



Olsztyn, 6.02.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Prądzińskiej  
pod tytułem  
Biogeografia omułek *Mytilus* i identyfikacja pochodzenia geograficznego ich  
produktów żywnościowych z zastosowaniem metod genetycznych (analiza polimorfizmu  
pojedynczych nukleotydów)**

*Recenzję wykonano na zlecenie Dyrektora Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk z  
siedzibą w Sopocie, pismem z dnia 19 grudnia 2022r.*

**Ocena tematyki pracy**

Badania struktury populacji a także obiektywne wyznaczanie granic gatunków pozostają ważnym wyzwaniem systematyki a stają się konieczne, gdy nierozwiązana taksonomia komplikuje wysiłki na rzecz ich ochrony i odbudowy a także właściwego gospodarowania ich zasobami. Solidnie przeprowadzona analiza taksonomiczna umożliwi wnioskowanie o wspólnych cechach biologicznych, pozwala odnaleźć i zrozumieć wspólne cechy odpowiedzi organizmów na zmienne warunki środowiska, jest wymagana do skutecznego ustalania priorytetów ochrony. Metody, głównie koalescencyjne, stosowane do wyznaczania gatunków i struktury ich populacji wciąż ewoluują, a argumenty często odzwierciedlają sprzeczne interpretacje dostępnych typów danych (np. morfologiczne, molekularne). Przykładem bogatej w gatunki grupy taksonomicznej, której historia ewolucyjna została dość dobrze scharakteryzowana rozmieszczeniem geograficznym, cechami fenotypowymi a także wzorcami molekularnymi (polimorfizm mtDNA; polimorfizm markerów jądrowego DNA; polimorfizm pojedynczych nukleotydów, SNP) są omułki *Mytilus*. Jednak ze względu na fakt, że ich rozmieszczenie uzależnione jest od wielu czynników, np. rodzaju podłoża, obecności fitoplanktonu i układu prądów morskich i tutaj napotyka się problemy systematyczne. Małże te, uznawane za inżynierów morskich ekosystemów przybrzeżnych, występują na półkuli północnej i południowej, jednak nadal nie znamy szczegółów o drogach ich kolonizacji i dynamice. Co więcej, omułki mają duże znaczenie konsumpcyjne a ich hodowle rozpowszechnione są na całym świecie. Doprowadziło to i nadal prowadzi do wymieszania populacji *Mytilus* w różnych rejonach ich występowania i zatarcia cechujących je wzorców. Obecnie, za pilne uznaje się starania zmierzające do opracowania metod i identyfikacji natywnych i introdukowanych taksonów *Mytilus* w całym ich zasięgu geograficznym.

Należy stwierdzić zatem, że zagadnienie badawcze podjęte w rozprawie doktorskiej przez Panią mgr Annę Prądzińską jest aktualne i mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki o Ziemi i środowisku. Aby wypełnić luki w wiedzy o biogeografii omułek za cele niniejszej pracy Doktorantka przyjęła:

- zbadanie zróżnicowania genetycznego populacji naturalnych *Mytilus galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym i w akwenach przyległych z zastosowaniem SNP, określenie pochodzenia populacji *M. galloprovincialis* w Morzu Czarnym i Azowskim,
- zbadanie polimorfizmu genetycznego introdukowanych populacji *M. galloprovincialis* w Afryce Południowej z zastosowaniem SNP,
- identyfikację taksonów *Mytilus* w próbach żywności pochodzących ze sprzedaży w Europie z zastosowaniem SNP,
- ocenę zgodności informacji o taksonie i pochodzeniu geograficznym omułek *Mytilus* przedstawionych na etykietach produktów żywnościowych z wynikami badań genetycznych.

### Ocena formalna pracy

Praca doktorska powstała w ramach realizacji stypendium nr 43/ DW/2017/01/2 w programie „Doktorat Wdrożeniowy” Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Na bazie części wyników uzyskanych w pracy doktorskiej (rozdziały 1 i 3) zostały przygotowane 2 publikacje.

