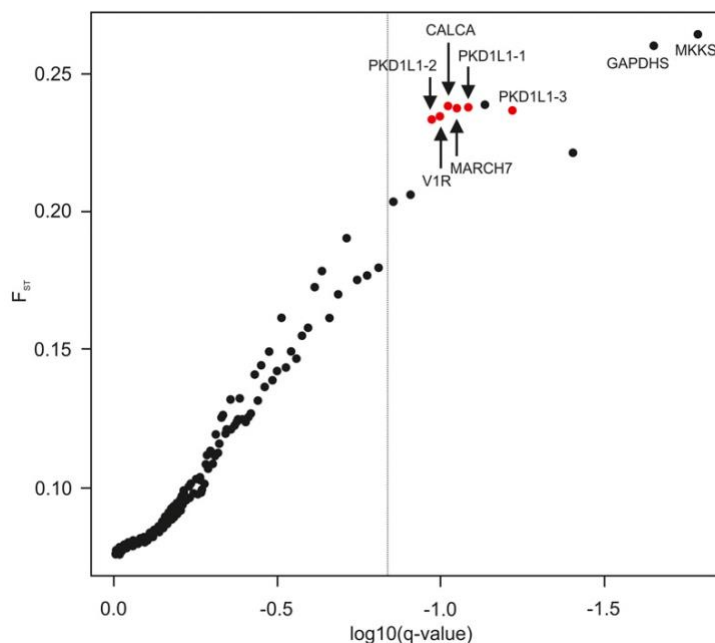
Historia udomowienia wilka była przedmiotem licznych badań (których przegląd można znaleźć np. w pracy Freedman i Wayne 2017), lecz stosunkowo niewiele uwagi poświęcono historii ewolucyjnej psa domowego po jego udomowieniu. Prace poświęcone temu tematowi skupiały się głównie na psach rasowych (np. Parker et al. 2017). Jednakże duża część globalnej populacji psów to psy wolno żyjące, których rozród nie jest regulowany przez człowieka. Badania wolno-żyjących psów (kundli) prowadzone w ramach projektu kierowanego przez Prof. Wiesława Bogdanowicza, którego byłam głównym wykonawcą, pozwoliły na poszerzenie wiedzy o ich zmienności genetycznej w skali całej Eurazji oraz o różnicach genetycznych między nimi a psami rasowymi.

Badania te były oparte o analizę polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) reprezentujących cały genom jądrowy psa. Analiza genomów kundli pochodzących z 14 regionów geograficznych Eurazji wykazała stosunkowo niewielkie różnice genetyczne między tymi regionami. Nasze badania pokazały też, że populacje kundli są odrębne genetycznie od psów rasowych i nie powstały w wyniku procesu mieszania się psów różnych ras. Przeciwnie, rasy psów powstały w oparciu o lokalne populacje kundli i większość ras europejskich pochodzi od kundli z Europy. Rasy psów pochodzące ze Azji Wschodniej i z Arktyki są najbliższe genetycznie kundlom z Azji Wschodniej; obie te grupy psów reprezentują linie ewolucyjne, które oddzieliły się najwcześniej od psów z pozostałych części Eurazji. Rekonstrukcja biogeograficzna miejsca pochodzenia ostatnich wspólnych przodków w gałęziach drzewa filogenetycznego psów pokazała, że wszystkie współczesne kundle z Eurazji pochodzą z migracji psów ze wschodniej Azji na zachód, przez środkową i zachodnią Azję na Bliski Wschód i do Europy (**Pilot et al. 2015**; Rycina 6). Wynik ten pokazuje, że współczesna struktura genetyczna populacji wolno-żyjących psów w Eurazji została ukształtowana przez wielkoskalową ekspansję geograficzną. Nasze wyniki wskazywały, że ta ekspansja nie reprezentowała oryginalnej ekspansji psa z miejsca jego udomowienia, lecz miała charakter wtórny i mogła doprowadzić do stopniowego wyginięcia prymitywnej populacji psów uprzednio zamieszkujących zachodnią Eurazję. Taki scenariusz pozwala na wyjaśnienie, dlaczego wcześniejsze badania oparte o analizy genetyczne współczesnych psów wskazują Azję Wschodnią jako region pochodzenia psa, podczas gdy analizy antycznego DNA i badania archeologiczne wskazują na zachodnią Eurazję (**Pilot et al. 2015**). Wyniki późniejszych badań innych autorów oparte o analizy antycznego DNA były zgodne z naszą hipotezą, że prymitywne psy zamieszkujące Europę w Późnym Plejstocenie zostały zastąpione przez genetycznie odrębną populację psów pochodzącą ze Wschodniej Azji (Frantz et al. 2016).



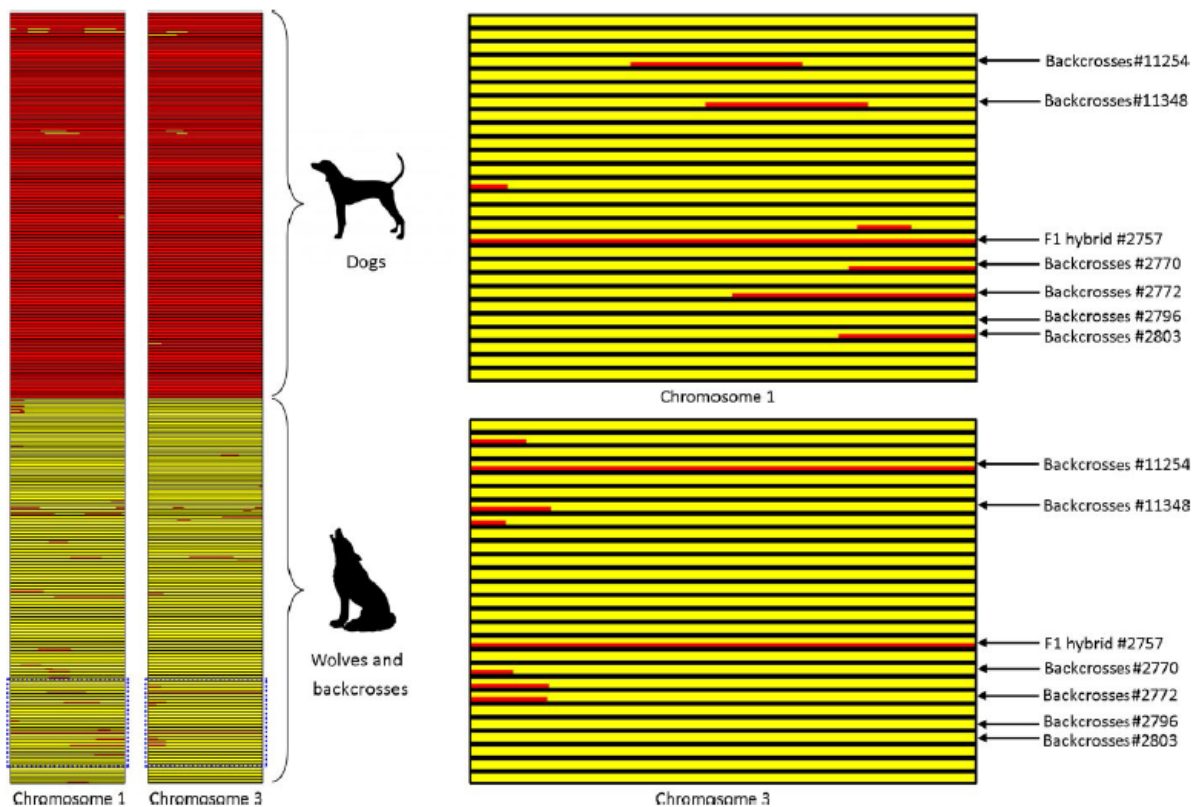
Rycina 6. Zróżnicowanie genetyczne współczesnych wolno-żyjących psów oraz drogi ekspansji psa w Eurazji. (a) Rozmieszczenie badanych populacji oraz drogi ekspansji psa odtworzone za pomocą programu RASP. (b) Drzewo przedstawiające relacje filogenetyczne między wolno-żyjącymi psami a psami rasowymi, skonstruowane metodą Maximum Likelihood za pomocą programu TREEMIX. Rozmieszczenie ancestralnych populacji zostało zrekonstruowane za pomocą programu RASP i jest przedstawione na węzłach drzewa za pomocą kolorów. Czarny kolor oznacza lokalizację geograficzną, która nie mogła zostać określona. Arktyczne rasy psów zostały przypisane dla celów tej analizy do Azji Wschodniej, będącej miejscem ich pochodzenia. Wiarygodność węzłów, oszacowana metodą bootstrap w oparciu o 1000 powtórzeń jest oznaczona symbolem czarnej gwiazdy, jeśli jest większa niż 90% i białej gwiazdy, jeśli znajduje się w przedziale 65-90%. (c) Struktura genetyczna populacji wolno-żyjących psów w Eurazji, odtworzona za pomocą programu ADMIXTURE przy założeniu od dwóch do czterech klastrow genetycznych. Jest to Rycina 1 z pracy Pilot et al. 2015.

