



INSTYTUT RYBACTWA  
ŚRÓDLĄDOWEGO  
IM. STANISŁAWA SAKOWICZA  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

NATIONAL INLAND  
FISHERIES  
RESEARCH INSTITUTE

Gdańsk 22.02.2023

dr hab. inż. Rafał Bernaś  
Zakład Ryb Wędrownych  
Rutki 49, 83-330 Żukowo

INSTYTUT RYBACTWA ŚRÓDLĄDOWEGO  
*im. Stanisława Sakowicza*  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY  
Zakład Ryb Wędrownych  
83-330 Żukowo  
tel. 58 681 84 27 NIP 739-020-20-79

## Recenzja

### Rozprawy doktorskiej mgr Anny Prądzińskiej

**pt. „Biogeografia omułek *Mytilus* i identyfikacja pochodzenia geograficznego ich produktów żywnościowych z zastosowaniem metod genetycznych (analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów)”**

Przedstawiona mi do recenzji praca została wykonana w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie w Zakładzie Genetyki i Biotechnologii Morskiej i Pracowni Genetyki Organizmów Morskich pod kierunkiem prof. dr hab. Romana Wenne oraz dr Ryszarda Frankowskiego jako promotora pomocniczego. Praca powstała w ramach stypendium w programie „Doktorat Wdrożeniowy” Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Zespół pracowników Zakładu Genetyki i Biotechnologii Morskiej od ponad 20 lat prowadzi badania poświęcone genetyce i genomice omułek z obszaru całego świata, czego wyrazem jest kilkadziesiąt publikacji naukowych w uznanych międzynarodowych czasopismach i wiele istotnych osiągnięć badawczych. Jednym z nich jest szereg prac poświęconych badaniom z zakresu genetyki populacyjnej i taksonomii omułek w skali światowej. Niniejsza praca jest kontynuacją i uzupełnieniem tych prac o trzy zagadnienia badawcze: (1) zróżnicowanie genetyczne populacji omułka z obszaru Morza Śródziemnego i Morza Czarnego, (2) zróżnicowanie genetyczne populacji z wód przybrzeżnych południowej Afryki oraz trzecie, poświęcone analizie pochodzenia prób żywnościowych zawierających omułki (3). Pierwsze i trzecie zagadnienie przedstawione w pracy stanowi zbiór opublikowanych w 2022 roku prac. Z racji tego, że zostały już one zrecenzowane, omówione zostaną tylko skrótowo. W ramach recenzji, najpierw omówiona zostanie struktura pracy, a następnie kolejno zagadnienia badawcze, których podjęła się doktorantka.

Praca jest napisana po polsku i liczy 135 stron. Składa się ze streszczenia, abstraktu w języku angielskim, wstępu, celów badań, metod, wyników, dyskusji, wniosków i spisu literatury. Układ pracy nie budzi moich zastrzeżeń. Dobrze, że w pracy znalazł się wykaz skrótów, choć mógłby być dłuższy. Język jest zwięzły, a w kilku miejscach, zwłaszcza w opisach metodyki i wyników, styl jest dość trudny do czytania. Zapewne wynika to ze wstecznego tłumaczenia z angielskiego na polski. Ogólnie też, niektóre tłumaczenia angielskich terminów mogłyby być bardziej trafne. Streszczenie i Abstract są dobrze napisane i oddają esencję pracy. Wstęp, bardzo dobrze napisany, w przejrzysty sposób wprowadza w zagadnienia związane z biologią, ekologią i genetyką omułków i stanowi dobre „state-of-the-art” dla pracy. Cele badań są sformułowane prawidłowo. Rozdział Materiał i Metody w mojej opinii ma jednak swoje wady, a opisy metod są nieco zbyt lakoniczne. Jako przykłady mogę podać brak dokładnego opisu identyfikacji loci outlierowych czy identyfikacji liczby K w analizie STRUCTURE. Brakuje też opisu obliczeń testów przyporządkowania (assignment test), które umieszczono w Tabeli 9 (GeneClass). Żadna z cytowanych w sekcji Materiał i Metody prac nie znalazła się też w spisie literatury. Rozdział Wyniki jest podzielony na trzy części, przedstawiając wyniki kolejnych zagadnień badawczych (1-3). Dyskusja jest dość syntetyczna i rozpoczyna się wprowadzeniem ogólnym, by następnie przejść do omówienia trzech kolejnych zagadnień badawczych. Rozumiem takie podejście, ale brakuje mi tutaj przeplatania się wątków prac i przede wszystkim zbiorczej konkluzji. Praca kończy się ośmioma Wnioskami, które są dobrze sformułowane. Literatura została dobrana prawidłowo i zawiera 168 pozycji. W pracy umieszczono 26 rysunków, z czego większość jest dobrze przedstawiona, choć w niektórych przypadkach mogłyby być wyższej jakości (CA i drzewa zależności genetycznych). Opisy rysunków w większości też są prawidłowe. W pracy znajduje się też 11 tabel, z czego zastrzeżenia mam do Tabeli 9, gdzie zauważyłem brak opisu testów przyporządkowania, ale przede wszystkim do Tabeli 11, która w założeniu miała prezentować macierz współczynnika zmienności  $F_{ST}$  dla par populacji. Tabela ta jest jednak zupełnie nieczytelna przez nieprawidłowy format i błędny podział na strony. Można było zaprezentować te wyniki w ładny i czytelny sposób w postaci np. „heat map”, co znacznie ułatwiłoby interpretacje wykonanych analiz. Doktorantka nie ustrzegła się błędów edytorskich, z czego większość dotyczy braku reżimu pisania nazw gatunkowych czy rodzajowych kursywą (29), niespójnego systemu cytowania lub braku cytowań (23). Niespójności występują też w nazewnictwie, np. angielski termin STRUCTURE niekiedy jest spolszczony. Do pracy dołączono płytę kompaktową, na której znajdowała się praca w wersji pdf. Szkoda, że nie udostępniono też surowych danych lub plików wsadowych tak, aby można było prześledzić ścieżkę bioinformatyczną.