Recenzowana rozprawa doktorska, wydana w formie monografii, liczy 135 stron, zawiera 26 rysunków i 11 tabel. Zamieszczone w pracy rysunki są czytelne i w większości ilustrują wyniki badań własnych przeprowadzonych przez Doktorantkę. Spis literatury liczy 168 pozycji; cytowane piśmiennictwo w zdecydowanej większości anglojęzyczne, jest ściśle związane z tematyką rozprawy, jest dobrze wykorzystane do opisu stosowanych metod i ma kluczowe znaczenie w interpretacji uzyskanych wyników. Układ rozprawy jest klasyczny z podziałem na część literaturową i analityczną, t.j. Streszczenie z angielskim abstraktem, Wstęp, Cele badań, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura. Edycja pracy jest staranna, napisana jest ona poprawnym językiem. Uwagę recenzenta zwróciły jedynie nieliczne "literówki", powtórzenia, jak w opisie Tabeli 2 i niezręczne sformułowania jak na przykład to na str. 23, że "strefy niezależne od warunków środowiska są produktem ubocznym styku dwóch populacji". Jeśli chodzi o mieszańce, jak się domyślam, co w takim razie jest głównym efektem kontaktu dwóch populacji?

### Ocena merytoryczna pracy

Pani mgr Anna Prądzińska Wstęp podzieliła, obok wprowadzenia (3.1), na 4 zagadnienia związane z charakterystyką rodzaju *Mytilus* (3.2), ich ekologią (3.3), rozmieszczeniem gatunków tego rodzaju w Oceanie Światowym z uwzględnieniem farm hodowlanych (3.4). Ostatni rozdział Wstępu (3.5) przybliży wiedzę o ewolucji gatunku *Mytilus galloprovincialis*.

W rozdziale 3.2 Autorka przedstawia najważniejsze informacje o pozycji systematycznej rodzaju *Mytilus* i gatunkach, ich biologii oraz trudnościach w klasyfikacji taksonów, implikujących w tym celu badania nie tylko cech morfologicznych, ale różnorodnych markerów diagnostycznych. Zgrabnie kontynuując ten wątek Pani mgr Prądzińska skupia się na jednym rodzaju markerów, polimorfizmie pojedynczych nukleotydów (ang. Single Nucleotide Polymorphism; SNP), którego analiza zdominowała badania taksonów *Mytilus*

przeprowadzone w niniejszej pracy. W podrozdziale 3.3 Pani Prądzińska przytacza klarownie podstawowe informacje dotyczące ekologii *Mytilus*, niechlubnej roli aktywności człowieka w zacieraniu wzorców populacji gatunku związanej z hodowlą omułków, wreszcie wskazuje strefy hybrydyzacji opisane w literaturze przedmiotu. Podrozdziały 3.4 i 3.5 to dobrze napisane, świetnie zilustrowane charakterystyki biogeograficzne omułków z ciekawą historią ewolucyjną jednego z gatunków, *M. galloprovincialis*, wciągającą w temat pracy. Doceniając wiedzę zgromadzoną w tym rozdziale przez Doktorantkę należy żałować, że zabrakło tutaj (lub w Dyskusji) rysunku(ów) dokumentujących procesy kolonizacji omułków w Oceanie Światowym i Morzu Śródziemnym, które, odpowiednio, doprowadziły do dzisiejszego rozmieszczenia *Mytilus*, określanego jako antytropikalne lub bipolarne, oraz w szczególności *M. galloprovincialis*. Zabrakło mi też hipotez, które Autorka mogłaby zweryfikować, dysponując dostępem do tak bogatego materiału badawczego. Podkreślę jednak, iż postawione Cele pracy w jasny sposób definiują obszar badań objęty rozprawą.