Kundle różnią się pod wieloma względami od psów rasowych i dlatego w kolejnej pracy (Pilot et al. 2016) badaliśmy genetyczne podstawy tych różnic. W przeciwieństwie do psów rasowych, stanowiących sztucznie utrzymywane linie wsobne, kundle zazwyczaj mogą krzyżować się swobodnie, bez ograniczeń wprowadzonych przez człowieka. Dlatego wiele cech fenotypowych kundli jest pod wpływem doboru naturalnego i płciowego, podczas gdy u psów rasowych dobór naturalny i płciowy jest osłabiony. W oparciu o analizę 168 tysięcy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) badaliśmy zróżnicowanie genetyczne między kundlami a psami rasowymi w celu identyfikacji genów będących pod wpływem doboru różnicującego między tymi grupami. Geny te zostały znalezione przez identyfikację loci położonych w obrębie kodujących genów i wykazujących zróżnicowanie genetyczne między kundlami a psami rasowymi, które było istotnie większe niż w reszcie badanych loci (Pilot et al. 2016; Rycina 7). Trzy spośród tych genów były związane ze szlakiem sygnałowym Hedgehog regulującym morfogenezę kręgowców. Porównanie między kundlami a rasami pochodzącymi ze Wschodniej Azji wykazało również działanie doboru różnicującego na gen *MKKS* (McKusick-Kaufman Syndrome), znany również jako *BBS6*, którego mutacje powodują skrócenie pyska i stłoczenie zębów wskutek zaburzenia szlaku sygnałowego Hedgehog. Skrócenie pyska i stłoczenie zębów to cechy, które odróżniają prymitywne psy od wilków; współcześnie cechy te są wyraźniej widoczne u psów rasowych niż u kundli. Nasze wyniki sugerują, że osłabienie doboru naturalnego i płciowego u psów rasowych w porównaniu z kundlami mogło doprowadzić do różnic w regulacji szlaku sygnałowego Hedgehog o niewielkim, lecz wykrywalnym efekcie. Ten szlak sygnałowy hamuje migracje komórek grzebienia nerwowego z cewy nerowej, zaś niewielki deficyt tych komórek podczas rozwoju embrionalnego jest prawdopodobną przyczyną „syndromu udomowienia”, czyli zespołu cech morfologicznych i fizjologicznych odróżniających udomowione ssaki od ich dzikich przodków (Wilkins et al. 2014). Sugeruje to, że proces formowania się ras psów był związany z modyfikacją tych samych szlaków sygnałowych, które zostały zmodyfikowane w procesie udomowienia wilka (Pilot et al. 2016).



Rycina 7. Detekcja loci pod wpływem doboru różnicującego między wolno-żyjącymi psami a rasami psów pochodzącymi ze Wschodniej Azji, przy użyciu programu BAYESCAN. Oś pionowa przedstawia wartości współczynnika F_{st} opisującego zróżnicowanie między porównywanymi populacjami dla każdego locus. Oś pozioma przedstawia logarytm współczynnika q , który reprezentuje minimalne oszacowanie proporcji błędnie zidentyfikowanych loci, przy której odchylenie danego locus od modelu neutralnego staje się statystycznie istotne. Pionowa linia odpowiada wartości progowej współczynnika q przyjętej w analizie BAYESCAN. Kropki reprezentują poszczególne loci, a kropki o czerwonym kolorze reprezentują loci, które zostały zidentyfikowane jako będące pod wpływem doboru w dwóch analizach i które są położone w obrębie lub w bliskim sąsiedztwie kodujących genów, których nazwy zostały podane obok odpowiednich kropek. Jest to Rycina 1 z pracy Pilot et al. 2016.

Stopniowo pogłębiające się różnice ekologiczne i morfologiczne między psami domowymi a wilkami nie zapobiegły interakcjom między nimi. W przeciwieństwie do dzikich populacji wilków, których liczebność spadała systematycznie od końca Plejstocenu, liczebność psa domowego rosła wraz ze wzrostem liczebności populacji ludzkiej (Pilot et al. 2014a), czemu towarzyszyła również ekspansja geograficzna (Pilot et al. 2015). W wyniku tego procesu rosnąca liczba populacji wilka występowała sympatrycznie z populacjami psa domowego. Ze względu na brak barier reprodukcyjnych, wilki i psy mogą się krzyżować i produkować płodne potomstwo. Nasze badania pokazały, że do krzyżowania wilków i psów dochodziło zarówno w ciągu ostatnich pokoleń jak też w bardziej odległej historii obu podgatunków (Pilot et al. 2018). Praca ta oparta była o analizę 61 tysięcy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, reprezentujących cały genom jądrowy, u wilków z Eurazji i Ameryki Północnej w porównaniu z psami domowymi. W celu identyfikacji osobników, które w przeszłości genealogicznej miały epizody hybrydyzacji, wykonano analizę pochodzenia fragmentów chromosomów dla 38 autosomów i chromosomu X. Analiza ta wskazała na obecność osobników posiadających allele pochodzące od psów w większości populacji w Eurazji, lecz brak takich osobników w większości populacji z Ameryki Północnej. Nasze wyniki wskazywały, że introgresja alleli pochodzących od samców psów do populacji wilków jest częstsza niż introgresja alleli pochodzących od samic psów. Jednak zidentyfikowaliśmy również mieszańca w pierwszym pokoleniu pochodzącego od samicy psa i samca wilka. 62% wilków z Eurazji posiadało niewielkie fragmenty chromosomów pochodzące od psów (Pilot et al. 2018; Rycina 8).



Rycina 8. Przykładowe wyniki analizy pochodzenia fragmentów chromosomów u psów, wilków i osobników zidentyfikowanych w oparciu o fenotyp jako mieszańce, wykonanej za pomocą programu LAMP dla dwóch chromosomów. Fragmenty chromosomów pochodzące od wilków są oznaczone kolorem żółtym, zaś te pochodzące od psów - kolorem czerwonym. Każda linia reprezentuje jednego osobnika. Część ryciny przedstawiająca wyniki dla osobników zidentyfikowanych jako hybrydy w pierwszym pokoleniu lub ich potomstwo z krzyżowania się z wilkami (ang. backcrosses) jest przedstawiona w powiększeniu na prawym panelu. Jest to Rycina 5 z pracy Pilot et al. 2018.

Zidentyfikowaliśmy również osobniki o melanistycznym kolorze sierści, które nie posiadały żadnych alleli pochodzących od psów z wyjątkiem pochodzącego od psa wariantu genu kodującego beta-defensynę 1, odpowiedzialną za czarny kolor sierści. Wyniki te pokazują, że hybrydyzacja między wilkami a psami miała miejsce w różnych częściach Eurazji oraz w różnych okresach czasu, nie jest więc nowym zjawiskiem spowodowanym przez silne antropogeniczne zmiany środowiskowe. Mimo szerokiej skali geograficznej i czasowej tego zjawiska, populacje wilków pozostały genetycznie odrębne od psów, co sugeruje, że hybrydyzacja o niskiej frekwencji nie powoduje utraty odrębności puli genowej wilków. Zwiększenie częstości procesu hybrydyzacji może mieć jednak negatywny wpływ na populacje wilków, co wskazuje na konieczność monitoringu genetycznego w celu oszacowania frekwencji i rozmieszczenia hybryd pierwszego pokolenia i ich potomstwa (Pilot et al. 2018).

