

INSTYTUT OCEANOLOGII  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK



ANNA PRĄDZIŃSKA

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

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem promotora  
Prof. dr hab. Romana Wenne  
w Instytucie Oceanologii Polskiej Akademii Nauk  
oraz promotora pomocniczego dr Ryszarda Frankowskiego  
w Szkole Podstawowej nr 85 w Gdańsku

Sopot, 2022

INSTITUTE OF OCEANOLOGY  
POLISH ACADEMY OF SCIENCES



ANNA PRĄDZIŃSKA

**Biogeography of *Mytilus* mussels and identification of the geographical origin  
of their food products using genetic methods  
(analysis of single nucleotide polymorphisms)**

Doctoral dissertation carried out under the supervisor  
Prof. dr hab. Roman Wenne  
in Institute of Oceanology Polish Academy of Sciences  
and assistant supervisor dr Ryszard Frankowski  
in Primary School No. 85 in Gdańsk

Sopot, 2022

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi*

***Panu prof. dr hab. Romanowi Wenne,***

*za zaangażowanie, poświęcony czas, wartościowe uwagi,  
życzliwość i motywację w trakcie powstawania tej pracy.*

*Pragnę wyrazić swoją wdzięczność*

***Pani dr hab. Małgorzacie Zbawickiej,***

*za cierpliwość, pomoc i okazałą życzliwość  
w przygotowaniu niniejszej pracy.*

**Rodzicom i Dziadkom**

## Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	8
1. Streszczenie .....	9
2. Abstract.....	11
3. Wstęp .....	13
3.1 Wprowadzenie.....	13
3.2 Charakterystyka rodzaju <i>Mytilus</i> .....	15
3.2.1 Pozycja systematyczna .....	15
3.2.2 Markery SNP w badaniach omułków.....	17
3.2.3 Charakterystyka biologiczna gatunków rodzaju <i>Mytilus</i> .....	18
3.3 Ekologia <i>Mytilus</i> .....	21
3.3.1 Strefy hybrydyzacji <i>Mytilus</i> .....	22
3.3.2 Hodowla omułków <i>Mytilus</i> .....	24
3.4 Rozmieszczenie gatunków rodzaju <i>Mytilus</i> w Oceanie Światowym.....	26
3.5 Morze Śródziemne i ewolucja <i>M. galloprovincialis</i> .....	29
3.5.1 Historia Morza Śródziemnego.....	29
3.5.2 Pochodzenie <i>Mytilus</i> w Północnym Atlantyku i ewolucja <i>M. galloprovincialis</i> .....	30
3.5.3 Rozmieszczenie współczesnych populacji <i>M. galloprovincialis</i> .....	31
4. Cele badań.....	32
5. Materiał i metody.....	33
5.1 Analiza bioinformatyczna .....	33
5.1.1 Różnorodność genetyczna .....	33
5.1.2 Zróżnicowanie genetyczne i struktura populacji .....	34
6. Wyniki .....	35
6.1 Zróżnicowanie genetyczne populacji <i>M. galloprovincialis</i> w przybrzeżnych wodach Morza Śródziemnego i Czarnego .....	35
6.1.1 Materiał badawczy.....	35
6.1.2 Walidacja SNP i równowaga Hardy'ego-Weinberga .....	40
6.1.3 Wykrywanie odstających i wysoce informatywnych SNP.....	46

6.1.4	Różnorodność genetyczna .....	48
6.1.5	Zróźnicowanie populacji .....	53
6.1.6	Struktura populacji .....	60
6.2	Polimorfizm genetyczny populacji <i>M. galloprovincialis</i> z wybrzeży Południowej Afryki .....	61
6.2.1	Materiał.....	61
6.2.1	Charakterystyka SNP.....	64
6.2.2	Różnorodność genetyczna .....	69
6.2.3	Zróźnicowanie populacji .....	72
6.2.4	Struktura populacji .....	73
6.3	Analiza taksonomiczna i pochodzenia geograficznego prób żywnościowych zawierających omułki <i>Mytilus</i> dostępnych w Europie.....	77
6.3.1	Charakterystyka badanych prób .....	77
6.3.2	Identyfikacja taksonów <i>Mytilus</i> .....	83
7.	Dyskusja.....	96
7.1	Zróźnicowanie genetyczne <i>Mytilus galloprovincialis</i> rodzimych populacji z Morza Śródziemnego .....	97
7.2	Polimorfizm genetyczny inwazyjnych populacji <i>M. galloprovincialis</i> u wybrzeży południowej Afryki .....	101
7.3	Identyfikacja pochodzenia geograficznego oraz przynależności taksonomicznej prób żywnościowych omułek <i>Mytilus</i> .....	103
8.	Wnioski.....	106
9.	Literatura.....	107

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:

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., Hamer, B., Sundsaasen, 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. *The European Zoological Journal*. 89, 755-784.

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. *Aquaculture*. 554, 738135.

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

**AMOVA**- (ang. analysis of molecular variance) analiza molekularnej wariacji

**CA**- (ang. correspondence analysis) analiza korespondencji

**HWE**- (ang. Hardy- Weinberg equilibrium) równowaga Hardy'ego-Weinberga

**MAF**- (ang. minor allele frequency) frekwencja rzadszego allelu

**MCMC**- (ang. Markov chain Monte Carlo) metoda Monte Carlo z wykorzystaniem łańcuchów Markowa

**mtDNA**- (ang. mitochondrial DNA) DNA mitochondrialny

**NJ**- (ang. neighbour joining) metoda przyłączenia najbliższego sąsiada

**PAR**- (ang. photosynthetically active radiation) promieniowanie fotosyntetycznie czynne

**PCR**- (ang. polymerase chain reaction) reakcja łańcuchowa polimerazy

**pz**- par zasad

**SNP**- (ang. single nucleotide polymorphism) polimorfizm pojedynczego nukleotydu



## 1. Streszczenie

Omułki *Mytilus* charakteryzują się bipolarnym (antytropikalnym) rozmieszczeniem geograficznym i są uznawane za inżynierów morskich ekosystemów przybrzeżnych. Naturalne rozmieszczenie gatunków *Mytilus* uzależnione jest od wielu czynników, np. rodzaju podłoża, obecności fitoplanktonu i układu prądów morskich. Omułki mają duże znaczenie konsumpcyjne, dlatego ich hodowle rozpowszechnione są na całym świecie. Introdukowanie omułków doprowadziło do wymieszania populacji w różnych rejonach ich występowania. Najbardziej ekspansywnym gatunkiem omułków jest *M. galloprovincialis*. Podobieństwo morfologiczne gatunków omułków było częstą przyczyną błędnego identyfikowania przynależności gatunkowej oraz pochodzenia geograficznego, co uzasadniało skonstruowanie diagnostycznych markerów molekularnych. Najbardziej precyzyjną identyfikację taksonów umożliwiło opracowanie zestawu loci SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu). W niniejszej pracy po raz pierwszy zbadano zróżnicowanie genetyczne natywnych populacji *M. galloprovincialis* z całego ich zasięgu geograficznego. Po raz pierwszy zastosowano genotypowanie SNP do określenia zmienności genetycznej introdukowanego *M. galloprovincialis* w Afryce Południowej. Również po raz pierwszy zastosowano genotypowanie SNP do weryfikacji taksonomicznej produktów żywnościowych zawierającej *Mytilus* oferowanych w Europie.

W badaniach zastosowano analizę polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) dla zestawu 53 loci do zbadania zróżnicowania genetycznego naturalnych populacji *Mytilus galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym i w akwenach do niego przyległych. Wartości wskaźnika zróżnicowania populacji  $F_{ST}$ , analiza korespondencji (CA) i analiza STRUCTURE wykazały istnienie czterech grup populacji *M. galloprovincialis*: populacje reprezentujące formę Atlantycką, populacje w zachodniej części Morza Śródziemnego, populacje z Morza Egejskiego oraz z Morza Marmara, Czarnego i Azowskiego. Populacja *M. galloprovincialis* w Morzu Czarnym reprezentuje podpróbe genotypów z Morza Śródziemnego i powstała najprawdopodobniej przez ekspansję populacji ze wschodniej części Morza Śródziemnego. Współczesne naturalne bariery środowiskowe takie jak układy prądów morskich (np. w rejonie Almeria-Oran) czy gradient zasolenia (na wschód od Dardaneli w Morzu Marmara) sprzyjają

utrzymywaniu się zróżnicowania genetycznego populacji naturalnych *M. galloprovincialis*. Populacje *M. galloprovincialis* wewnątrz Morza Śródziemnego należy uznać za słabo zróżnicowane w zestawieniu ze zróżnicowaną historią poszczególnych basenów, co może być spowodowane przyczynami naturalnymi jak i działalnością człowieka. Nie wykazano zmniejszonego polimorfizmu genetycznego oraz zróżnicowania geograficznego introdukowanych populacji atlantyckiej formy *M. galloprovincialis* z warunków naturalnych i hodowlanych na wybrzeżach Oceanu Atlantyckiego i Indyjskiego Afryki Południowej w porównaniu z populacjami natywnymi.

Zbadano 21 prób żywności, z których pobrano z 491 osobników *Mytilus*. Zidentyfikowano 3 taksony: *M. galloprovincialis*, *M. edulis* i *M. chilensis*. Przeprowadzone badania genetyczne potwierdziły, że większość informacji dotyczących pochodzenia zadeklarowanego na etykietach była poprawna, z kilkoma wyjątkami. Trzy próby omułków pochodzące z okolic ujścia rzeki Ebro w Hiszpanii deklarowane przez sprzedawców jako *M. galloprovincialis*, w wyniku analiz okazały się należeć do *M. edulis*. Ponadto, jedna próba z Włoch oznakowana, jako pochodząca z Morza Śródziemnego była najbardziej podobna do atlantyckiego *M. galloprovincialis*. Uzyskane wyniki badań wykazują, że analiza SNP umożliwia ocenę zgodności informacji dotyczących taksonu i pochodzenia geograficznego znajdujących się na etykietach informacyjnych umieszczanych na produktach żywnościowych *Mytilus*. Weryfikacja danych na etykietach produktów żywnościowych przez zastosowanie analizy SNP umożliwia monitorowanie handlu omułkami na terenie Europy.