Dla realizacji poszczególnych celów pracy i uzupełnienia wiedzy na temat bioróżnorodności omułków Pani Anna Prądzińska wykorzystywała próbki *Mytilus* pozyskane wcześniej przez Zespół badawczy Pracowni Genetyki Organizmów Morskich Zakładu Genetyki i Biotechnologii Organizmów Morskich IO PAN w Sopocie. Do określenia genotypów badanych omułków Pani Prądzińska zastosowała metodę polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP). Próbkę DNA do badań były izolowane z tkanki płaszczu omułków znaną metodą CTAB a następnie genotypowane (1967 domniemanych osobników *M. galloprovincialis*; 613 osobników referencyjnych) w norweskim laboratorium Centre for Integrative Genetics. W celu oceny różnorodności genetycznej wśród badanych taksonów *Mytilus* do analizy wyników genotypowania Autorka użyła trafnie dobranych narzędzi bioinformatycznych, m.in. ARLEQUIN, określając frekwencje alleli, proporcje polimorficznych SNP, frekwencje alleli mniejszościowych, heterozygotyczność obserwowaną i oczekiwaną, a także różnorodność genetyczną i wskaźnik zróżnicowania populacji parami, współczynnik inbredu i odstępstwa od równowagi Hardy'ego-Weinberga. Inne dedykowane narzędzia Doktorantka użyła do wnioskowania o strukturze populacji (m.in. STRUCTURE; Analiza korespondencji, CA; MEGA4). Niewątpliwie słabą stroną tej części pracy jest brak informacji o kryteriach wyboru lokalizacji miejsc poboru próbek (Sampling design) oraz ich charakterystyk. Rodzaj i dostępność podłoża, konkurencja innych gatunków bentosowych, prądy morskie, zmiany fizycznych i chemicznych właściwości wody, produkcja fitoplanktonu, czy odporność na wysychanie podczas odpływów mają istotny wpływ na rozmieszczenie gatunków *Mytilus*. Takie dane niewątpliwie wzbogaciłyby opis wyników a w przyszłości stanowiłyby poszukiwane źródło informacji do wykorzystania w analizach taksonomii integratywnej omułków.

„Wyniki” to rozdział zestawiający rezultaty badań genetycznych, pogrupowane w 3 zagadnienia badawcze, odnoszące się do (i) zróżnicowania genetycznego populacji naturalnych *Mytilus galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym i w akwenach przyległych, (ii) introdukowanych populacji *M. galloprovincialis* w Afryce Południowej, oraz (iii) identyfikacji taksonów *Mytilus* w próbach żywności pochodzących ze sprzedaży w Europie. Autorka cierpliwie i dokładnie prowadzi czytelnika przez kolejne analizy, uzupełniając opis materiału badawczego, w tym charakterystyki użytych markerów SNP, cierpliwie zestawia w tabelach i ilustruje dane o różnorodności genetycznej, zróżnicowaniu i strukturze populacji

omawianych taksonów, uwidacznia błędne informacje o pochodzeniu prób żywnościowych omułek. Co ważne, na końcu każdego wątku Autorka formułuje swoją opinię dotyczącą uzyskanego wyniku. Choć czasem jest to bardzo ogólne stwierdzenie, taka dbałość o czytającego dowodzi dojrzałości naukowej Autorki.

Rozdział „Dyskusja” jest czytelny w odbiorze, podzielony na podrozdziały, odpowiadające 3 zagadnieniom poruszonym w pracy. Doktorantce udało się dokonać obszernego porównania i sformułować ważne wnioski. Zachowując w opisie kanon: Obserwacja >Interpretacja>Porównanie/Uogólnienie>Wniosek, Pani Prądzińska jeszcze raz udowadnia swoją dojrzałość naukową. Wśród wyników pracy zainteresowały mnie te dotyczące genotypowania SNP w populacjach ORAN 1 i 4 (wybrzeże Algierii), które wskazują na występowanie tam "obok siebie" atlantyckiej linii *M. galloprovincialis* (populacja ORA4) oraz linii śródziemnomorskiej (ORA1). Szkoda, że zabrakło tu pogłębionej analizy czynników środowiskowych i/lub izolujących mechanizmów wewnętrznych, które mogłyby tłumaczyć rozdzielne występowanie obu linii.