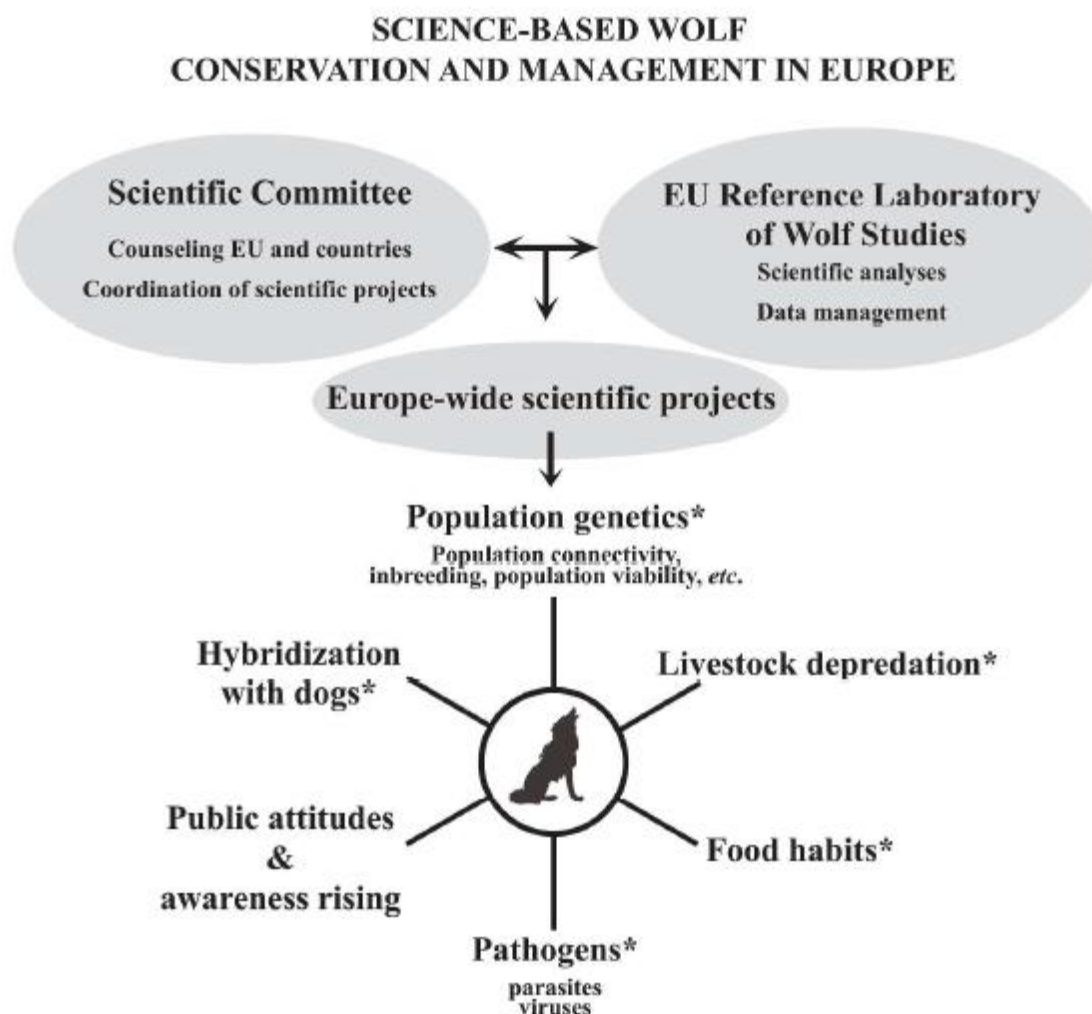
Inna praca, poświęcona analizie zmienności genetycznej wilka w Bułgarii, pozwoliła na zrozumienie jednego z mechanizmów prowadzących do krzyżowania się między psami a wilkami (Moura et al. 2014). Podobnie jak inne populacje wilka w Europie, bułgarskie wilki doświadczyły drastycznego spadku liczebności i skurczenia się zasięgu geograficznego w wyniku tępienia przez ludzi. Współcześnie bułgarska populacja wilków odbudowuje swoją liczebność po silnym niżu demograficznym, który miał miejsce w latach 70-tych 20 wieku, mimo że wciąż jest ona przedmiotem intensywnych polowań, które są w bardzo niewielkim stopniu ograniczone prawnie. Presja łowiecka nasiliła się wraz ze wzrostem liczebności populacji, co rodzi obawy o długoterminową żywotność tej populacji. Celem naszej pracy była ocena potencjału ewolucyjnego tej populacji przez analizę jej zmienności genetycznej w mitochondrialnym DNA i nuklearnym loci mikrosatelitarnych. Nasze wyniki wskazały na stosunkowo wysoką heterozygotyczność (0.654, SE 0.031) i tylko niewielki wpływ genetycznego efektu szyjki od butelki (bottleneck), sugerując, że populacja odbudowała się po silnej redukcji liczebności w latach 70-tych. Mimo wzrostowego trendu demograficznego i korzystnych wskaźników zmienności genetycznej, prawie 10% (9.8%) badanych osobników posiadało allele pochodzące od psów, co sugeruje, że ta populacja doświadcza bardziej intensywnej hybrydyzacji niż inne europejskie populacje wilków. Wyniki tej pracy pokazały również, że w Bułgarii może dochodzić do hybrydyzacji między wilkami a szakalami złocistymi (*Canis aureus*), jednak z mniejszą intensywnością niż w przypadku hybrydyzacji z psami (Moura et al. 2014). Hybrydyzacja między wilkami a szakalami złocistymi, opisana po raz pierwszy w naszej pracy, została później potwierdzona w oparciu o badania sekwencji kompletnych genomów (Freedman et al. 2014).

Mimo stosunkowo wysokiej zmienności genetycznej, populacja bułgarskich wilków miała wysoki wskaźnik inbredu ($F_{IS} = 0.113$, SE 0.019) oraz niską proporcję N_e/N (0.11; 95 % CI 0.08–0.29), co sugeruje, że często dochodzi w niej do krzyżowania się między spokrewnionymi osobnikami. Nasze wyniki sugerują, że nieuregulowane prawnie polowania na wilki prowadzą zarówno do inbredu jak też hybrydyzacji. Śmierć członków watahy, a szczególnie jednego z osobników biorących udział w rozrodzie ("pary alfa"), prowadzi do zaburzenia struktury społecznej, a gdy ma to miejsce w trakcie sezonu rozrodczego, może dochodzić do krzyżowania się między pozostałym osobnikiem z pary alfa a innym, zazwyczaj blisko spokrewnionym, członkiem watahy, co prowadzi do inbredu. Alternatywnie, osobnik z pary alfa może szukać nowego partnera do rozrodu poza własną watahą, co przy niskim zagęszczeniu wilków może doprowadzić do krzyżowania z psami. Zatem silna presja łowiecka jest prawdopodobnie jednym z czynników prowadzących do zwiększenia częstości hybrydyzacji. Intensywny odłów w okresie wielu pokoleń może mieć negatywny wpływ na długotrwałą żywotność bułgarskiej populacji wilków, mimo obecnej wysokiej zmienności genetycznej. Wskazuje to na zagrożenia dla populacji o rosnącej liczebności, lecz będących przedmiotem intensywnych polowań (Moura et al. 2014).

Zastosowania wyników badań w praktyce ochrony przyrody

Wyniki opisanych powyżej prac mają ważne implikacje dla praktyki ochrony przyrody. Praca przeglądowa podsumowująca badania nad europejskimi populacjami wilków zawiera dyskusję dotyczącą najważniejszych problemów ochrony tych populacji (Hindrikson et al. 2017). Praca ta identyfikuje ważne luki we współczesnym stanie wiedzy i sugeruje rozwiązania w celu ich uzupełnienia oraz przedstawia rekomendacje dotyczące ochrony i gospodarowania populacjami wilka w skali regionalnej i w skali całej Europy

(Hindrikson et al. 2017; Rycina 9). Praca ta podsumowuje również problemy poszczególnych europejskich populacji, w tym problemy opisywane w moich wcześniejszych publikacjach (Moura et al. 2014, Pilot et al. 2014a).



Rycina 9. Plan koordynacji badań naukowych dotyczących sześciu obszarów wiedzy istotnych dla ochrony i gospodarowania populacjami wilków. Pięć spośród nich, zaznaczonych gwiazdką, opiera się częściowo lub w całości o analizy genetyczne. Rycina 8 z pracy Hindrikson et al. 2017.

Praca dotycząca hybrydyzacji między wilkami a psami w Eurazji opisuje implikacje tego procesu w praktyce ochrony przyrody (Pilot et al. 2018). Ze względu na jej aplikacyjny charakter, praca ta została opublikowana w czasopiśmie *Evolutionary Applications*, które promuje praktyczne zastosowania wyników badań z dziedziny biologii ewolucyjnej. Hybrydyzacja między zwierzętami domowymi a ich dzikimi krewnymi stanowi ważny problem w ochronie przyrody, szczególnie jeśli ten proces skutkuje introgresją wariantów genetycznych charakterystycznych dla zwierząt domowych do populacji dzikich zwierząt. Mimo to, status prawny hybryd pozostaje nieuregulowany zarówno przez prawo międzynarodowe, jak też regulacje prawne Unii Europejskiej i poszczególnych krajów europejskich. Wynika to przynajmniej częściowo z ograniczonego zrozumienia procesu hybrydyzacji oraz jego konsekwencji, co podkreśla znaczenie aplikacyjne badań naukowych skupionych na tym temacie.

Podsumowanie

Moja praca przyczyniła się do poszerzenia wiedzy o czynnikach kształtujących historię ewolucyjną wilka i psa przez dokonanie następujących odkryć:

- Współczesne linie ewolucyjne wilka w Europie reprezentują tylko niewielką część różnorodności genetycznej gatunku z czasu Późnego Plejstocenu (**Pilot et al. 2010**).
- Prawdopodobną przyczyną utraty różnorodności genetycznej był systematyczny spadek liczebności populacji wilka od czasu ostatniego pleniglacjału wynikający ze zmian klimatu (**Pilot et al. 2014a, b**).
- Zróżnicowanie genetyczne między populacjami wilka jest silnie skorelowane z różnicami w składzie ich pokarmu, wskazując na ograniczony przepływ genów między populacjami zamieszkującymi środowiska różniące się składem gatunkowym kopytnych – głównych ofiar wilka (**Pilot et al. 2012**).
- Współczesna struktura filogeograficzna wilka znacząco się różni od struktury filogeograficznej tego gatunku w Późnym Plejstocenie; zmiana tej struktury jest prawdopodobnie wynikiem wyginięcia linii ewolucyjnych wilka specjalizujących się w polowaniach na duże ssaki kopytne związane z ekosystemem stepów Późnego Plejstocenu (**Pilot et al. 2010**).
- Zasięg przestrzennej autokorelacji zmienności genetycznej wilka wynosi 650-850 km, a zatem zmienność genetyczna lokalnej populacji wilków jest zależna od innych populacji w promieniu do 850 km, wskutek długodystansowych migracji i przepływu genów (**Hindrikson et al. 2017**).
- Zmienność genetyczna wilków iberyjskich i apenińskich pokazuje, że doświadczyły one długotrwałego efektu szyjki od butelki (bottleneck) w wyniku izolacji geograficznej i niskiej liczebności. Różnice morfologiczne między tymi populacjami a wilkami z Europy Wschodniej wynikają zarówno z dryfu genetycznego jak też doboru naturalnego działającego na geny związane ze wzrostem i rozwojem tkanki kostnej (**Pilot et al. 2014a**).
- Udomowiony podgatunek wilka, pies domowy, charakteryzuje się ogromnym zróżnicowaniem morfologicznym w obrębie linii wsobnych (ras), lecz mniejszym zróżnicowaniem u wolno-żyjących psów. Osłabienie doboru naturalnego i płciowego u psów rasowych w porównaniu z kundlami mogło doprowadzić do różnic w regulacji szlaku sygnałowego Hedgehog, który hamuje migracje komórek grzebienia nerwowego z cewy nerwej. Niewielki deficyt tych komórek podczas rozwoju embrionalnego powoduje modyfikacje szeregu cech morfologicznych i fizjologicznych, co może być mechanizmem prowadzącym do zróżnicowania między rasami psów (**Pilot et al. 2016**).
- Populacje wolno-żyjących psów są odrębne genetycznie od psów rasowych i nie powstały w wyniku procesu mieszania się psów różnych ras. Współczesna struktura filogeograficzna wolno-żyjących psów w Eurazji została ukształtowana przez wielkoskalową ekspansję geograficzną ze wschodniej Azji na zachód, przez środkową i zachodnią Azję na Bliski Wschód i do Europy, która miała miejsce w okresie Neolitu (**Pilot et al. 2015**).
- Ze względu na brak barier reprodukcyjnych, wilki i psy mogą się krzyżować i produkować płodne potomstwo. Nasze badania nad hybrydyzacją wilków i psów pokazały, że proces ten miał miejsce zarówno w ciągu ostatnich pokoleń jak też w bardziej odległej historii obu podgatunków. W rezultacie 62% badanych wilków z Eurazji posiadało niewielki procent alleli pochodzących od psów. Wynik ten pokazuje, że historie ewolucyjne wilka i psa są ze sobą powiązane od czasu rozdzielenia się ich linii ewolucyjnych do czasów współczesnych (**Pilot et al. 2018**).

Publikacje skupione na historii ewolucyjnej wilka powstały w ramach kierowanych przeze mnie projektów badawczych: *“The effect of ecological factors on the population genetic structure of highly mobile social mammals: A comparative study of the killer whale and the grey wolf”* (2007-2008) finansowanego przez Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej (Program Kolumb), *“Relationship between foraging ecology and dispersal patterns in a highly mobile carnivore, the grey wolf”* (2008-2009), finansowanego przez British Ecological Society oraz *“Analysis of the evolutionary history of the grey wolf in Eurasia using genome-wide SNP data”* (2014-2016), finansowanego przez Uniwersytet w Lincoln (Returners’ Research Fund). Publikacje dotyczące historii ewolucyjnej psa domowego powstały w ramach projektu badawczego pt. *“Reconstructing the history of dog domestication using high-density SNP genotyping”* (2011-2014), którego byłam głównym wykonawcą, kierowanego przez profesora Wiesława Bogdanowicza i finansowanego przez Narodowe

Centrum Nauki. Praca dotycząca mechanizmów krzyżowania się wilka i psa powstała w ramach kierowanego przeze mnie projektu *“Consequences of alien sex: Investigating the adaptive value of hybridisation”* (2017-2018), finansowanego przez Leverhulme Trust.

Literatura (prace wchodzące w skład prezentowanego osiągnięcia są wyróżnione tłustym drukiem)

- Fan, Z., Silva, P., Gronau, I., Wang, S., Armero, A. S., Schweizer, R. M., ..., Wayne, R. K. 2016. Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves. *Genome Research*, 26, 163–173.
- Frantz L. A., Larson G. 2018. A genetic perspective on the domestication continuum. Str. 41-56 w *Hybrid Communities*. Red. Stépanoff C., Vigne J.-D. Routledge, London.
- Frantz, L. A., Mullin, V. E., Pionnier-Capitan, M., Lebrasseur, O., Ollivier, M., Perri, A., ..., Tresset, A. 2016. Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science*, 352(6290), 1228-1231.
- Freedman, A. H., Gronau, I., Schweizer, R. M., Ortega-Del Vecchyo, D., Han, E., Silva, P. M., ... Novembre, J. 2014. Genome sequencing highlights the dynamic early history of dogs. *PLoS Genetics*, 10, e1004016.
- Freedman, A. H., Wayne, R. K. 2017. Deciphering the origin of dogs: From fossils to genomes. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 281-307.
- Germonpre M., Sablin M.V., Stevens R.E., Hedges R.E.M., Hofreiter M., Stiller M., Despres V.R. 2009. Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science* 36: 473-490.
- Hindrikson M., Remm J., Pilot M., Godinho R., Stronen A.V., Baltrūnaitė L., Czarnomska S.D., Leonard J.A., Randi E., Nowak C., Åkesson M., López-Bao J.V., Álvares F., Llaneza L., Echegaray J., Vilà C., Ozolins J., Rungis D., Aspi J., Paule L., Skrbinšek T., Saarma U. 2017. Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. *Biological Reviews*, 92: 1601-1629.**
- Koblmüller, S., Vilà, C., Lorente-Galdos, B., Dabad, M., Ramirez, O., Marques-Bonet, T., ... & Leonard, J. A. 2016. Whole mitochondrial genomes illuminate ancient intercontinental dispersals of grey wolves (*Canis lupus*). *Journal of Biogeography*, 43, 1728-1738.
- Leonard JA, Vilà C, Fox-Dobbs K, Koch PL, Wayne RK, Van Valkenburgh B. 2007. Megafaunal extinctions and the disappearance of a specialized wolf ecomorph. *Current Biology*, 17, 1146-1150.
- Lescureux, N., & Linnell, J. D. C. (2014). Warring brothers: The complex interactions between wolves (*Canis lupus*) and dogs (*Canis familiaris*) in a conservation context. *Biological Conservation*, 171, 232–245.
- Moura A.E., Tsingarska E., Dąbrowski M.J., Czarnomska S.D., Jędrzejewska B., Pilot M. 2014c. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics*, 15, 407-415.**
- Newsome, T.M., Boitani, L., Chapron, G., Ciucci, P., Dickman, C.R., Dellinger, J.A., López-Bao, J.V., Peterson, R.O., Shores, C.R., Wirsing, A.J., Ripple, W.J., 2016. Food habits of the world's grey wolves.
- Nowak RM (2003) Wolf evolution and taxonomy. Str. 239–258 w *Wolves: behavior, ecology, and conservation*. Red. Mech LD, Boitani L. Chicago: The University of Chicago Press.
- Ostrander, E. A., Dreger, D. L., & Evans, J. M. (2018). Canine Cancer Genomics: Lessons for Canine and Human Health. Annual review of animal biosciences. Advance online publication. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014523>
- Pilot M., Branicki W., Jędrzejewski W., Goszczyński J., Jędrzejewska B., Dykyy I., Shkvryra M., Tsingarska E. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 104.**
- Pilot M., Dąbrowski M.J., Hayrapetyan V., Yavruyan E.G., Kopaliani N., Tsingarska E., Bujalska B., Kamiński S., Bogdanowicz W. 2014a. Genetic variability of the grey wolf *Canis lupus* in the Caucasus in**

comparison with Europe and the Middle East: Distinct or intermediary population? *PLoS ONE*, 9, e93828.

Pilot M., Greco C., vonHoldt B.M., Jędrzejewska B., Randi E., Jędrzejewski W., Sidorovich V.E., Ostrander E.A., Wayne R.K. 2014b. Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves. *Heredity*, 112, 428–442.

Pilot M., Greco C., vonHoldt B.M., Randi E., Jędrzejewski W., Sidorovich V.E., Konopiński M.K., Ostrander E.A., Wayne R.K. 2018. Widespread, long-term admixture between grey wolves and domestic dogs across Eurasia and its implications for the conservation status of hybrids. *Evolutionary Applications*, 11, 662–680.

Pilot M., Jędrzejewski W., Sidorovich V. E., Meier-Augenstein W., Hoelzel A.R. 2012. Dietary differentiation and the evolution of population genetic structure in a highly mobile carnivore. *PLoS ONE*, 7, e39341.

Pilot M., Malewski T., Moura A.E., Grzybowski T., Oleński K., Kamiński S., Fadel F.R., Alagaili A., Mohammed O., Bogdanowicz W. 2016. Diversifying selection between pure-breed and free-breeding dogs inferred from genome-wide SNP analysis. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6, 2285–2298.

Pilot M., Malewski T., Moura A.E., Grzybowski T., Oleński K., Ruś A., Kamiński S., Fadel F.R., Mills D.M., Alagaili A., Mohammed O., Kłys G., Okhlopkov, I., Suchecka, E., Bogdanowicz, W. 2015. On the origin of mongrels: evolutionary history of free-breeding dogs in Eurasia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20152189.