## 2. Abstract

Blue mussels *Mytilus* are characterized by their bipolar (antitropical) distribution and are considered engineers of coastal sea environments. The natural distribution of the *Mytilus* species depends on many factors such as the type of seabed, the occurrence of phytoplankton and the system of sea currents. Blue mussels are important food source for human and their farms can be found worldwide. Their introduction to new ecosystems have led to mixing of native populations. The most invasive *Mytilus* species is *M. galloprovincialis*. Morphological similarities of blue mussel species have caused mistakes in their identification and identification of their geographical origin, what therefore justified the development of diagnostic molecular markers. The most precise method of taxon's identification was allowed by the development of a set of SNP (single nucleotide polymorphisms). This dissertation is the first study of the genetic variation of native populations of *M. galloprovincialis* throughout its whole geographical range. SNP genotyping was implemented for the first time in order to determine the genetic polymorphism of *M. galloprovincialis* that was introduced in South Africa. Furthermore, SNP genotyping was also used for the first time to verify *Mytilus* taxa in European seafood products.

The study involved the analysis of the SNP for a set of 53 loci to investigate the genetic differentiation of the natural populations of *Mytilus galloprovincialis* in The Mediterranean Sea and adjoining seas. The population differentiation ratio  $F_{ST}$ , the correspondence analysis (CA) and STRUCTURE analysis have revealed the existence of four *M. galloprovincialis* population groups: the Atlantic population, the West Mediterranean population, the Aegean population and the Black, Azov and Marmara Sea population. The Black Sea *M. galloprovincialis* population represents a subgroup of the Mediterranean population and is thought to be created by expansion of the East Mediterranean population. Contemporary environmental barriers such as sea currents system (e.g. Almeria-Oran region) or salinity gradient (east of the Dardanelles in Marmara Sea) influence the genetic diversity of the natural *M. galloprovincialis* populations. The *M. galloprovincialis* populations in the Mediterranean Sea are considered less differentiated in comparison to other seas. This fact might be caused by natural factors and human interference. Lower genetic polymorphism and geographical diversity was not discovered among the introduced Atlantic *M. galloprovincialis* natural

and farmed populations on the coasts of the Atlantic Ocean and the South African coast of The Indian Oceans.

Twenty one seafood samples were analyzed, of which 491 *Mytilus* specimens were collected. Three taxa were identified: *M. galloprovincialis*, *M. edulis* and *M. chilensis*. The genetic research confirmed that most of the data and information about the food's origin on the labels were correct with a few exceptions. Three batches of blue mussels from the Ebro river's estuary were declared as *M. galloprovincialis* but it was concluded from the genetic analysis that they were in fact *M. edulis*. In addition, batch from Italy labeled as Mediterranean was very similar to Atlantic *M. galloprovincialis*. Research results indicated that SNP analysis enables evaluation of the label information declared on the sea food containing *Mytilus*. Verification of data on food labels by using SNP analysis enables to monitor the trade of mussels in Europe.

### 3. Wstęp

#### 3.1 Wprowadzenie

Zmiany klimatyczne wywierają wpływ na rozmieszczenie różnorodności biologicznej na kuli ziemskiej. W ostatnich dekadach obserwuje się zmiany zasięgów występowania wielu gatunków. Historyczne procesy ewolucyjne, jak migracja gatunków, kolonizacja nowych rejonów czy powstawanie naturalnych barier, w połączeniu ze zmianami środowiska, wpływają na populacje i gatunki (Holyoak i in., 2005). Pula genowa występująca w lokalnych populacjach jest punktem odniesienia do obserwacji zakresu zmienności, natomiast wpływ warunków środowiskowych oprócz procesów genetycznych jest kluczowym czynnikiem kształtującym populację (Teske i in., 2019). Modyfikacje barier geologicznych odbywały się wielokrotnie na przestrzeni czasu. Ewolucja geologiczna sprzyja specjacji, ponieważ bariery mogą ograniczać zasięg gatunku a zmiany zachodzą szybciej w izolowanych populacjach (Gérard i in., 2008; Álvarez-Varas i in., 2019). Małże to organizmy morskie i słodkowodne prowadzące głównie osiadły tryb życia, posiadają jednak zdolność do przemieszczania się m.in. w fazie larwalnej z prądami morskimi lub z gatunkami ryb, na których niektóre z nich pasożytują. Gatunki z rodzaju *Mytilus* są silnie rozprzestrzenione w rejonach przybrzeżnych półkuli północnej i południowej. Dla blisko spokrewnionych gatunków podobnych morfologicznie, które hybrydują w naturalnym środowisku, zmiany zachodzące w środowisku nie wywierają wpływu jedynie na ich przemieszczanie. „Niewielkie” przekształcenia polegające na zastąpieniu jednej formy genetycznej lub taksonu przez drugi oraz na przesunięciach stref hybrydyzacji mogą być wykryte jedynie metodami genetycznymi.

Analizy genetyczne umożliwiają badanie pochodzenia osobników i populacji oraz obserwowanie kierunku rozszerzania się zasięgu geograficznego gatunków. Populacje występujące lokalnie dostosowały się do zmian środowiska i charakteryzują się zróżnicowanym potencjałem reagowania na te zmiany (Pelini i in., 2010). Jednak nadal nie jest wiadome, czy struktura genetyczna populacji jest odzwierciedleniem zmienności środowiska lokalnego (De Wit i in., 2020).

Omułki jadalne *Mytilus* są szeroko rozpowszechnione we wszystkich przybrzeżnych obszarach morskich z wyjątkiem regionów tropikalnych i przybiegunowych (Hilbish i in., 2000; Gérard i in., 2008). Gatunki rodzaju *Mytilus*

licznie występują w wodach przybrzeżnych półkuli północnej do kilkudziesięciu metrów głębokości (Gosling, 1992a; Kijewski i in., 2011; Mathiesen i in., 2017). Omułki tworzą zespoły w strefie pływów oraz kolonie przydenne. Ławice omułków są miejscem żerowania wielu gatunków bezkręgowców i kręgowców związanych ze środowiskiem wodnym (Lintas i Seed, 1994; Seed, 1996; Blicher i in., 2013). W wodach morskich o typowym zasoleniu głębokość ich zasięgu jest zwykle ograniczana przez żerowanie drapieżników takich jak rozgwiazdy i kraby (Seed i Suchanek, 1992). W wodach o obniżonym zasoleniu, jak np. w Morzu Bałtyckim omułki zasiedlają dno do głębokości kilkudziesięciu metrów. Kluczową rolę w ochronie i zrównoważonej eksploatacji gatunków odgrywa identyfikacja taksonów, zwłaszcza blisko spokrewnionych i bliźniaczych (podobnych morfologicznie) (Mace, 2004; Seddon i in., 2005). Identyfikacja taksonu/gatunku *Mytilus* metodami genetycznymi i określenie pochodzenia populacji lub pojedynczych osobników jest istotna zarówno w ochronie gatunków natywnych, akwakulturze, jak i w przetwórstwie produktów konsumpcyjnych.

W celach konsumpcyjnych hodowle małży są prowadzone w wielu krajach, co świadczy o ich dużym znaczeniu gospodarczym (FAO, 2016; Ferreira i Bricker, 2016). Hodowle omułków w krajach Unii Europejskiej, Chinach i Chile (*Mytilus*) oraz Nowej Zelandii (*Perna*) stanowią 95% całej produkcji małży. Chile i Nowa Zelandia są głównymi dostawcami mrożonych małży do krajów europejskich, które stanowią surowiec przemysłu przetwórczego (ec.europa.eu). Omułki zostały również wprowadzone do multi-troficznych hodowli ryb, jako filtratory zmniejszające negatywne skutki oddziaływania hodowli na środowisko naturalne, np. w hodowli łososi w Kanadzie i Norwegii (Lander i in., 2013; Handå i in., 2012). Pośrednie znaczenie gospodarcze ma również hodowla omułków w celu przyspieszenia poprawy jakości wód, np. w Morzu Bałtyckim (Stadmark i Conley, 2011; Sokołowski i in. 2022).

Określenie rozmieszczenia gatunków rodzimych jest również istotne ze względu na bezpieczeństwo żywności, identyfikowalność i etykietowanie. Fałszowanie żywności jest rosnącym problemem, podobnie jak błędne oznakowanie, zastępowanie składników, czy manipulacje produktami (Wenne i in., 2022a). Bioinwazje morskie omułków są często wykrywane w rejonach, w których jest prowadzona akwakultura (Shaw i in., 2014; Gardner i in., 2016; Lins i in., 2021; Michalek i in., 2016). Ponadto, omułki rozszerzają swój zasięg geograficzny w kierunku biegunów, np. na Svalbardzie

(Berge i in., 2005; Kotwicki i in., 2021), arktycznej Alasce (Feder i in., 2003) i antarktycznych Szetlandach Południowych (Cardenas i in., 2020).

## 3.2 Charakterystyka rodzaju *Mytilus*

### 3.2.1 Pozycja systematyczna

Królestwo:	<i>Zoa</i>
Podkrólestwo:	<i>(Eu)metazoa</i>
Typ:	<i>Mollusca</i>
Gromada:	<i>Bivalvia</i>
Rząd:	<i>Mytiloida</i>
Rodzina:	<i>Mytilidae</i>
Rodzaj:	<i>Mytilus</i>
Gatunek:	<i>Mytilus edulis</i> (Linnaeus, 1758) <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarck, 1819) <i>Mytilus planulatus</i> (Lamarck, 1819) <i>Mytilus californianus</i> (Conrad, 1837) <i>Mytilus platensis</i> (d'Orbigny, 1842) <i>Mytilus trossulus</i> (Gould, 1850) <i>Mytilus chilensis</i> (Hupé, 1854) <i>Mytilus coruscus</i> (Gould, 1861) <i>Mytilus aoteanus</i> (Powell, 1958)

Zarówno w literaturze starszej, zawierającej historyczne opisy nowych dla nauki gatunków, jak i w literaturze nowszej, w tym dotyczącej paleontologii funkcjonuje ponad 100 nazw gatunkowych rodzaju *Mytilus*, z których większość jest zestawiona w World Register of Marine Species (WoRMS, marinespecies.org). Część tych nazw to nazwy synonimiczne (kilkakrotne opisy tzw. nowych gatunków sporządzane w tym samym czasie dla osobników różniących się morfologią muszli przez autorów historycznych lub w rzeczywistości tych samych gatunków opisanych przez różnych autorów w różnym czasie). Większość tych nazw gatunkowych została

zakwalifikowana do innych rodzajów. Nadal jednak wyjaśnienia wymagają wątpliwości dotyczące prawidłowej nazwy gatunkowej, czyli nazwy nadanej po raz pierwszy, np. dla *M. coruscus* z pacyficznych wybrzeży Azji lub statusu taksonomicznego *M. aoteanus* z Nowej Zelandii. Do wyjaśnienia tych wątpliwości może się przyczynić zastosowanie markerów genetycznych.