Przechodząc do zagadnień badawczych, pierwsze z nich (1) zostało opublikowane w czasopiśmie - The European Zoological Journal (140 pkt, IF=1,69) - Wenne, R., Zbawicka, M.,



**Prądzińska, A.**, Kotta, J., Herkül, K., Gardner, J.P.A., Apostolidis, A.P., Poćwierz-Kotus, A., Rouane-Hacene, O., Korrida, A., Dondero, F., Baptista, M., Reizopoulou, S., Hammer, B., Sundaasen, K.K., Árnýasi M., Kent M.P., 2022 „Molecular genetic differentiation of native populations of Mediterranean blue mussels, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819), and the relationship with environmental variables”. Doktorantka była w tej pracy trzecim autorem i jak wynika z przedstawionej pracy jej udział polegał na zbadaniu zróżnicowania genetycznego populacji *M. galloprovincialis* z obszaru Morza Śródziemnego, Czarnego i Azowskiego przy użyciu polimorfizmów 53 pojedynczych nukleotydów SNP. Omułki, zebrane z 36 lokalizacji genotypowano i przeanalizowano z użyciem 11 populacji referencyjnych. Analizy ujawniły cztery grupy populacyjne: Ocean Atlantycki; zachodnia część Morza Śródziemnego; Morze Egejskie; oraz Morze Azowskie, Czarne i Marmara. Jedna populacja – z Algierii (Oran West) – była pośrednia między dwiema głównymi grupami Morza Śródziemnego i Oceanu Atlantyckiego.

Drugie zagadnienie (2) poświęcone polimorfizmowi genetycznemu populacji *M. galloprovincialis* z wybrzeży Południowej Afryki jest niepublikowaną jeszcze częścią rozprawy. Przeanalizowano tutaj 6 populacji/lokalizacji z obszaru południowo-zachodniego i południowo-wschodniego wybrzeża Afryki na styku oceanów Atlantyckiego i Indyjskiego, w sumie 500 osobników próbkowanych w 2012 roku. Uzyskane matryce DNA genotypowano z użyciem panelu 55 loci SNP na platformie Sequenom. Zaobserwowano, że liczba polimorficznych loci w afrykańskich populacjach wahała się pomiędzy 45% a 55%, a heterozygotyczność obserwowana była wyższa od oczekiwanej. Stwierdzono też istotne odchylenia populacyjnego współczynnika inbredu. Analizując zróżnicowanie badanych populacji między sobą i próbami referencyjnymi doktorantka zaobserwowała na podstawie analizy NJ, że populacje referencyjne *M. trossulus* z Ameryki Północnej, *M. platensis* i *M. chilensis* z Ameryki Południowej oraz *M. planulatus* z Nowej Zelandii tworzą odrębny mocny klaster. Natomiast populacje *M. galloprovincialis* z Północnego Atlantyku pogrupowały się razem z próbami z Południowego Atlantyku i Oceanu Indyjskiego, co w opinii doktorantki świadczy o ich małym zróżnicowaniu genetycznym. Analizując wyniki NJ, ciekawy jest fakt, że brak tutaj korelacji pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym i lokalizacją geograficzną (np. populacja z Zatoki Biskajskiej zgrupowała się z populacjami sięgającymi Oceanu Indyjskiego (KBR, CFR). W tym miejscu dobrze byłoby wykonać również np. Mantel test, co lepiej wytłumaczyłoby, na ile jest to istotne. Przechodząc do zaprezentowanej przez doktorantkę analizy korespondencji, jest ona zgodna w mojej ocenie z analizą *neighbour joining* (NJ) i metoda ta również potwierdza brak korelacji genetycznej i geograficznej. Z kolei w analizie STRUCTURE, wykonanej dla 17 lokalizacji (6 nowych i 11 referencyjnych), wykazano, że najwyższa wartość  $\Delta K$  występuje dla  $K=2$ , a następnie  $K=3$  i  $K=4$ . Szkoda, że w pracy nie podano wartości  $\Delta K$  (lub wykresów), co znacznie ułatwia interpretację wyników analizy STRUCTURE. Ogólnie jednak na