Wilkins, A. S., Wrangham, R. W., & Fitch, W. T. 2014. The “Domestication Syndrome” in mammals: a unified explanation based on neural crest cell behavior and genetics. *Genetics*, 197, 795–808.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Moja praca naukowa skupia się na rekonstrukcji procesów ewolucyjnych, ekologicznych i behawioralnych w populacjach ssaków przy użyciu metod genetyki populacji. Oprócz dziewięciu prac wchodzących w skład opisanego powyżej osiągnięcia, jestem autorem/współautorem 21 publikacji w czasopismach naukowych znajdujących się na Liście Filadelfijskiej. Ich pełna lista znajduje się w punkcie II-A dokumentacji habilitacji. Publikacje te skupiają się na następujących tematach:

- Rekonstrukcja zmian ewolucyjnych i demograficznych w populacjach ssaków w odpowiedzi na zmiany klimatyczne na przełomie Plejstocenu i Holocenu
- Analiza wpływu struktury pokrewieństwa w grupach społecznych ssaków na genetyczną strukturę populacji
- Rekonstrukcja genetycznej struktury populacji wilków i analiza kształtujących ją czynników
- Rekonstrukcja historii udomowienia psa przy użyciu metod genomiki populacji
- Analiza mechanizmów umożliwiających sympatryczne występowanie blisko spokrewnionych gatunków ssaków drapieżnych – kuny leśnej i kuny domowej
- Analiza wiarygodności metod detekcji “alleli zerowych”
- Modelowanie ewolucji zachowań altruistycznych w oparciu o “zasadę upośledzenia” Zahaviego

Najważniejsze osiągnięcia w ramach pracy nad każdym z tych tematów zostały opisane poniżej.

Rekonstrukcja zmian ewolucyjnych i demograficznych w populacjach szczytowych drapieżników lądowych i morskich w odpowiedzi na zmiany klimatyczne na przełomie Plejstocenu i Holocenu

Zmiany klimatyczne mające miejsce na przełomie Plejstocenu i Holocenu – od ostatniego pleniglacjału (25-15 tysięcy lat temu) do globalnego ocieplenia we wczesnym Holocenie (11700–8300 lat temu) – przyczyniły się do wyginięcia licznych gatunków dużych ssaków (megafauny) i spowodowały istotne zmiany

demograficzne i ewolucyjne w populacjach tych gatunków, które przetrwały ten okres. Jako część osiągnięcia opisanego w punkcie 4 omówiłam moje prace nad wpływem zmian klimatycznych na przełomie Plejstocenu i Holocenu na populacje wilka w Europie (Pilot et al. 2010, Pilot et al. 2014). Uczestniczyłam również jako współautor w badaniach wpływu tych zmian klimatycznych na populacje innych gatunków dużych ssaków pełniących rolę szczytowych drapieżników w ekosystemach lądowych i morskich. Badania te pokazały, że wszystkie te gatunki doświadczyły gwałtownych spadków liczebności, utraty zmienności genetycznej, lokalnych wyginięć i zmian struktury filogeograficznej w Późnym Plejstocenie i na początku Holocenu (Korsten et al. 2009, Moura et al. 2014, Ukkonen et al. 2014).

Pierwsza z tych prac była oparta o analizę haplotypów mitochondrialnego DNA niedźwiedzi brunatnych (*Ursus arctos*) z północnej Eurazji i miała na celu odtworzenie struktury filogeograficznej w tym regionie oraz oszacowanie czasu zróżnicowania się poszczególnych linii ewolucyjnych tego gatunku (Korsten et al. 2009). Analizy relacji filogenetycznych między poszczególnymi haplotypami mtDNA oraz czasu dywergencji poszczególnych linii ewolucyjnych pokazały, że na początku Holocenu niedźwiedź doświadczył szybkiej ekspansji geograficznej na terenie północnej Eurazji, która była poprzedzona silnym spadkiem liczebności prowadzącym do efektu szyjki od butelki (ang. bottleneck). Wyniki te sugerują, że współczesna eurazjatycka populacja niedźwiedzi brunatnych została zapoczątkowana podczas ostatniego pleniglacjału przez niewielką liczbę osobników pochodzących z jednego refugium lodowcowego (Korsten et al. 2009). Ekspansja poprzedzona efektem szyjki od butelki (bottleneck) w okresie ostatniego pleniglacjału została również opisana dla innych gatunków ssaków mających szeroki zasięg w Eurazji, co sugeruje, że zmiany klimatyczne na przełomie Plejstocenu i Holocenu miały podobny wpływ na wiele gatunków ssaków i ukształtowały ich współczesną strukturę filogeograficzną (Korsten et al. 2009).

Podobne procesy ewolucyjne w odpowiedzi na zmiany klimatyczne miały też miejsce w środowisku morskim. Pokazała to praca, której byłam współautorem, dotycząca historii ewolucyjnej szczytowego drapieżnika morskiego, orki *Orcinus orca* (Moura et al. 2014). Praca ta odtworzyła historyczną dynamikę populacji tego gatunku w oparciu o analizę kompletnego genomu jądrowego, zsekwencjonowanego *de-novo*, oraz haplotypów mitochondrialnego DNA orzek reprezentujących globalny zasięg gatunku. Nasze analizy pokazały, że liczebność globalnej populacji orzek podlegała niewielkim wahaniom przez większość Plejstocenu, lecz doświadczyła około dziesięciokrotnego spadku podczas Zlodowacenia Północnopolskiego (Weichselian; 115 do 11,7 tysięcy lat temu). Analiza zmienności mitochondrialnego DNA wykazała, że większość populacji orzek doświadczyła w tym okresie spadku liczebności, lecz populacja zamieszkująca wody wokół południowej Afryki zachowała wysoką liczebność i różnorodność genetyczną, prawdopodobnie dzięki wysokiej produktywności zamieszkiwanego ekosystemu. Przyczyną globalnego spadku liczebności orzek były prawdopodobnie zmiany środowiskowe podczas ostatniego zlodowacenia, a w szczególności globalny spadek produktywności oceanu (z wyjątkiem wód wokół południowej Afryki). Współczesna zmienność genetyczna tego gatunku ukształtowała się w wyniku zmian demograficznych spowodowanych przez zmiany klimatu.

Gatunki związane z ekosystemami Artyki, przede wszystkim te silnie związane z lodem morskim, są szczególnie wrażliwe na zmiany klimatu. Do takich gatunków należą arktyczne foki, których rozród uzależniony jest od obecności lodu. Praca, której byłam współautorem, była skupiona na jednym z takich gatunków, foce obrączkowej (*Pusa hispida*). Zasięg tego gatunku jest ograniczony do Artyki, z wyjątkiem jednej populacji zamieszkującej Morze Bałtyckie. Praca ta dyskutowała imigrację foki obrączkowej do Morza Bałtyckiego oraz zmiany rozmieszczenia tego gatunku w powiązaniu ze zmianami geologicznymi oraz zmianami w temperaturze, zasoleniu i produktywności tego morza. Wiek kości tego gatunku znalezionych wokół wybrzeży Bałtyku oszacowany za pomocą datowania radiowęglowego wskazywał na ciągłą obecność gatunku w tym morzu od czasu jego zasiedlenia. Najstarsze kości pochodzą z regionu cieśnin Skagerrak i Kattegat i są datowane na przełom Plejstocenu i Holocenu i fazę geologiczną Bałtyckiego Jeziora Lodowego (14-10,3 tysięcy lat temu). W Basenie Bałtyku gatunek ten pojawił się w fazie Jeziora Ancylusowego, lecz większość znalezionych kości jest datowana na fazę Morza Litorynowego. Zasięg geograficzny foki obrączkowej w Morzu Litorynowym był szerszy niż obecnie, pokrywając również jego południowe części. Obecność tego gatunku w południowym Bałtyku podczas Holocennego Maksimum Termicznego sugeruje,

że temperatury przynajmniej w części tego okresu musiały spadać wystarczająco nisko, aby morze zamarzało zimą. Analiza stabilnego izotopu węgla $\delta^{13}\text{C}$ pokazała również, że bałtyckie foki obrączkowe doświadczyły znacznych zmian diety w trakcie Holocenu, co było prawdopodobnie związane ze zmianami zasolenia morza wpływającymi na skład gatunkowy żyjących z nim ryb.

Wszystkie gatunki badane w tych pracach są szczytowymi drapieżnikami, które są szczególnie wrażliwe na zmiany środowiskowe ze względu na ich naturalnie niską liczebność i ich zależność od dynamiki populacji ich ofiar. Opisane powyżej badania pokazały, że zmiany klimatu mające miejsce w Późnym Plejstocenie i na początku Holocenu miały silny wpływ na rozmieszczenie i zmienność genetyczną szczytowych drapieżników lądowych i morskich.

Cytowane prace

Moura A.E., Janse van Rensburg, C., **Pilot M.**, Tehrani A., Best P.B., Thornton M., Plon S., de Bruyn P.J.N., Worley K.C., Gibbs R.A., Dahlheim M.E., Hoelzel A.R. 2014. Killer whale nuclear genome and mtDNA reveal widespread population bottleneck during the last glacial maximum. *Molecular Biology & Evolution* 31: 1121-1131.

Ukkonen P., Aaris-Sorensen K., Arppe L., Daugnora L., Halkka A., Lougas L., Oinonen M. J., **Pilot M.**, Stora J. 2014. An Arctic seal in temperate waters: history of the ringed seal (*Pusa hispida*) in the Baltic Sea and its adaptation to the changing environment. *Holocene* 24: 1694-1706.