Klasyfikacja gatunkowa małży z rodzaju *Mytilus* z Północnej Półkuli początkowo opierała się na podobieństwach i różnicach cech morfologicznych. Na jej podstawie wyodrębniono trzy taksony: *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) oraz *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) (McDonald i in., 1991). W niektórych publikacjach dwa pierwsze taksony były określane jako „*M. edulis* species complex” (Gardner, 1996). W innych publikacjach te trzy taksony były łączone w tzw. kompleks gatunkowy *Mytilus edulis* spp. (Gosling, 1992a; 1992b; Śmietanka i in., 2014) lub *Mytilus edulis* „species group” (Hilbish i in., 2000), a następnie w uproszczeniu *Mytilus* „species complex” (Vendrami i in., 2020). Można jednak uznać, że powyższe określenia są stosowane niekonsekwentnie. Po pierwsze, autorzy cytowanych publikacji nie uwzględniają blisko spokrewnionych z *M. edulis* natywnych taksonów/gatunków z Ameryki Południowej oraz z *M. galloprovincialis* natywnych taksonów z Australii i Nowej Zelandii. Po drugie, w takiej nomenklaturze należałoby użyć trzy częściową nazwę obejmującą dwu częściową nazwę gatunkową oraz nazwę trzecią pod-gatunkową, np. *Mytilus edulis edulis* (*M. e. edulis*) czy *M. edulis galloprovincialis* (*M. e. galloprovincialis*), które są rzadko stosowane. Na podstawie wyłącznie cech morfologicznych, omułki z wybrzeży Atlantyku Ameryki Południowej podobne do *Mytilus edulis* zostały opisane jako *Mytilus platensis* (d'Orbigny, 1842) a z wybrzeży Pacyfiku, jako *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854). Jednak cechy morfologiczne nie są markerami diagnostycznymi i pozwalają jedynie na porównawcze różnicowanie statystyczne grup osobników bez ich jednoznacznego przyporządkowania do jednego, z co najmniej trzech badanych gatunków (McDonald i in., 1991; Gardner i Thompson, 2009; Gardner i Seed, 1992; Sarver i Foltz, 1993). W jednej z nowszych publikacji, Telesca i in. (2018) wprawdzie wykazali, że kształt muszli umożliwia odróżnienie dwóch gatunków: *M. edulis* i *M. trossulus* z Europy i Grenlandii z wysokim prawdopodobieństwem, to jednak autorzy nie uwzględnili trzeciego gatunku, tj. *M. galloprovincialis*. Opracowanie markerów genetycznych ułatwia określanie przynależności taksonomicznej omułek. Analizy zależności filogenetycznych dla



różnych rejonów genomów, z wykorzystaniem różnorodnych typów markerów dostarczają zróżnicowanych wyników, np. mtDNA (COI, ND2-COIII, rDNA), markery dla wybranych rejonów kodujących DNA jądrowego reprezentujących pojedyncze loci (np. ME 15-16, M7 dla *Mytilus*), mirosatelitarny DNA oraz SNP reprezentujących większą liczbę loci.

### 3.2.2 Markery SNP w badaniach omułków

Najszybciej rozwijającą się grupą markerów genetycznych są markery typu SNP (Helyar i in., 2011). Stanowią one najczęściej występującą formę zmienności genetycznej, która polega na punktowej zamianie zasady azotowej w sekwencji DNA, przez którą dochodzi do powstania dwóch lub więcej wersji allelu występującego w populacji. Odróżniając polimorfizm od mutacji należy pamiętać, że polimorfizm wyznacza rzadszy allel, który występuje w populacji z częstością większą niż 1%. Cechą charakterystyczną markerów SNP jest ich występowanie w rejonach kodujących i niekodujących (Brumfield i in., 2003) oraz bialleliczność, czyli mogą występować tylko w postaci dwóch alleli np. C lub G w konkretnym locus (Morin i in., 2004). W analizach historycznych prób DNA wykorzystuje się markery SNP ze względu na ich aplikacyjność i prosty model mutacji. SNP wykazują niski wskaźnik mutacji ( $10^{-8}$  do  $10^{-9}$ ) w porównaniu z mikrosatelitami ( $10^{-4}$ ). Używanie tego typu markerów redukuje problemy dotyczące standaryzacji między laboratoriami, które występują w przypadku używania mikrosatelitów. Stosowanie mikrosatelitów pozwala jednak na osiągnięcie wyższej rozdzielczości diagnostycznej niż SNP. W celu otrzymania podobnej siły analitycznej zaleca się stosowanie zwiększonej liczby markerów SNP. Aktualne badania pozwalają na prowadzenie wielkoskalowych analiz genomu, gdyż opracowane zostały wysokoprzepustowe technologie genotypowania. Markery SNP są stosowane w badaniach ekologicznych (Vignal i in., 2002), które wykazały wysoką użyteczność przy różnicowaniu osobników (Pariset i in., 2009), populacji (Moen i in., 2008) oraz gatunków (Williams i in., 2010). Opracowanie nowszych generacji markerów oraz użycie rozszerzonych zestawów pobieranych prób do badań, w tym prób referencyjnych umożliwiają bardziej precyzyjną identyfikację taksonów *Mytilus* oraz opracowanie metody określania pochodzenia poszczególnych osobników (Larraín i in., 2018; Wenne, 2018; Wenne i in., 2022a). Markery SNP są również przydatnym narzędziem w badaniu

populacji małży z kompleksu *Mytilus edulis* i ich hybryd występujących w Europie (Zbawicka i in., 2012).

### **3.2.3 Charakterystyka biologiczna gatunków rodzaju *Mytilus***

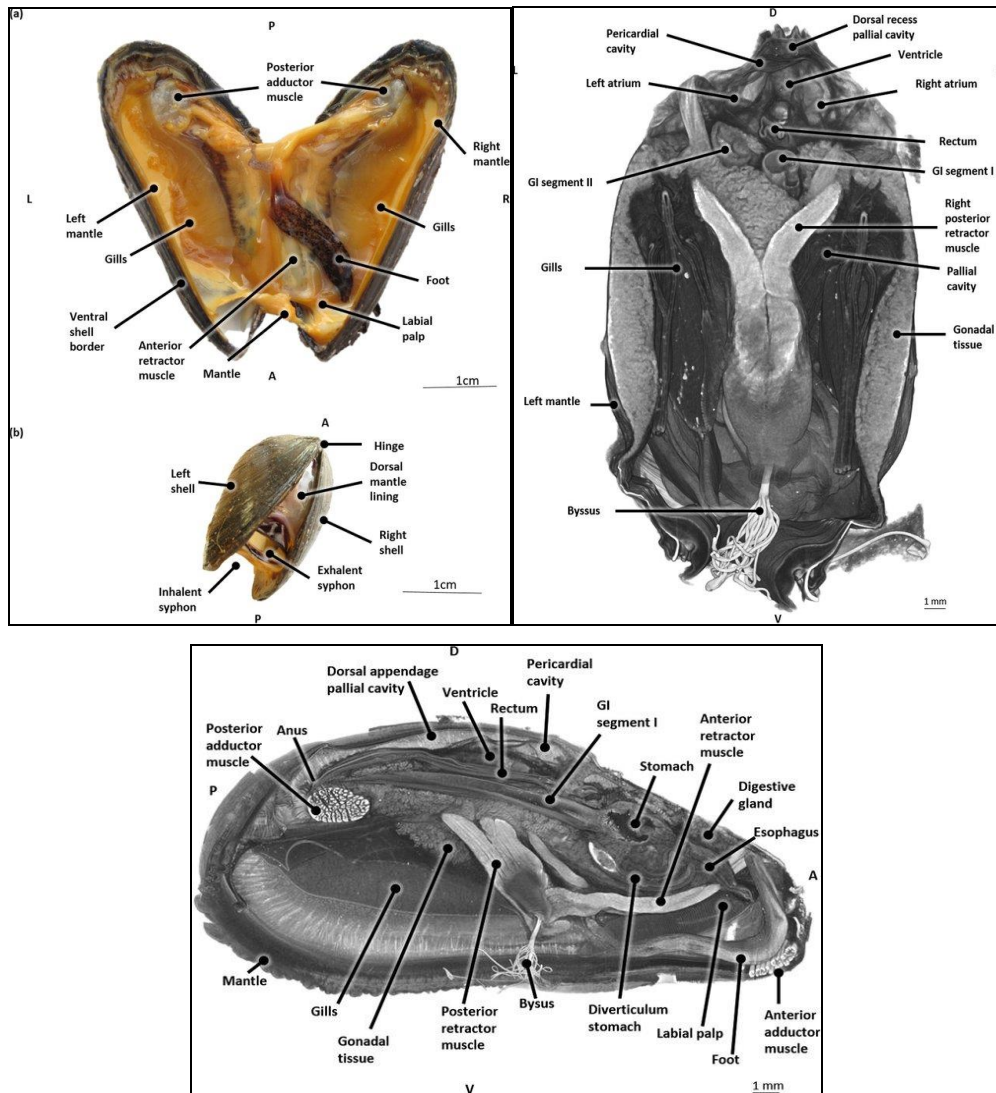
Gatunki z rodzaju *Mytilus*, na przestrzeni wielu lat stały się przedmiotem intensywnych badań genetycznych ze względu na ich znaczenie ekologiczne i komercyjne. Omułki prowadzą osiadły tryb życia zasiedlając litoral mórz i oceanów zarówno w strefach umiarkowanych, jak i chłodnych półkuli północnej i południowej. Filtrowanie pokarmu z wody, w postaci fitoplanktonu i drobnych cząstek organicznych, stanowi główny sposób odżywiania się małży. Dzięki takiemu sposobowi odżywiania się omułki przetwarzają zawieszinę morską w detrytus osadzony na dnie oraz wysokowartościowy pokarm białkowy, który może zostać wykorzystany przez zwierzęta i człowieka. Natomiast ich wapienne muszle odkładają się w osadach dennych. Omułki żyją w ławicach, które tworzą pasy na głębokości od kilku do kilkunastu metrów w strefie pływów, w których przytwierdzają się włóknami bisiorowymi do skał, kamieni lub roślin. Okres larwalny uzależniony jest od warunków środowiska tj.: dostępność pokarmu, odpowiednia temperatura (w przedziale między 5 a 20°C) i zasolenie (od 5 do 31 PSU). Dla *M. edulis* w sprzyjających warunkach, okres larwalny nie przekracza 20 dni, przy zmianie warunków czas ten może wydłużyć się do 40 dni (Bayne, 1976). Zdolność migracji możliwa jest w stadium larwalnym z wykorzystaniem prądów morskich lub w sposób pasywny np. z wykorzystaniem wód balastowych (Carlton i Geller, 1993). Formy młodociane lub dorosłe omułków mogą się przemieszczać przytwierdzone do kadłubów statków, obiektów holowanych (np. wieże wiertnicze) lub na dryfujących przedmiotach jak belki, boje lub fragmenty konstrukcji oderwane z hodowli i nadbrzeży (Ruiz i in., 2000a).