podstawie interpretacji wyników, można stwierdzić ich zgodność z NJ i analizą korespondencji. Mam jednak uwagi do precyzji opisu analizy  $K=4$ . Pierwszą kwestię stanowi fakt, że doktorantka pisze, że był on najistotniejszy, co nie jest prawdą, ponieważ najwyższe  $K$  było równe 2, a jako metodę interpretacji przyjęto metodę Evanno. Rozumiem, że chodziło o to, że  $K=4$  najlepiej rozdzielał próby, zgodnie z logiką i biorąc pod uwagę niskie wartości  $F_{ST}$ , które zawsze faworyzują  $K=2$ . Jednakże podany opis wskazuje, że mamy do czynienia z  $K=2$ , a nie  $K=4$ . Raczej trzeba było napisać, że *M. trossulus*, *M. planulatus* i *M. galloprovincialis* utworzyły osobne klastry, co zresztą świetnie widać na Rysunku 21. Co jest dla mnie interesujące, STRUCTURE ujawniło również, że w populacji z rejonu ujścia Loary (LOI) widać znaczną domieszkę genotypów *M. galloprovincialis* podobnie jak w chilijskiej CHT, gdzie jeszcze dodatkowo występują genotypy charakterystyczne dla *M. planulatus*.

Trzecie zagadnienie badawcze niniejszej pracy doktorskiej (3), zostało opublikowane w uznanym czasopiśmie - Aquaculture (140 pkt, IF=5,1) – Wenne, R., **Prądzińska, A.**, Poćwierz-Kotus, A., Larraín, M.A., Araneda, C., Zbawicka, M., 2022 „Provenance of *Mytilus* food products in Europe using SNP genetic markers” i stanowi dobry przykład połączenia badań podstawowych i aplikacyjnych. Doktorantka była w tej pracy drugim autorem. Celem pracy była weryfikacja informacji o gatunku i pochodzeniu produktów żywnościowych zawierających omułki. W pracy zbadano 21 prób zebranych w sklepach europejskich w latach 2011-2015. W sumie było to 491 omułek. Jako metodę identyfikacji gatunkowej zastosowano panel 54 loci SNP i genotypowanie Sequenom. Większość deklarowanych informacji na etykietach produktów spożywczych była zgodna z wynikami uzyskanymi narzędziami genetycznymi (85%). Jednak w 11 próbkach znaleziono niepełne informacje, takie jak brak oznaczenia handlowego, nazwy naukowej lub pochodzenia geograficznego. Wyniki wskazują na podział europejskich prób żywności na dwa gatunki: *M. edulis* i *M. galloprovincialis* (formy atlantycka i śródziemnomorska). W próbkach żywności nie stwierdzono obecności *M. trossulus*. W mojej opinii jest to wartościowa i potrzebna praca, dająca gotowe narzędzie do identyfikacji pochodzenia omułek.

W tym miejscu chciałbym przedstawić kilka pytań do doktorantki, które mam nadzieję, pozwolą jej wykazać się znajomością tematu i może jeszcze przybliżą osiągnięcia tej pracy, a być może będą wstępem do dyskusji:

- Czy i jak data poboru prób do baz referencyjnych ma wpływ na uzyskane wyniki i jakie Pani zdaniem jest ryzyko popełnienia błędu w trakcie poboru prób omułek z naturalnego środowiska?
- Czy zastosowanie neutralnych markerów genetycznych np. mikrosatelitarnego DNA, ujawnia takie same poziomy zróżnicowania w populacjach *M. galloprovincialis* ?



- Dlaczego populacje z południowo-wschodniego wybrzeża Afryki grupują się np. z próbami z Zatoki Biskajskiej i skąd ten ogólny brak korelacji pomiędzy zmiennością genetyczną a odległością geograficzną u *M. galloprovincialis*?
- Jakie konsekwencje dla rozmieszczenia omułków w oceanie światowym mogą mieć zmiany klimatyczne, które obecnie obserwujemy?

Podsumowując, wymienione powyżej uwagi nie wpływają znacząco na wartość merytoryczną pracy, zwłaszcza że dwa z trzech badanych zagadnień zostało już opublikowane w renomowanych czasopismach. Badania przedstawione w ramach niniejszej pracy doktorskiej stanowią wartościowe i znaczne uzupełnienie wiedzy z zakresu biogeografii omułków w szerokiej skali, a zaproponowana metoda identyfikacji gatunkowej omułków w produktach żywnościowych może być wykorzystywana w praktyce. W tym miejscu chciałbym również zwrócić uwagę, że doktorantka nie jest na co dzień pracownikiem naukowym i nie pracuje w jednostce naukowej. Dlatego też, trzeba tym bardziej docenić chęć rozwoju i nauki niełatwych nieraz zagadnień zwłaszcza z obszaru bioinformatyki.

Po zapoznaniu się z pracą stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Anny Prądzińskiej odpowiada ustawowo określonym warunkom stawianym rozprawom doktorskim. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie o przyjęcie ocenionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

**KIEROWNIK ZAKŁADU**  
  
dr hab. inż. Rafał Bernaś