Korsten M., Ho S., Davison J., Pahn B., Vulla E., Roht M., Tumanov I., Kojola I., Andersone-Lilley Z., Ozolins J., **Pilot M.**, Mertzanis Y., Giannakopoulos A., Vorobiev A.A., Markov N.I., Saveljev A.P., Lyapunova E.A., Abramov A.V., Mannil P., Valdmann H., V. Pazetnov S.V., Pazetnov V.S., Rokov A.M., Saarma U. 2009. Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage over northern continental Eurasia: a general demographic model for mammals after the last ice age? *Molecular Ecology* 18: 1963–1979.

Analiza wpływu struktury pokrewieństwa w grupach społecznych ssaków na genetyczną strukturę populacji

Struktura pokrewieństwa w grupach zwierząt i systemy kojarzeń pełnią istotną rolę w kształtowaniu się genetycznej struktury populacji. Właściwości systemu kojarzeń, w tym liczba i proporcja płci członków grupy społecznej biorących udział w rozrodzie, stopień ich spokrewnienia oraz różnice w liczbie potomstwa między osobnikami determinują zarówno skład grup jak też zmienność genetyczną w obrębie grup i między nimi. To ma z kolei duży wpływ na wielkoskalową strukturę genetyczną populacji. Badania nad decyzjami osobników dotyczącymi dyspersji i rozmnażania, które determinują przepływ genów, są potrzebne do zrozumienia czynników kształtujących genetyczną strukturę populacji.

Moje badania nad tym tematem były prowadzone w oparciu o gatunki reprezentujące różne rzędy ssaków: walenie, gryzonie i ssaki drapieżne. Jedną z prac (Pilot et al. 2010b) dotyczyła orka, socjalnych drapieżników wykazujących silne zróżnicowanie genetyczne między sympatrycznymi populacjami (ekotypami) różniącymi się składem pokarmu. Badania te wskazały na wysoki stopień spokrewnienia w obrębie grup społecznych oraz między grupami w obrębie tego samego ekotypu. Spokrewnienie między sympatrycznymi grupami reprezentującymi różne ekotypy było niskie. Wykazaliśmy, że przepływ genów między grupami społecznymi odbywa się wyłącznie w linii męskiej i ma miejsce najczęściej między grupami w obrębie tego samego ekotypu, a rzadko między ekotypami. Dyspersja osobników między grupami jest jednak rzadka, co pokazuje, że przepływ genów odbywa się bez dyspersji, w wyniku krzyżowania się osobników podczas spotkań między grupami społecznymi. Prawdopodobieństwo spotkań między grupami specjalizującymi się w tym samym rodzaju ofiar (które są związane z konkretnym typem ekosystemów morskich) jest wyższe w porównaniu do prawdopodobieństwa spotkań między grupami specjalizującymi się w różnych grupach ofiar (np. ryby anadromiczne występujące w pobliżu lądu *versus* ssaki morskie). Wyniki tych badań pokazują, że system

kojarzeń orek w połączeniu z ich zachowaniem społecznym, dyspersją i sposobem zdobywania pokarmu ma silny wpływ na genetyczną strukturę populacji tego gatunku (Pilot et al. 2010b).

Walenie mają różnorodne systemy społeczne i systemy rozrodu, lecz w przeciwieństwie do dużych gatunków takich jak orka, u mniejszych gatunków nie są one dobrze znane ze względu na trudności w zebraniu wystarczającego materiału obserwacyjnego. W pracy Ball et al. 2017 badaliśmy jeden z takich gatunków, delfina pospolitego (*Delphinus delphis*), łącząc dane genetyczne z analizą GIS w celu odtworzenia sposobu rozmieszczenia spokrewnionych osobników w przestrzeni i czasie oraz zrozumienia systemu krzyżowania się i sposobu dyspersji u tego gatunku. Delfin pospolity jest gatunkiem społecznym, charakteryzującym się niewielkim zróżnicowaniem genetycznym między populacjami z północno-wschodniego Atlantyku i Morza Śródziemnego, co wcześniejsze prace tłumaczyły niestabilną strukturą społeczną i brakiem przywiązania do konkretnych lokalizacji. Nasze wyniki pokazały, że chociaż grupy społeczne nie składały się z blisko spokrewnionych osobników, bliscy krewni byli często znajdowani w tej samej lokalizacji geograficznej w przeciągu kilku lat. Sugeruje to pewien stopień przywiązania do lokalizacji geograficznej, które może ułatwiać delfinom odnajdowanie ofiar (ryb) o sezonowo zmieniającym się rozmieszczeniu, dzięki znajomości danego środowiska. Dyspersja samic z macierzystej populacji prawdopodobnie odbywa się na dłuższe dystanse niż dyspersja samców, gdyż samce są znajdowane częściej niż samice w tych samych lokalizacjach, co ich bliscy krewni. Częsta długodystansowa dyspersja jest prawdopodobną przyczyną słabego zróżnicowania między populacjami. Praca ta pokazuje, że analiza próbek zebranych w tych samych lokalizacjach geograficznych w okresie kilku lat pozwala na zrozumienie struktury społecznej i sposobu dyspersji badanego gatunku oraz wpływu tych czynników na zmienność genetyczną populacji (Ball et al. 2017).

Płetwonogie różnią się od walení cyklem życiowym ze względu na konieczność wyjścia na ląd lub lód morski w celu wydania potomstwa. Z tego względu przechodzą one przez coroczne cykle migracyjne między otwartym morzem, gdzie się żywią, a wybrzeżem, gdzie ma miejsce sezon rozrodczy oraz sezon linienia. Zmienność genetyczna populacji u gatunków płetwonogich może się znacznie różnić zależnie od etapu cyklu migracyjnego. Badaliśmy to na przykładzie południowych słoń morskich *Mirounga leonina*, które żerują w Oceanie Antarktycznym, zaś rozród i linienie odbywają na subantarktycznych wyspach. W naszej pracy (Bogdanowicz et al. 2013) scharakteryzowaliśmy zmienność genetyczną kolonii słoń morskich z Wyspy Króla Jerzego (WKJ) na Szetlandach Południowych w sezonie linienia i porównaliśmy ją do zmienności kolonii rozrodczych opisanych we wcześniejszych pracach. Mimo że WKJ służy również jako miejsce do rozrodu, liczba słoń morskich obecnych tam podczas sezonu linienia była do trzech razy większa niż w sezonie rozrodczym, sugerując, że duża liczba osobników nie uczestniczy w rozrodzie, bądź też osobniki z innych kolonii rozrodczych imigrują do WKJ w sezonie linienia. Duża różnorodność haplotypów mitochondrialnego DNA i wysoki procent haplotypów występujących również w innych koloniach stanowi wsparcie dla hipotezy o imigracji z innych kolonii z Południowego Atlantyku, co jest również zgodne z wynikami wcześniejszych badań opartych o telemetrię satelitarną. Efektywna wielkość populacji oszacowana w oparciu o zmienność mitochondrialnego DNA i jądrowych loci mikrosatelitarnych była nieoczekiwanie wysoka w porównaniu z liczbą osobników w kolonii WKJ, co również wskazuje na intensywną imigrację. Wyniki te pokazują, że grupy społeczne takie jak kolonie rozrodcze i kolonie formowane w okresie linienia zmieniają się dynamicznie pod względem składu osobników, co wpływa również na zmienność genetyczną populacji. Zatem do pełnego zrozumienia systemu społecznego i dynamiki populacji gatunków odbywających sezonowe migracje potrzebne są badania genetyczne i behawioralne populacji w różnych okresach ich cyklu migracyjnego (Bogdanowicz et al. 2013).

Kolejna praca (Pilot et al. 2010c) badała zależności między zmianami demograficznymi, strukturą pokrewieństwa a zmiennością genetyczną populacji, używając jako modelu nornika północnego (*Microtus oeconomus*). Celem pracy było empiryczne przetestowanie następujących przewidywań modeli teoretycznych: (1) zmiany w strukturze pokrewieństwa prowadzą do fluktuacji liczebności populacji przez wpływ na poziom agresji i imigrację; (2) fluktuacje liczebności populacji i nielosowe krzyżowanie prowadzi do zmian różnorodności genetycznej między pokoleniami. W tym celu lokalna populacja nornika północnego została poddana intensywnym odłowom w okresie sześciu lat przy użyciu pułapek

żywołownych i pobrano próbki od wszystkich złowionych osobników. Analiza danych o frekwencji oznakowanych osobników, które zostały powtórnie odłowione, pokazała, że 642 odłowione osobniki stanowiły 88% badanej populacji oraz że średnia roczna liczebność populacji różniła się czterokrotnie między różnymi latami badań. W oparciu o genotypy osobników w 20 loci mikrosatelitarnych porównaliśmy zmienność genetyczną i strukturę pokrewieństwa badanej populacji między poszczególnymi latami oraz zidentyfikowaliśmy osobniki, które imigrowały do tej populacji. Wyniki tych analiz pokazały, że zagęszczenie jest negatywnie skorelowane z intensywnością imigracji, a pozytywanie skorelowane z liczbą grup spokrewnionych osobników. Jest to zgodne z przewidywaniem (1), że zmiany w strukturze pokrewieństwa wpływają na fluktuacje liczebności populacji. Mimo zmian zagęszczenia i struktury pokrewieństwa, różnice genetyczne między populacjami z poszczególnych lat nie były statystycznie istotne. Zmienność genetyczna populacji utrzymywała się na stosunkowo wysokim poziomie (oczekiwana heterozygotyczność mieściła się w granicach 0.72–0.78) i nie różniła się istotnie między latami, co jest niezgodne z przewidywaniem (2). Te wyniki pokazały, że populacja, która doświadcza silnych zmian demograficznych i zmian w strukturze pokrewieństwa może utrzymywać wysoką zmienność genetyczną i niewielkie zróżnicowanie genetyczne między pokoleniami (Pilot et al. 2010c).