**Rysunek 1.** Muszle omułek z rodzaju *Mytilus*: *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758; *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819; *Mytilus trossulus* Gould, 1850 (źródło: marinespecies.org).

Zróznicowanie zasiedlanego środowiska wywiera duży wpływ na kształt, rozmiar i ubarwienie muszli omułek (Seed, 1968; Westerbom i in., 2002). Tempo wzrostu regulowane jest głównie przez ilość i jakość dostępnego pokarmu oraz temperaturę wody (Gaston i Blackburn, 2000). Na kształt, grubość i rozmiary muszli wpływa również obecność takich drapieżników jak rozgwiazdy i kraby (Reimer i Tedengren, 1996; Christensen i in., 2012). Muszla omułek jest dwuczęściowa, symetryczna i otwiera się dzięki obecności dwóch mięśni retraktorowych (zwijających) w części grzbietowej i zamyka za pomocą mięśni zwierających (Gosling, 1992c). Wybarwienie muszli omułek uzależnione jest od gatunku oraz wpływu warunków środowiska i przybiera kolor granatowy, brązowy lub czarny (Rysunek 1). Wnętrze muszli charakteryzuje się kolorem srebrnym lub perłowym. Muszlę tworzą trzy warstwy:

- zewnętrzną warstwę - konchiolinową,
- środkową warstwę - porcelanową,
- wewnętrzną warstwę - perłową.



**Rysunek 2.** Budowa wewnętrzna omułka (źródło: Eggermont i in., 2020).

We wnętrzu muszli znajduje się jama płaszczowa zawierająca dwa skrzela pokryte urzęsionym nabłonkiem (Rysunek 2). Przepływająca przez skrzela woda zawiera zarówno tlen, jak i pokarm. Woda zasysana jest przez syfon wpustowy a usuwana jest przez syfon wypustowy, który powstał ze zrośniętych połówek płaszcza. W części grzbietowej noga przekształcona jest w worek trzewiowy (Jura, 2004). Układ krwionośny omułków jest typu otwartego. Serce zbudowane z dwóch przedsionków i jednej komory jest okryte błoną - osierdziem. Wychodzące z serca aorty rozprawdają krew we wnętrzu organizmu małża. Krew przedostaje się do żył z zatok żylnych, następnie do tętnic skrzelowych, dalej do przedsionków i ostatecznie do komory serca. Układ nerwowy omułków to połączone parzystymi spoidłami trzy zwoje nerwowe

(zwój nożny, trzewiowy i głowowy). Parzyste i symetrycznie ułożone nerki tworzą prosty układ wydalniczy omułków. Tkanka rozrodcza - gonady znajdują się we wnętrzu płaszcza. Do ważnych czynników wpływających na okres rozrodu małży należą procesy fizyczne, które zachodzą w kolumnie wody, temperatura wody i dostępność pokarmu. W Oceanie Atlantyckim okres ten trwa od połowy maja do końca września. Omułki są rozdzielнопłciowe, epizodycznie w wodach stojących można zaobserwować osobniki hermafrodytyczne (Saavedra, 1997).

### 3.3 Ekologia *Mytilus*

Morskie ekosystemy przybrzeżne są szczególnie zależne od wpływu zmiennych czynników środowiskowych naturalnych i antropogenicznych (Borja i in., 2010). Różnice środowiskowe wpływają na obecność populacji przystosowanych do warunków lokalnych (Kawecki i in., 2004) o różnym potencjale reagowania na zmieniające się warunki środowiskowe (Pellini i in., 2010). Kluczową rolę w kształtowaniu populacji odgrywa stres środowiskowy oraz pula genowa, które wyznaczają zakres zmienności w lokalnych populacjach (Teske i in., 2019). Omułki rodzaju *Mytilus* są ważnymi inżynierami ekosystemów przybrzeżnych (Utermann i in., 2018). Skupiska omułków są produktywne, dodatkowo stanowią miejsce żerowania dla bezkręgowców, ryb i ptaków oraz siedlisko życia dla wielu organizmów (Blicher i in., 2013).

Cztery lokalne gradienty środowiskowe: temperatura, zasolenie, ekspozycja na działanie fal oraz odporność na wysychanie wpływają na osobniki *Mytilus spp.*, występujące w strefie międzyplywowej z twardym podłożem (Gosling, 1992a; Sarver i Foltz, 1993). Pływy i falowanie mogą również kształtować gradient mechaniczny, np. brzegi makroplywów do 7 m (północny Atlantyk) oraz wyraźniejszy gradient ekspozycji na wysychanie w porównaniu z brzegami mikroplywów (Morze Śródziemnomorskie i Bałtyckie). Gradient zasolenia obserwowany jest w estuariach i morzach półzamkniętych. Zmieniające się warunki środowiska kreują lokalne adaptacje populacji i wpływają na jej strukturę genetyczną. Duże gradienty środowiskowe mogą być skorelowane ze zmianami w częstotliwości występowania alleli (Kijewski i in., 2019;

Kotta i in., 2015) i sugerować działanie czynników selekcyjnych. Zróżnicowanie genetyczne może być skorelowane z odpornością na działanie fal (Lucas i in., 2002), reakcją na zmiany temperatury (Hayhurst i in., 2009), obecność metali ciężkich (Brooks i in., 2015) i różnice zasolenia (Zbawicka i in., 2014). Jednak, najczęściej przestrzenne zróżnicowanie genetyczne jest skutkiem procesów ewolucyjnych/genetycznych zachodzących w populacjach, takich jak izolacja, efekt założyciela, dryf genetyczny, czy wtórne mieszanie się (efekt Wahlunda).

W ostatnim stuleciu, antropogeniczne działania spowodowały zatarcie naturalnych wzorców populacji (Gardner i in., 2016). Z powodu wzmożonej działalności człowieka zasięgi geograficzne endemicznych gatunków morskich mogą się poszerzać a ich populacje są zagrożone przez zmieszanie w wyniku hybrydyzacji lub są zagrożone inwazjami gatunków obcych (Hughes i in., 2020). Ponadto rafting oceaniczny jest coraz częściej uznany za ważny naturalny sposób poszerzania zasięgu niektórych taksonów morskich (Waters i in., 2008; Fraser i in., 2011). Ze względu na skłonność do hybrydyzacji i krzyżowania wstecznego w obszarach współistnienia dwóch lub więcej gatunków omułek z rodzaju *Mytilus*, translokacja osobników może spowodować zatarcie różnic fenotypowych i genotypowych gatunków oraz zaburzyć ich naturalne rozmieszczenie (Brannock i in., 2009, Fraisse i in., 2016). Omułki z rodzaju *Mytilus* stanowią modelową grupę gatunków dając możliwości badań nad filogeografią, ewolucją, specjacją i hybrydyzacją w morzu.

### **3.3.1 Strefy hybrydyzacji *Mytilus***

Hybrydyzacja to proces, który prowadzi do mieszania się genów między taksonami. Znaczące wymieszanie puli genowej dwóch taksonów nosi miano introgresji. Zjawisko to prowadzi do tworzenia się populacji, posiadających zmieszane pule genowe z izolowanych wcześniej dwóch różnych taksonów. Populacja mieszańcowa wykazuje zwiększoną zmienność i można zaobserwować w niej efekt heterozji. Utrzymanie stref mieszańcowych wyjaśniają dwie koncepcje. Pierwsza z nich zakłada, że strefa mieszańcowa może być utrzymywana na obszarach, w których mieszańce przejawiają lepsze dostosowanie od osobników, które nie są hybrydami. Przy przewadze selekcyjnej hybryd, będą one i formy rodzicielskie rozmieszczone zgodnie z gradientem warunków środowiska (Moore, 1977). Druga koncepcja sugeruje, że strefy

niezależne od warunków środowiska są produktem ubocznym styku dwóch populacji. Model ten zakłada, że mieszańce są słabiej dostosowane od populacji rodzicielskich, co powoduje, że strefa mieszańcowa regulowana jest dzięki równowadze między selekcją przeciw mieszańcom prowadzącą do tworzenia się stref buforowych, a rozprzestrzenianiem się genotypów rodzicielskich (Barton i Hewitt, 1985).