Rozprawę kończy rozdział „Wnioski”. Z wyjątkiem wniosku 2, który moim zdaniem powinien zawierać informację o badanym obszarze, wniosku 3 w którym dodałbym słowo prawdopodobnie (...powstała prawdopodobnie przez ekspansję...) i wniosków 7 oraz 8, które połączyłbym w jeden, zostały one poprawnie sformułowane, mają uzasadnienie w recenzowanej pracy. We wnioskach Autorka potwierdza skuteczność markerów SNP w badaniach biogeograficznych omułek i ocenie pochodzenia produktów żywnościowych omułek. Dzięki markerom SNP możliwe było wyróżnienie w niniejszej pracy 4 grup populacji *M. galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym, potwierdzenie występowania atlantyckiej formy tego taksonu u wybrzeży Afryki Południowej i dalsze wnioskowanie o ewolucji i drodze kolonizacji omułek. Warto w przyszłości rozwinąć ten ogólny wątek i podjąć bardziej szczegółowe badania funkcjonalne nad dostosowaniem, adaptacją omułek wybranych taksonów, takich jak ORA1 i ORA4, z zastosowaniem wysoko przepustowych analiz molekularnych (RNAseq, peptydomika, metabolomika). Takie zintegrowane badania pomogłyby wypełnić lukę w naszej wiedzy o mechanizmach leżących u podstaw utrzymania zróżnicowania genetycznego ich populacji.

### Uwagi krytyczne

W trakcie recenzji pracy nasunęły się następujące pytania:

1. Dlaczego nie przedstawiono hipotez badawczych, które Autorka mogłaby zweryfikować, dysponując dostępem do tak bogatego materiału?
2. Jakie były kryteria wyboru lokalizacji miejsc poboru próbek omułek?
3. Kto wykonywał prace laboratoryjne (izolacja DNA)?
4. Na Rys. 18 pokazano tylko jedną wartość Bootstrap (KBR-BID). Czy to oznacza, że w pozostałych węzłach drzewa losowo wygenerowane sekwencje uzyskały wartość <50?
5. Kariera jaką przeszły SNP-y w genetyce i hodowli zwierząt pokazuje, jak osiągnięcia technologiczne (mikromacierze) i odkrycia poznawcze (sekwencjonowanie genomu), umiejętnie połączone, mogą prowadzić do rewolucyjnej zmiany w całej hodowli, poprawiając wydajność cech użytkowych. Czy także w hodowli omułek?

## Ocena końcowa

Pani mgr Anna Prądzińska wykazała się dużą wiedzą w dyscyplinie nauki o Ziemi i środowisku, o czym świadczą wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej. Doktorantka zrealizowała wszystkie cele, zastosowane metody dowodzą dobrego opanowania przez Doktorantkę trudnego warsztatu badawczego, a uzyskane wyniki wnoszą szereg nowych informacji dotyczących biogeografii omułków. Wyniki są oryginalne, a praca ma wyraźny aspekt aplikacyjny. Zamieszczone w recenzji uwagi nie umniejszają wartości przedstawionej do oceny rozprawy.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska wykonana przez Panią mgr Annę Prądzińską w ramach programu Doktorat wdrożeniowy, spełnia w mojej opinii warunki stawiane rozprawom doktorskim w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki o Ziemi i środowisku przez obowiązujące przepisy określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021r., poz. 478 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Paweł Brzuzan



UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI  
W OLSZTYNIE  
WYDZIAŁ GEOINŻYNIERII  
INSTYTUT INŻYNIERII I OCHRONY ŚRODOWISKA  
Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska  
10-709 Olsztyn, ul. Słoneczna 46g  
tel./fax 89 523 41 31