Moje zainteresowanie zależnością między strukturą pokrewieństwa w grupach społecznych a genetyczną strukturą populacji pozwoliło mi również na wykroczenie poza mój typowy obszar zainteresowania ssakami, w pracy dotyczącej struktury pokrewieństwa w mieszanych, kilku-gatunkowych koloniach mrówek (Korczyńska et al. 2010).

Cytowane prace

Ball L., Shreves K., **Pilot M.**, Moura A.E. 2017. Temporal and geographic patterns of kinship structure in common dolphins (*Delphinus delphis*) suggest site fidelity and female-biased long-distance dispersal. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 71: 123.

Bogdanowicz W., **Pilot M.**, Gajewska M., Suchecka E., Golachowski M. 2013. Genetic diversity in a moulting colony of southern elephant seals in comparison with breeding colonies. *Marine Ecology Progress Series* 478: 287-300.

Pilot M., Dahlheim M.E., Hoelzel A.R. 2010b. Social cohesion among kin, gene flow without dispersal and the evolution of population genetic structure in the killer whale (*Orcinus orca*). *Journal of Evolutionary Biology* 23: 20-31.

Pilot M., Dąbrowski M.J., Jancewicz E., Schtickzelle N., Gliwicz J. 2010c. Temporally stable genetic variability and dynamic kinship structure in a fluctuating population of the root vole *Microtus oeconomus*. *Molecular Ecology* 19: 2800-2812.

Korczyńska J., Gajewska M., **Pilot M.**, Czechowski W., Radchenko A. 2010. Genetic polymorphism in "mixed" colonies of wood ants (Hymenoptera: Formicidae) in southern Finland and its possible origin. *European Journal of Entomology* 107: 157-167.

Rekonstrukcja genetycznej struktury populacji wilków i analiza kształtujących ją czynników

Poza publikacjami dotyczącymi historii ewolucyjnej wilka, które wchodzi w skład osiągnięcia opisanego w części 4, jestem również współautorem innych publikacji skupionych na genetyce populacji wilka. Nie wchodzi one w skład osiągnięcia, gdyż nie pełniłam kluczowej roli w powstaniu tych prac, lub ze względu na fakt, że publikacja była wynikiem mojej pracy doktorskiej (Pilot et al. 2006).

de Groot G. A., Nowak C., Skrbinšek T., Andersen L.W., Aspi J., Fumagalli L., Godinho R., Harms V., Jansman H.A.H., Liberg O., Marucco F., Mysłajek R.W., Nowak S., **Pilot M.**, Randi E., Reinhardt I., Śmietana W., Szewczyk M., Taberlet P., Vilà C., Muñoz-Fuentes V. 2015. Decades of population genetic research reveal the need for harmonization of molecular markers: the grey wolf *Canis lupus* as a case study. *Mammal Review*, 46: 44-59.

Stronen A.V., Jędrzejewska B., Pertoldi C., Demontis D., Randi E., Niedzialkowska M., **Pilot M.**, Sidorovich V.E., Dykyy I., Kusak J., Tsingarska E., Kojola I., Karamanlidis A.A., Ornicans A., Lobkov V.A., Dumenko V., Czarnomska S.D. 2013. North-south differentiation and a region of high diversity in European wolves (*Canis lupus*). *PLoS ONE* 8(10): e76454.

Czarnomska S.D., Jędrzejewska B., Borowik T., Niedzialkowska M., Stronen A.V., Nowak S., Myslaiek R.W., Okarma H., Konopinski M., **Pilot M.**, Śmietana W., Caniglia R., Fabbri E., Randi E., Pertoldi C., Jędrzejewski W. 2013. Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics* 14: 573-588.

vonHoldt B.M., Pollinger J.P., Earl D.A., Knowles J.C., Boyko A.R., Parker H.G., Geffen E., **Pilot M.**, Jędrzejewski W., Jędrzejewska B., Sidorovich V.E., Greco C., Randi E., Musiani M., Kays R., Bustamante C.D., Ostrander E.A., Novembre J., Wayne R.K. 2011. A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research* 21: 1213-1222.

Pilot M., Jędrzejewski W., Branicki W., Sidorovich V.E., Jędrzejewska B., Stachura K., Funk S.M. 2006. Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology* 15: 4533-4553.

Jędrzejewski W., Branicki W., Veit C., Medugorac I., **Pilot M.**, Bunevich A.N., Jędrzejewska B., Schmidt K., Theuerkauf J., Okarma H., Gula R., Szymura L., Foerster M. 2005. Genetic diversity and relatedness within packs in intensely hunted population of wolves *Canis lupus*. *Acta Theriologica* 50: 3-22.

Rekonstrukcja historii udomowienia psa przy użyciu metod genomiki populacji

Uczestniczyłam w dużym międzynarodowym projekcie mającym na celu rekonstrukcję historii udomowienia psa przy użyciu nowo opracowanej (dla celów tego projektu) mikromacierzy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP). Umożliwiło to analizę 48 tysięcy loci u psów oraz u wilków z Europy, Azji i Ameryki Północnej. Wyniki tych badań pokazały, że wilki z Bliskiego Wschodu miały duży wkład w kształtowanie zmienności genetycznej psów w początkowym okresie ich udomowienia bądź też później, w wyniku hybrydyzacji (vonHoldt et al. 2010). Hybrydyzacja psów z lokalnymi populacjami wilków miała też miejsce w innych regionach w obrębie zasięgu geograficznego wilka. Praca pokazała również, że rasy psów wykazujące bliskie podobieństwo genetyczne charakteryzują się także podobieństwem fenotypowym oraz podobieństwem pełnionych funkcji. Sugeruje to, że poszczególne rasy psów powstały w wyniku procesu, w którym psy były początkowo selekcjonowane pod względem fenotypu odpowiedniego dla pełnionej funkcji użytecznej dla człowieka, a z tych szerszych grup wyodrębnione zostały później rasy. Praca ta umożliwiła lepsze zrozumienie historii ewolucyjnej psa oraz dostarczyła nowej metody analizy zmienności genetycznej psów i ich dzikich krewnych w skali całego genomu, która jest szeroko wykorzystywana przez naukowców badających różne aspekty genetyki przedstawicieli rodzaju *Canis*.

vonHoldt B.M., Pollinger J.P., Lohmueller K.E., Han EJ, Parker HG, Quignon P, Degenhardt JD, Boyko AR, Earl DA, Auton A, Reynolds A, Bryc K, Brisbin A, Knowles JC, Mosher DS, Spady TC, Elkahouloun A, Geffen E, **Pilot M.**, Jędrzejewski W., Greco C., Randi E., Bannasch D., Wilton A., Shearman J., Musiani M., Cargill M., Jones P.G., Qian Z., Huang W., Ding Z.-L., Zhang Y.-P., Bustamante C.D., Ostrander E.A., Novembre J., Wayne R.K. 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature* 464: 898-894.

Analiza mechanizmów umożliwiających sympatryczne występowanie blisko spokrewnionych gatunków ssaków drapieżnych – kuny leśnej i kuny domowej

Kuna leśna (*Martes martes*) i kuna domowa (*Martes foina*) występują sympatrycznie w centralnej i południowej Europie. W czasie, gdy nasz zespół (Prof. Jacek Goszczyński, Dr Maciej Poślusznny i Dr Barbara Gralak) rozpoczął pracę nad tym tematem, niewiele było wiadomo na temat różnic między niszami pokarmowymi tych gatunków, gdyż kuny są trudne do obserwacji, a rozróżnienie odchodów obu gatunków

w oparciu o ich cechy morfologiczne jest niemożliwe. W celu zrozumienia mechanizmów umożliwiających sympatryczne występowanie tych gatunków opracowaliśmy metodę genetyczną, która umożliwia identyfikację gatunkową ich odchodów. Metoda ta oparta jest na znacznych różnicach długości sekwencji DNA dwóch loci mikrosatelitarnych między kuną leśną a kuną domową. Łączna analiza tych dwóch loci umożliwia jednoznaczną i wiarygodną identyfikację gatunkową. W połączeniu z większym panelem loci mikrosatelitarnych, metoda ta umożliwia jednoczesną identyfikację gatunkową i rozróżnienie odchodów pochodzących od poszczególnych osobników, jak również analizę zmienności genetycznej populacji (Pilot et al. 2007).