W rejonach, w których populacje dwóch gatunków *Mytilus* stykają się zwykle dochodzi do powstawania mniej lub bardziej licznych hybryd. Jeżeli liczba osobników hybrydowych jest dość duża i hybrydyzacji ulegają również kolejne pokolenia (ang. backcross) w określonym rejonie, to w obszarze tym powstają i utrzymują się naturalne strefy hybrydyzacji. Dotyczy to najczęściej populacji trzech gatunków: *M. edulis*, *M. galloprovincialis* i *M. trossulus*. Do najlepiej zbadanych stref hybrydyzacji należą: strefa hybrydyzacji mozaikowa *M. edulis* - *M. galloprovincialis* w rejonie Zatoki Biskajskiej i Bretanii wzdłuż wybrzeża o długości ponad 1000 km w południowo-zachodniej części Europy (Bierne i in., 2003; Bierne i in., 2002; Comesaña i Sanjuan, 1997), gdzie naturalne strefy hybrydowe *M. galloprovincialis* wchodzi we wtórny kontakt z *M. edulis* (Bierne i in., 2003; Simon i in., 2020, 2021), strefa hybrydyzacji *M. edulis* - *M. trossulus* w Cieśninach Duńskich (Väinölä i Hvilson, 1991; Riginos i in., 2002; Stuckas i in., 2009; Zbawicka i in., 2014); strefa hybrydyzacji *M. edulis* - *M. trossulus* między częścią borealną i arktyczną wschodniego wybrzeża Kanady (Gardner i Thompson, 2001; Comesaña i in., 1999; Riginos i Cunningham, 2005); strefa hybrydyzacji *M. galloprovincialis* - *M. trossulus* wzdłuż północnego wybrzeży Kalifornii, Oregonu do rejonu Vancouver (Suchanek i in., 1997; Shields i in., 2008; Saarman i Pogson, 2015; Sarver i Foltz, 1993; Braby i Somero, 2006; Rawson, i in., 1999) oraz tych samych gatunków w Morzu Japońskim (Brannock i in., 2009; Inoue i in., 1997; Iwasaki i in., 2020; Kartavtsev i in., 2014). Strefy hybrydyzacji gatunków *Mytilus* na półkuli południowej zostały omówione przez Gardner i in. (2021). Orócz dobrze poznanych stref hybrydyzacji gatunków *Mytilus* w Europie obecność hybryd *M. edulis* - *M. galloprovincialis* stwierdzono w południowej Wielkiej Brytanii (Skibinski i in., 1978; Hilbish i in., 2002), Irlandii (Gosling i in., 2008) i Szkocji (Dias i in., 2009) oraz w niektórych portach od Zatoki Biskajskiej w kierunku północnym do Norwegii włącznie (Simon i in., 2020). Obecność hybryd *M. edulis* - *M. trossulus* potwierdzono w niektórych fiordach w Szkocji (Dias i in., 2008; Zbawicka i in., 2010), w północnej Norwegii i na wybrzeżach Morza Białego i Barentsa (Väinölä i Strelkov, 2011; Wenne i

in., 2020). Hybrydyzacja może mieć negatywny wpływ na hodowle omułków (Michalek i in., 2016).

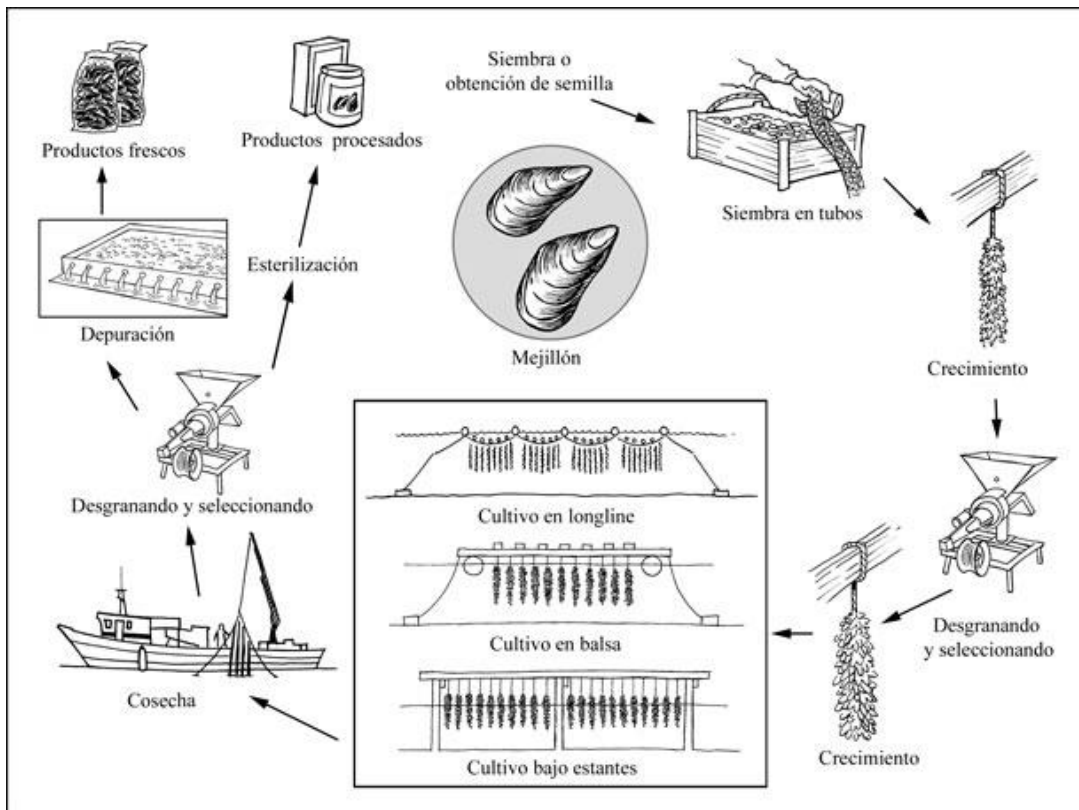
### 3.3.2 Hodowla omułków *Mytilus*

Pierwsze próby hodowli omułków podjęto już w starożytności (Smal, 2002), a pierwsze wzmianki o hodowlach w krajach europejskich pochodzą z XIII wieku. W ostatnich dekadach, omułki *Mytilus* są hodowane na szeroką skalę, zwłaszcza w Chinach, krajach Unii Europejskiej (głównie: Hiszpanii, Włoszech, Francji i Holandii) oraz Chile (FAO, 2004a, b; Avdelas i in., 2021; Wenne i in., 2022a). Metody ich eksploatacji różnią się: od pozyskiwania omułków *M. edulis* z dna morskiego z zastosowaniem zaciągów dragami, hodowli zawieszanej na linach (bouchots) do hodowli omułków *M. galloprovincialis* różnymi metodami: zawieszonych na linach doczepionych do tratw. Dokładny opis technik hodowli *Mytilus* opublikowali Kamermans i Capelle (2019) oraz Kamermans i in. (2013). W zależności od pochodzenia małże mogą różnić się wielkością, smakiem, jakością, kolorem mięsa oraz ceną produktów. Na rynku Unii Europejskiej małże są sprzedawane żywe, dotyczy to omułków produkowanych lokalnie lub importowanych z innych krajów europejskich, czy też dostarczane w stanie zamrożonym z Europy i Chile (Wenne i in., 2022a). Są one wykorzystywane jako surowce w przemyśle przetwórczym (ec.europa.eu).

We Włoszech i Hiszpanii proces hodowli składa się z 3 etapów: pozyskiwanie larw, uprawa i zbiory (odłowy). Larwy pozyskiwane są z naturalnych ławic lub z palików obwiązanych linami z małżami okrytymi siatką, która utrzymuje larwy blisko lin. Następnie liny zostają rozdzielone a małże są sortowane i mocowane do różnorodnych konstrukcji w zależności od rodzaju hodowli. Po wyłowieniu omułki są odrywane mechanicznie od lin i wkładane do specjalnie podwieszanych koszy. Zanim zostaną przekazane do sprzedaży są oczyszczane i poddawane selekcji, po której są pakowane do czarnych toreb (observatorio-acuicultura.es) (Rysunek 3). W Holandii stosuje się metodę rozproszoną oraz hodowle na płaskim podłożu. W zatokach umieszcza się płytkie ławy i rozmieszcza na nich młode osobniki. We Francji hodowla odbywa się na drewnianych palikach tzw. bouchots, umieszczonych w strefie pływów. W Hiszpanii, Irlandii, Francji, Belgii oraz wzdłuż wybrzeży Morza Śródziemnego stosuje się metodę charakterystyczną dla mórz o łagodnych pływach. Małże przyczepiane są do sznurów, które pionowo opadają w wodzie i są umocowane do stałej



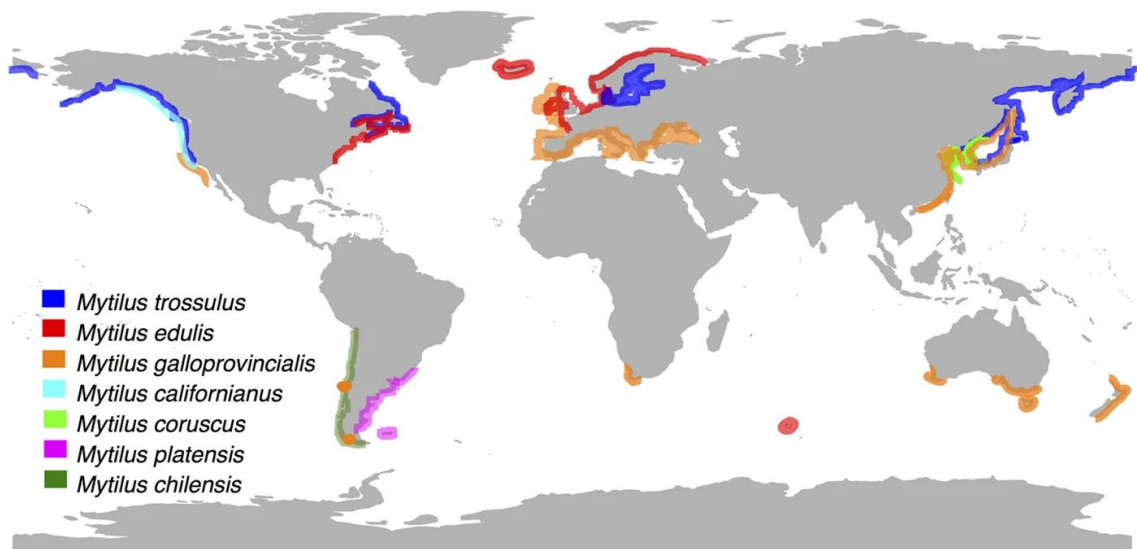
lub dryfującej konstrukcji: tratwy, boi lub drewnianych ram (ec.europa.eu, fao.org). W Europie Północnej wykorzystuje się metodę tzw. Smart Units, która polega na przyczepianiu małży do sieci, która jest zamocowana do pływających rur umocowanych w dnie. Metoda Smart Units jest preferowana przez zwolenników zrównoważonego rybołówstwa (ilgiornaledelcibo.it). Większość krajów Unii Europejskiej prowadzi również hodowlę za pomocą lin podwieszanych wzdłuż wybrzeży, ten sposób umożliwia pozyskanie większej ilości osobników (fao.org). W ostatnich 30 latach hodowla *Mytilus* znacząco wzrosła w krajach Unii Europejskiej, jednak od kilkunastu lat jest niższa niż wcześniej. W Galicji hiszpańskiej obecnie wykorzystuje się 3300 pływaków do hodowli *Mytilus* umieszczanych głównie w ujściach rzek, z których pozyskuje się 270 000 ton omułków. W latach wcześniejszych stanowiło to do 50% światowej produkcji (omega.com).