W celu praktycznego przetestowania tej metody przeanalizowaliśmy 365 odchodów kun zebranych w okolicach wsi Rogów. Zidentyfikowaliśmy 78 odchodów kun leśnych i 155 odchodów kun domowych. Na obszarach leśnych w obrębie terenu badań występowały oba gatunki kun. Pokazuje to, że identyfikacja gatunkowa w oparciu o miejsce znalezienia odchodów nie jest wiarygodna. Genetyczna identyfikacja gatunkowa umożliwia monitoring zmian rozmieszczenia obu gatunków kun, co jest ważne ze względu na różnice w ich trendach demograficznych (Pilot et al. 2007).

Zastosowanie tej metody do identyfikacji gatunkowej odchodów kun umożliwiło nam również porównanie diety obu gatunków na obszarze ich sympatrycznego występowania. Oba gatunki żywiły się głównie drobnymi gryzoniami, ptakami i owocami. Mimo dużego podobieństwa ich nisz pokarmowych, znaleźliśmy istotne różnice ilościowe w składzie ich pokarmu. W pokarmie kun leśnych z większą częstotliwością występowały gryzonie i ptaki, zaś w pokarmie kun domowych owoce i owady. Mimo że oba gatunki użytkowały te same obszary leśne, identyfikacja genetyczna przynależności gatunkowej odchodów umożliwiła nam znalezienie istotnych różnic w pokarmie tych blisko spokrewnionych gatunków (Poślusznny et al. 2007).

Badaliśmy również różnice w sposobie przeszukiwania przestrzeni przez oba gatunki przy użyciu tropienia śladów na śniegu i identyfikacji przynależności gatunkowej odchodów zebranych na trasach tropów. Tropy kuny leśnej i kuny domowej były rozróżniane w terenie w oparciu o ich kształt i analizy genetyczne wykazały, że ta identyfikacja była poprawna w 88% przypadków. Mimo że aktywność obu gatunków koncentrowała się głównie na dnie lasu, kuny leśne wspinały się po drzewach, przemieszczały się w koronach drzew i przeszukiwały podstawy pni oraz dziuple w drzewach częściej niż kuny domowe. Z kolei kuny domowe częściej szukały pokarmu w stosach chrustu i drewna i częściej odwiedzały poręby i wysypiska śmieci. Kuny leśne unikały obiektów antropogenicznych oraz dróg i rzadko przekraczały tereny otwarte. Ze względu na te cechy behawioralne kuny leśne są szczególnie wrażliwe na fragmentację lasu i działalność ludzką w lasach. Kuny domowe często penetrowały obszary otwarte i zamieszkałe budynki, co pozwalało im na użytkowanie środowisk znacznie przekształconych i intensywnie użytkowanych przez człowieka. Przyszła koegzystencja i względna liczebność obu gatunków kun w środowiskach leśnych jest uzależniona od sposobu prowadzenia gospodarki leśnej i od obecności korytarzy migracyjnych łączących pąty lasu (Goszczyński et al. 2007).

Nasz zespół otrzymał za opisany powyżej cykl publikacji Wyróżnienie Wydziału II Nauk Biologicznych PAN w 2008 roku.

Cytowane prace

Pilot M., Gralak B., Goszczyński J., Poślusznny M. 2007. A method of genetic identification of pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) and its application to faecal samples. *Journal of Zoology, London* 271: 140-147.

Poślusznny M., **Pilot M.**, Goszczyński J., Gralak B. 2007. Diet of sympatric pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) identified by genotyping of DNA from faeces. *Annales Zoologici Fennici* 44: 269-284.

Goszczyński J., Poślusznny M., **Pilot M.**, Gralak B. 2007. Patterns of winter locomotion and foraging in two sympatric marten species: *Martes martes* and *Martes foina*. *Canadian Journal of Zoology* 85: 239-249.

Analiza wiarygodności metod detekcji “alleli zerowych”

Loci mikrosatelitarne to markery genetyczne o szerokim zastosowaniu w genetyce populacji. Mają one wiele cech, które czynią je użytecznymi markerami w szerokim spektrum badań, lecz charakteryzują się też obecnością tak zwanych alleli zerowych, które mogą zaburzać wyniki analiz. Allele zerowe to allele, które nie mogą być wykryte w trakcie standardowego procesu genotypowania loci mikrosatelitarnych ze względu na mutacje w miejscach przyłączania starterów lub z innych przyczyn uniemożliwiających reakcję PCR. Praca, której byłam współautorem, oceniła wiarygodność pięciu metod analitycznych, które pośrednio wykrywają obecność alleli zerowych, wskazując na duże niezgodności między tymi metodami (Dąbrowski et al. 2014). Nasze analizy były oparte o genotypy w 20 loci mikrosatelitarnych osobników z naturalnej populacji nornika północnego *Microtus oeconomus* badanej w ciągu 8 lat oraz na symulacjach populacji z allelami zerowymi obecnymi w genotypach oraz populacji bez alleli zerowych, lecz doświadczających procesu szyjki od butelki (bottleneck) o różnej długości i intensywności. W naturalnej populacji nornika 29% przypadków wykrycia alleli zerowych było zgodne dla różnych metod (porównywanych w parach), zaś w przypadku symulowanych populacji ta proporcja wynosiła 14%. W symulowanych populacjach, w których nie występowały allele zerowe, liczba mylnie wykrytych alleli zerowych rosła wraz z długością i intensywnością symulowanego procesu szyjki od butelki. W symulowanych populacjach, w których były obecne allele zerowe, 22%-42% tych alleli nie została wykryta, pokazując, że błędy detekcji dotyczą zarówno fałszywej identyfikacji alleli zerowych jak też braku identyfikacji rzeczywistych alleli zerowych. Biorąc pod uwagę oba rodzaje błędów, żadna z ocenianych metod nie była wyraźnie lepsza od pozostałych. Uwzględnianie tylko alleli zerowych potwierdzonych przez co najmniej dwie metody pozwala na znaczną redukcję fałszywych alleli zerowych, lecz może to z kolei zwiększyć proporcję niewykrytych rzeczywistych alleli zerowych (Dąbrowski et al. 2014). Nasza praca wskazała na ważny problem pojawiający się przy analizie mikrosatelitów, który rzadko był brany pod uwagę przed publikacją tej pracy. Pokazało to potrzebę opracowania nowych, bardziej wiarygodnych metod detekcji alleli zerowych w celu uniknięcia błędów, które mogą się pojawić w wynikach analiz genetycznych w sytuacji, gdy obecność alleli zerowych nie jest brana pod uwagę.

Dąbrowski M.J., Pilot M., Kruczyk M., Żmihorski M., Umer H.M., Gliwicz J. 2014. Reliability assessment of null allele detection: inconsistencies between and within different methods. *Molecular Ecology Resources* 14: 361-373.

Model ewolucji zachowań altruistycznych w oparciu o “zasadę upośledzenia” Zahaviego

Większość teorii opisujących ewolucję zachowań kooperacyjnych u zwierząt opiera się na zasadzie odwzajemnionego altruizmu. Teoria izraelskiego uczonego Amotza Zahaviego proponuje inny model, zwany “zasadą upośledzenia”, w którym akt altruizmu jest sygnałem odzwierciedlającym jakość osobnika i dlatego jest korzystny dla tego osobnika nawet jeśli nie zostanie odwzajemniony. W mojej pracy (Pilot et al. 2005) model Zahaviego został przetestowany przy użyciu symulacji komputerowych ewolucji zachowań altruistycznych. W modelu tym symulowana była populacja, w której dostosowanie (fitness) osobników zależało od bilansu między ich kondycją fizyczną a “prestżem”, który rósł wraz z każdym aktem altruizmu. Wyniki symulacji pokazały, że jeśli zachowania altruistyczne są kosztowne i przynoszą osobnikom prestiż, współpraca między osobnikami może utrzymywać się w populacji mimo braku bezpośredniego odwzajemniania aktów altruizmu. Wynika stąd, że ewolucja zachowań altruistycznych zgodna z kontrowersyjnym modelem Zahaviego jest możliwa.

Pilot M. 2005. Altruism as an advertisement – a model of the evolution of cooperation based on Zahavi’s handicap principle. *Ethology Ecology & Evolution* 17: 217-231.

Podsumowanie pozostałej działalności naukowo-badawczej

Łączny *Impact Factor* z publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi 111.185. Łączna liczba cytowań tych publikacji wynosi 1120 (1103 bez autocytacji).

Publikacje nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego powstały w wyniku realizacji pięciu projektów badawczych, w tym dwóch projektów, których byłam kierownikiem. Moja praca naukowa była wspierana przez dwa stypendia Fundacja na Rzecz Nauki Polskiej (START, 2007 i KOLUMB, 2007), stypendium Marie Skłodowska-Curie Research Fellowship przyznane przez Komisję Europejską oraz stypendium (Research Fellowship) dla doświadczonych naukowców przyznane przez Leverhulme Trust (Wielka Brytania). Zespół badawczy, którego byłam członkiem wraz z Prof. Jackiem Goszczyńskim, Dr Maciejem Połusznym i Dr Barbarą Gralak otrzymał wyróżnienie Wydziału II Nauk Biologicznych PAN (2008) za cykl publikacji dotyczących ekologii dwóch sympatrycznych gatunków kun (Pilot et al. 2007, Połuszyński et al. 2007, Goszczyński et al. 2007).

Małgorzata Pilot