**Rysunek 3.** Cykl produkcyjny *Mytilus galloprovincialis* (fao.org).

### 3.4 Rozmieszczenie gatunków rodzaju *Mytilus* w Oceanie Światowym

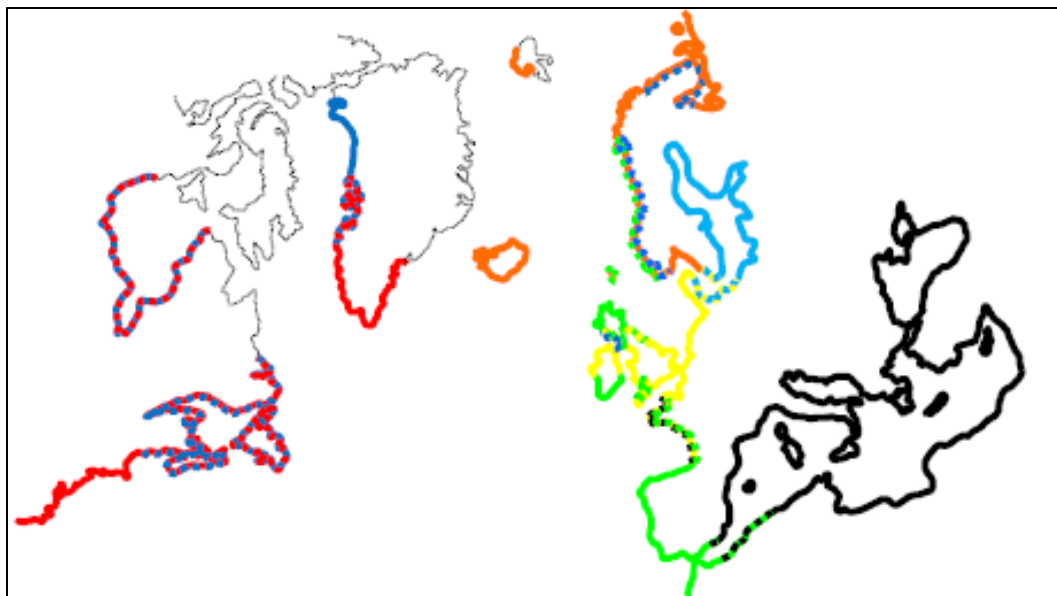
Przedstawiciele omułek z rodzaju *Mytilus* zasiedlają wszystkie kontynenty z wyjątkiem strefy tropikalnej. Na Rysunku 4 przedstawiono rozmieszczenie taksonów *Mytilus* za Gaitán-Espitia i in. (2016) według wiedzy z połowy lat 2010. Aktualnie jest już znane rozmieszczenie taksonów na Grenlandii i Svalbardzie, wyspach Oceanu Południowego i Antarktycznych wyspach Południowe Szetlandy, na wybrzeżach Australii i Nowej Zelandii (Cardenas i in., 2020; Gardner i in., 2016; Kotwicki i in., 2021; Wenne i in., 2016; Zbawicka i in., 2019, 2022). Rozmieszczenie *Mytilus* jest określane jako antytropikalne lub bipolarne (Hilbish i in., 2000). Przedstawiciele rodzaju *Mytilus* nie zasiedlają strefy tropikalnej, w przeciwieństwie do *Perna*. Obecnie najbardziej prawdopodobną hipotezą rozmieszczenia naturalnych populacji omułek jest ich historyczna migracja przez równik. Ekspansja organizmów między dwiema półkulami najprawdopodobniej miała miejsce dwukrotnie (Lindberg, 1991). Prawdopodobnie pierwsza i najdłuższa migracja miała miejsce 3,1 miliona lat temu i pokryła się czasowo z kształtowaniem się przesmyku Panamskiego. Ekspansja organizmów przybrała wtedy charakter asymetryczny, ponieważ 90% gatunków przedostało się z półkuli północnej na południową. Mniej intensywny i bardziej zrównoważony charakter przybrał drugi okres migracji, który odbył się w plejstocenie (Lindberg, 1991; Vermeij, 1992). W podobnym czasie doszło do dwóch migracji *Mytilus* z Pacyfiku do Atlantyku (Riginos i Cunningham, 2002; Vermeij, 1991). Efektem pierwszego przemieszczenia było wyewoluowanie *M. edulis* w Północnym Atlantyku a drugiego była kolonizacja wybrzeży Kanady i Europy przez współczesny *M. trossulus*.



**Rysunek 4.** Mapa rozmieszczenia w Oceanie Światowym omułek z kompleksu *Mytilus edulis* spp. (Gaitán-Espitia i in., 2016).

*Mytilus edulis* rozpowszechniony jest głównie na wybrzeżach Atlantyku, *M. trossulus* w Pacyfiku, północno-zachodnich i w niektórych rejonach wschodnich wybrzeży Atlantyku i oraz Morzu Bałtyckim, natomiast *M. galloprovincialis* wzdłuż południowo – wschodnich wybrzeży Atlantyku i w Morzu Śródziemnym (Rysunek 4). Introdukowane populacje *M. galloprovincialis* na półkuli północnej zasiedlają Morze Japońskie, część wybrzeży południowej Kalifornii, Zatoki Puget i wybrzeża Vancouver. Natomiast na półkuli południowej występują wzdłuż wybrzeży RPA, Tasmanii, Australii, Nowej Zelandii oraz rzadko (w niektórych miejscach) w pacyficznych i atlantyckich wodach przybrzeżnych Ameryki Południowej (Hilbish i in., 2000; Zbawicka i in., 2018, 2019; Zardi i in., 2018). *M. chilensis* (Hupe, 1854) zasiedla głównie wybrzeża Chile i Ziemi Ognistej (w tym części argentyńskiej), a *M. platensis* atlantyckie wybrzeża od południowej Argentyny i Falklandów do Urugwaju. Początkowo uważano, że *M. trossulus* skolonizował w Atlantyku wyłącznie wybrzeża Kanady oraz Morze Bałtyckie (Riginos i Cunningham, 2005). Późniejsze badania dowiodły, że *M. trossulus* zasiedlił również część wybrzeża zachodniej Szkocji (Beaumont i in., 2008; Zbawicka i in., 2010) oraz wybrzeża arktycznych wód Morza Barentsa i Morza Białego (Rysunek 5) (Kijewski i in., 2011; Väinölä i Strelkov, 2011; Wenne i in., 2020). Dalsze badania potwierdziły obecność *M. trossulus* u wybrzeży Morza Barentsa, Morza Białego i wykazały jego obecność na wybrzeżach północno-zachodniej Grenlandii (Zbawicka i in., 2010; Wenne i in., 2016, 2020). Ze względu na

zasięg geograficzny *M. trossulus*, można wywnioskować, że ten gatunek preferuje wodę o niższych temperaturach oraz niskim zasoleniu. *Mytilus edulis* skolonizował obszary klimatu umiarkowanego i wykształcił się po obu stronach Atlantyku drogą specjacji allopatrycznej (Vermeij, 1991; Riginos i Cunningham, 2005). Europejskie formy *M. edulis* zasiedlają strefę przybrzeżnych wód Europy od Morza Białego i Morza Barentsa po linię brzegową południowej Francji (Rysunek 5). Według Gaitán-Espitia i in. (2016) występowanie *Mytilus galloprovincialis* rozciąga się wzdłuż północnej linii brzegowej Morza Śródziemnego do Morza Marmara i Czarnego oraz atlantyckiego wybrzeża Europy Zachodniej. Został również stwierdzony w niektórych miejscach na wybrzeżach Wysp Brytyjskich i Orkadach na północy (Hilbish i in., 2002; Riginos i Henzler, 2008; Zbawicka i in., 2012, 2014). Obszar dystrybucji populacji formy atlantyckiej obejmuje południową Europę i część wybrzeża Wielkiej Brytanii, natomiast populacje formy śródziemnomorskiej występują w Morzu Śródziemnym, w tym na wybrzeżu Północnej Afryki oraz w Morzu Marmara, Czarnym i Azowskim (Rysunek 4). *M. galloprovincialis* toleruje wyższe temperatury (Popovic i Riginos, 2020).



**Rysunek 5.** Mapa rozmieszczenia rodzaju *Mytilus* w Północnym Atlantyku. *M. edulis* zaznaczony jest kolorem czerwonym (forma amerykańska), żółtym (forma zachodnioeuropejska) i pomarańczowym (północnoeuropejski), *M. trossulus* kolorem niebieskim (linia bałtycka jasnoniebieski), *M. galloprovincialis* kolorem czarnym (linia śródziemnomorska) i zielonym (linia atlantycka) (Źródło: Wenne i in., 2020).

### 3.5 Morze Śródziemne i ewolucja *M. galloprovincialis*

#### 3.5.1 Historia Morza Śródziemnego

Powstanie Morza Śródziemnego jest łączone z Erą Mezozoiczną i okresem Morza Tetydy, gdy w miocenie jego kształt upodobnił się do dzisiejszego (Picotti i in., 2014; Wenne i in., 2022b). Badania geologiczne wskazują, że pod koniec miocenu Morze Śródziemne zostało odizolowane od Oceanu Atlantyckiego przez barierę lądową między Iberią a Afryką Północną. Intensywne parowanie tak powstałego ciepłego morza spowodowało odsłanianie dużych obszarów dna. Okres podczas którego doszło do obniżenia poziomu wód nawet o ponad 2 tys. metrów i całkowitego wyschnięcia części basenów obecnego Morza Śródziemnego jest określany jako tzw. kryzys messyński i miał miejsce ok. 5,75-5,32 miliona lat temu (Janssen i Peijnenburg, 2014). Połączenie z Oceanem Atlantyckim zostało przywrócone ok. 5,3 mln lat temu, gdy woda oceaniczna wypełniła powstałą nieckę (Krijgsman i in., 2018). Następnie, w pliocenie, po okresie klimatu monsunowego następowały cykliczne zmiany poziomu morza związane z okresami zlodowaceń na półkuli północnej (Picotti i in., 2014). Inną historią powstania charakteryzuje się Morze Czarne, które było jeziorem słodkowodnym zasilanym przez wodę z topniejących lodowców. Jego współczesne połączenie z Morzem Śródziemnym przez Cieśninę Bosfor, Morze Marmara i Cieśninę Dardaneelską powstało ok. 10,5 tys. lat temu (Wenne i in., 2022b). Wcześniej Morze Czarne było jedynie okresowo zasilane wodami z Morza Śródziemnego (Ryan i in., 2014). Zarówno zróżnicowane historie geologiczne jak i współczesna struktura Morza Śródziemnego umożliwiają lepsze zrozumienie, w jaki sposób okresy izolacji, różny wiek basenów i ich zróżnicowane warunki środowiskowe mogą wpływać na łączność - wymianę osobników i przepływ genów (ang. connectivity) między populacjami i ich różnorodność genetyczną.

### 3.5.2 Pochodzenie *Mytilus* w Północnym Atlantyku i ewolucja *M. galloprovincialis*

*M. trossulus* wyewoluował w Oceanie Spokojnym i skolonizował Północny Atlantyk po otwarciu Cieśniny Beringa ok. 3,5 mln lat temu (Gardner i in., 2021; Vermeij, 1991; Wenne i in., 2022b). Z tego gatunku, w Atlantyku wyodrębnił się nowy takson *M. edulis* i rozprzestrzenił się w północno-zachodnim Oceanie Atlantycznym, a następnie skolonizował wybrzeża Europy. Najstarsze skamieniałości określone jako *M. edulis* znaleziono w osadach z wczesnego pliocenu, muszle ze środkowego i późnego Zanklu w okolicach Lepe, w Zatoce Kadyksu, na wybrzeżu atlantyckim na północny zachód od Gibraltaru (Belaústegui i Muñiz, 2016; Wenne i in., 2022b). *M. edulis* najprawdopodobniej skolonizował Morze Śródziemne podczas wahań poziomu morza przed plejstocenem (Gardner i in., 2021; Vermeij, 1991). Około 2,6 mln lat temu miało miejsce zlodowacenie na półkuli północnej, które prawdopodobnie spowodowało spadek poziomu morza o ponad 100 metrów (Sosdian i Rosenthal, 2009). Dywergencja *M. galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym rozpoczęła się ok. 2,5 mln lat temu i trwała przez ok. 1,8 mln lat (Roux i in., 2014). W okresie przejściowym, wczesnego i środkowego plejstocenu od 1,4 do 0,4 mln lat temu ustaliły się bardziej regularne cykle okresów glacialno-interglacialnych, które spowodowały dalsze zmiany poziomu morza. Globalne spadki poziomu morza izolowały środowisko i ekosystem Morza Śródziemnego od północno-wschodniego Oceanu Atlantycznego (Wenne i in., 2022b). Podczas zmian poziomu morza populacje małży z Oceanu Atlantycznego najprawdopodobniej wchodziły w kontakt wtórny z populacjami z Morza Śródziemnego (Barsotti i Melluzzi, 1968). Po kolonizacji przez *Mytilus edulis* napływ wód z Oceanu Atlantycznego do dzisiejszego Morza Śródziemnego był okresowo ograniczany lub odcinany głównie ze względu na wahania poziomu morza na zachód od Cieśniny Gibraltarskiej, ale również z powodu zmian tektonicznych (Wenne i in., 2022b). Ponadto silne parowanie wody morskiej spowodowało okresowe obniżanie poziomu wody w Morzu Śródziemnym i doprowadziło do wyodrębnienia się jego części jako odrębnych basenów w okresie plejstocenu (Bianchi i in., 2012). W ciągu ostatnich 150 000 lat zmiany poziomu morza od ~130 m poniżej do 6-15 m powyżej obecnego poziomu morza spowodowane były zlodowaceniami i okresami ocieplenia (Benjamin i in., 2017). Według Riginos i Cunningham (2005) mechanizmy izolacji (tzw. teoria wikariańska) były ważne dla wyodrębnienia się *M. galloprovincialis* od *M. edulis*.

### 3.5.3 Rozmieszczenie współczesnych populacji *M. galloprovincialis*

Natywny *M. galloprovincialis* jest ważnym składnikiem zespołów przybrzeżnych w Morzu Śródziemnym i Czarnym. Osobniki dorosłe są przytwierdzone nitkami bisioru do twardego podłoża. Larwy mogą przemieszczać się z prądami na duże odległości. *M. galloprovincialis* wykazuje największą, w porównaniu z innymi gatunkami *Mytilus*, zdolność do kolonizacji nowych regionów geograficznych, czy to poprzez transfer z udziałem człowieka (np. celowa introdukcja do akwakultury lub przypadkowo poprzez zanieczyszczenie z wodami balastowymi i na dryfujących z prądami morskimi obiektach, jak boje czy części drewniane umocnień nadbrzeży) lub w sposób naturalny (np. przez dryfowanie na wodorostach) (Gardner i in., 2021; Wenne i in., 2022b). W ostatnich latach *M. galloprovincialis* wykryto na atlantyckich wybrzeżach Ameryki Południowej, gdzie w Argentynie krzyżuje się z rodzimym taksonem *M. platensis* (Zbawicka i in., 2018) oraz w Brazylii, gdzie osadza się na hodowlach rodzimego gatunku *Perna perna* (Birckolz i in., 2020; Lins i in., 2021). *M. galloprovincialis* został introdukowany do Afryki Południowej, na wybrzeża Pacyfiku Ameryki Północnej (USA i południowa Kanada), Morza Japońskiego, Chin, Korei, Australii, Nowej Zelandii i Chile (Wilkins i in., 1983; McDonald i Koehn, 1988; Gardner i in., 2016; Han i in., 2017; Larraín i in., 2018; Zbawicka i in., 2019, 2022). Jest uważany za jeden z najbardziej skutecznych gatunków inwazyjnych, często wypierając gatunki rodzime (Geller i in., 1999; Lowe i in., 2000; Gardner i in., 2021; Wenne i in., 2022b).

Dotychczasowe badania genetyczne naturalnych populacji *M. galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym miały charakter lokalny lub obejmowały tylko niektóre regiony (np. Ahmad i Beardmore, 1976; Edwards i Skibinski, 1987; Karakousis i Skibinski, 1992; Quesada i in., 1995a, b; Giantis i in., 2012, 2014a, b; Bierne i in., 2003; Sammer i in., 2010; Vera i in., 2010; Fraisse i in., 2016; Paterno i in., 2019). Nie były prowadzone badania genetyczne populacji *M. galloprovincialis* w skali całego zasięgu populacji naturalnych w Morzu Śródziemnym, Czarnym i w akwenach przyległych.

#### 4. Cele badań

- 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,
- identyfikacja taksonów *Mytilus* w próbach żywności pochodzących ze sprzedaży w Europie z zastosowaniem SNP,
- ocena zgodności informacji o taksonie i pochodzeniu geograficznym omułek *Mytilus* przedstawionych na etykietach produktów żywnościowych z wynikami badań genetycznych.



## 5. Materiał i metody

Do badań użyto prób omułek *Mytilus* pobranych w latach wcześniejszych w ramach realizacji projektu NCN 2011/01/B/NZ9/04352 oraz zadania statutowego IV.1 przez Pracownię Genetyki Organizmów Morskich Zakładu Genetyki i Biotechnologii Morskiej w Instytucie Oceanologii PAN. Do określenia genotypów badanych omułek zastosowano metodę polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP). Próby DNA do badań zostały wyizolowane z tkanki płaszczka metodą CTAB zgodnie z procedurą opracowaną przez Hoarau i in. (2002). Próbkę tkanek DNA były przechowywane przed izolacją w 96% etanolu lub w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ . Próby DNA z osobników *Mytilus* były genotypowane w laboratorium Centre for Integrative Genetics (CIGENE), Department of Animal and Aquacultural Sciences, Faculty of Biosciences, Norwegian University of Life Sciences, No-1432 Ås, Norway z użyciem platformy Sequenom MassARRAY iPLEX wg procedury opisanej przez Gabriel i in. (2009). Zastosowane urządzenie było dedykowane do badań z zakresu genetyki populacyjnej i umożliwiała jednoczesne genotypowanie 380 prób.

Do celów realizacji niniejszej pracy doktorskiej zostały udostępnione wyniki genotypowania 1967 osobników badawczych omułek z rodzaju *Mytilus* reprezentujących próby *M. galloprovincialis* z warunków naturalnych z Morza Śródziemnego i Czarnego oraz z wybrzeży Oceanu Atlantyckiego południowej Europy i południowej Afryki, jak również próby spożywcze zawierające omułki zakupione w hodowlach i sklepach oraz 613 osobniki referencyjne.

### 5.1 Analiza bioinformatyczna

#### 5.1.1 Różnorodność genetyczna

Do analizy wyników genotypowania dla badanych populacji *Mytilus* zastosowano program Arlequin v. 3.5.1.2 (Excoffier i Lischer, 2010) i w każdej próbie określono: frekwencje alleli, proporcje polimorficznych SNP ( $P_O$ ), frekwencje alleli mniejszościowych (MAF), heterozygotyczność obserwowaną ( $H_O$ ) i oczekiwaną ( $H_E$ ), różnorodność genetyczną i wskaźnik zróżnicowania populacji parami ( $F_{ST}$ ), współczynnik inbredu ( $F_{IS}$ ) i odstępstwa od równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE) (Wenne i in., 2022b). Najbardziej informatywne loci zidentyfikowano przez obliczenie  $F_{ST}$  dla loci odstających, górną granicę 95% przedziału ufności zidentyfikowano z 20

000 iteracjami i scharakteryzowano przez oszacowanie 0,05 i 0,95 i 0,99 kwantylów rozkładu. Współczynnik fałszywych wyników (FDR-BY) zastosowano do skorygowania wartości istotności (P) po wielokrotnym testowaniu (Benjamini i Yekutieli, 2001; Narum, 2006).

### **5.1.2 Zróźnicowanie genetyczne i struktura populacji**

Do skonstruowania drzewa najbliższego sąsiedztwa (NJ) ilustrującego zależności genetyczne między populacjami zastosowano wartości odległości  $F_{ST}$  w formacie Newick, uzyskane w programie POPTREEW (Takezaki i in., 2014), które przedstawiono w wersji graficznej za pomocą programu MEGA 4 (Tamura i in., 2007). Do analizy struktury populacji zastosowano dwie metody (Wenne i in., 2022b). Analiza korespondencji (CA; Benzécri, 1992), zaimplementowana w GENETIX (Belkhir i in., 2003) została użyta do wizualizacji struktury genetycznej w populacjach. Wyniki przedstawiono jako wykres punktowy, którego osie reprezentują wkład bezwładności macierzy danych w sposób, który można uznać za analogiczny do całkowitej wariancji częstości alleli (Benzécri, 1992) i w którym każda kropka reprezentuje populację lub osobnika. Po drugie, grupowanie i testowanie przyporządkowania przeprowadzono metodą Bayesowską zaimplementowaną w oprogramowaniu STRUCTURE v. 2.3.4. STRUCTURE zastosowano w modelu zakładającym mieszanie, ignorującym korelację między kolejnymi próbkami i uwzględniającym korelację częstości alleli między klastrami. Model mieszany (ang. admixture) zastosowany w tej analizie dopuszcza strukturę osobników o mieszanym pochodzeniu, co oznacza, że części genomu mogły pochodzić od różnych przodków (Pritchard i in., 2000; Falush i in., 2007). Najbardziej odpowiednią liczbę klastrów genetycznych określono przez porównanie oparte na diagramie logarymicznych prawdopodobieństw dla wartości K. Dla każdej wartości K zastosowano co najmniej 5 przebiegów, zgodnie z metodą opisaną przez Evanno i in. (2005). Jako kryterium oddzielenia mieszańców od czystych osobników zastosowano progowe wartości  $q$  wynoszące 0,2 (Vähä i Primmer, 2006). Osobniki uważano za lokalne dla obszaru, z którego były pobrane przy wartościach  $q > 0,8$ . Osobniki z wartościami  $q$  od 0,2 do 0,8 uznano za potencjalnie mieszane, ponieważ nie można było ich jednoznacznie określić jako miejscowych lub migrantów (Lecis i in., 2006). Metoda łańcuchowa Monte Carlo Markowa została uruchomiona dla 100000 iteracji.

## 6. Wyniki

### 6.1 Zróżnicowanie genetyczne populacji *M. galloprovincialis* w przybrzeżnych wodach Morza Śródziemnego i Czarnego

#### 6.1.1 Materiał badawczy

W celu zbadania zróżnicowania populacji *M. galloprovincialis* przeprowadzono analizę genetyczną 44 prób z Morza Śródziemnego, Morza Czarnego i z przyległych wód przybrzeżnych Oceanu Atlantyckiego oraz 1 próba z wybrzeża Kanady. Rozmieszczenie geograficzne tych prób zostało przedstawione na mapie (Rysunek 6). Do badań użyto 976 osobników o zróżnicowanej wielkości pobranych w latach 2004 – 2016 (34 próby) oraz 316 osobników będących próbami referencyjnymi (11 prób, Tabela 1). Próby referencyjne o wcześniej znanych genotypach reprezentowały *M. galloprovincialis* z atlantyckich wybrzeży Hiszpanii, Portugalii i z Morza Śródziemnego, *M. edulis* z Francji i *M. trossulus* z Kanady. Do analiz bioinformatycznych użyto 79 SNP, które różnicują gatunki *Mytilus* i ich hybrydy przedstawionych w publikacjach: Zbawicka i in. (2012, 2014) oraz Wenne i in. (2016, 2020).



**Rysunek 6.** Lokalizacje 44 prób *Mytilus* z Morza Śródziemnego oraz Oceanu Atlantyckiego (Google Earth Pro) z wyjątkiem próby KKA (z kanadyjskiego wybrzeża Atlantyku). Nazwy prób oraz ich współrzędne geograficzne przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Lista prób *Mytilus*, liczby badanych osobników (*No.*) oraz współrzędne miejsc poboru prób.

Próba	Miejsce	Kraj	<i>No.</i>	Współrzędne	
AGA	Agadir	Maroko	31	30°18'3.36"N	9°48'56.60"W
ALC	Alcanar	Hiszpania	29	40°34'8.51"N	0°32'30.07"E
BAN	Banyuls	Francja	27	42°27'51.89"N	3°10'30.49"E
BGT	Bizerta Bay	Tunezja	30	37°16'36.70"N	9°53'58.20"E
BLT	Bizerta Lagoon	Tunezja	30	37°10'30.89"N	9°49'41.04"E
BOJ	Gargano, Boja	Włochy	30	41°21'27.56"N	16°17'15.81"E
BRI	Brindisi	Włochy	30	40°38'30.82"N	17°57'56.69"E
CAT	Catholica	Włochy	30	43°59'36.15"N	12°40'49.03"E
CHW	Istria	Chorwacja	35	45° 7'51.44"N	13°39'39.81"E
CIRP	Circumar Piccolo	Włochy	28	40°30'2.00"N	17°18'1.00"E
DUB	Dubrownik	Chorwacja	34	42°32'49.39"N	18°10'21.69"E
EGE	Porto Coufo	Grecja	29	39°57'49.00"N	23°55'19.00"E
GAE	Gulf of Gaeta	Włochy	30	41°13'39.84"N	13°34'6.72"E
GRK	Kassiopi	Grecja	30	39°47'31.32"N	19°54'12.66"E
GRM	Mazoma Lagoon	Grecja	30	39° 0'52.83"N	20°44'44.93"E
HER	Kreta, Heraklion	Grecja	30	35°20'40.96"N	25° 8'56.50"E

IMC	Oristano	Włochy	20	39°54'4.42"N	8°29'4.18"E
LAM2	Lampolla	Hiszpania	30	40°46'13.28"N	0°45'28.88"E
MAK	Makarska	Chorwacja	29	43°16'34.99"N	17° 0'51.84"E
MOM	Canakkale	Grecja	30	40° 9'21.17"N	26°24'28.28"E
NEA	Zatoka Neapol.	Włochy	30	40°46'44.64"N	14° 5'28.20"E
ORA1	Oran 1	Algeria	30	35°42'36.74"N	0°39'14.64"W
ORA4	Oran 4	Algeria	29	35°10'44.16"N	1°38'57.67"W
ORB	Orbetello	Włochy	25	42°26'21.00"N	11°13'14.00"E
PIST	Pisticci	Włochy	27	40°20'12.00"N	16°48'31.00"E
SAR	Saronikos Zat.	Grecja	30	37°35'39.64"N	23°16'58.52"E
SET	Sete	Francja	23	43°23'27.30"N	3°41'48.11"E
SGL	Santa Giusta Lagoon	Włochy	23	39°43'39.27"N	8°29'49.91"E
SIS	Sistiana	Włochy	31	45°46'19.19"N	13°35'11.26"E
TES	Saloniki	Grecja	30	40°38'1.23"N	22°52'31.97"E
TURK	Izmir	Turcja	18	38° 4'26.33"N	27° 1'19.61"E
VAL	Valencia	Hiszpania	29	39°26'57.08"N	0°18'39.11"W
SBRB	Słoneczny Brzeg	Bułgaria	29	42°41'58.74"N	27°43'3.38"E
BLS	Krym	Ukraina	30	44°29'0.82"N	34°12'18.92"E

<b>AZO</b>	Morze Azowskie	Ukraina	30	45°43'51.71"N	35° 5'0.26"E
<b>LID</b>	Lido	Włochy	32	45°30'25.42"N	12°38'30.04"E
<b>ORI</b>	Oristano	Włochy	29	39°47'59.88"N	8°31'9.72"E
<b>CAM</b>	Camarinal	Hiszpania	29	36°4'48.01"N	5°47'58.00"W
<b>CAS</b>	Cascais	Portugalia	30	38°34'14.89"N	9°19'8.95"W
<b>VIG</b>	Vigo	Hiszpania	30	42°13'54.12"N	8°45'7.22"W
<b>BID</b>	Bidasoa	Hiszpania	29	43°21'38.71"N	1°51'11.15"W
<b>CHA</b>	Charente	Francja	20	45°44'25.39"N	1°17'31.95"W
<b>LOI</b>	Loire	Francja	29	47°14'43.83"N	2°13'48.88"W
<b>MSMA</b>	Mont Saint Michel	Francja	30	48°39'0.06"N	1°31'40.26"W
<b>KKA</b>	Halifax	Kanada	28	44°30'33.79"N	63°29'24.91"W

Próby referencyjne zaznaczono pogrubioną czcionką (*M. galloprovincialis* Morze Śródziemne: AZO - Wenne i in., 2020, LID - Wenne i in., 2016, ORI - Zbawicka i in., 2018; *M. galloprovincialis* Ocean Atlantycki: CAM- Zbawicka i in., 2018, CAS i VIG- Wenne i in., 2020, BID - Wenne i in., 2016; *M. edulis*: CHA - Simon i in., 2021, Wenne i in., 2022b, LOI - Wenne i in., 2016, MSMA- Wenne i in., 2022b; *M. trossulus*: KKA- Zbawicka i in., 2018).

### **6.1.2 Walidacja SNP i równowaga Hardy'ego-Weinberga**

Celem oceny zastosowanych SNP użyto testu równowagi Hardy'ego-Weinberga (HWE; ang. Hardy-Weinberg equilibrium) oraz MAF (frekwencja rzadszego allelu; ang. minor allele frequency). Genotypowanie dla 53 SNP osiągnęło akceptowalny wynik jakościowy. Pośród 53 SNP użytych do genotypowania, 44 SNP (83,01%) były zlokalizowane w rejonach kodujących, z których trzy (5,66%) były niesynonimiczne, a cztery (7,54%) znajdowały się w rejonach niekodujących. Wartości MAF zawierały się w przedziale od 0,000 do 0,404 (BM32A) (Tabela 2). Większość loci była w równowadze Hardy'ego-Weinberga (HWE) we wszystkich populacjach. W dziesięciu populacjach (AGA, BLS, CHW, CIRP, MOM, ORA4, SBRB, TURK oraz referencyjne CAS i LOI) nie zaobserwowano SNP z odstępstwami od HWE. Tylko jedna populacja (VAL) miała trzy SNP, które nie były w równowadze HWE ( $P < 0,01$ ).



**Tabela 2.** Właściwości i zmienność genetyczna 53 SNP dla 44 populacji z *Mytilus*. Nie uwzględniono próby *M. trossulus* (KKA). *No.* – liczba prób dla których locus było polimorficzne.  $F_{ST}$  – współczynnik zróżnicowania genetycznego, wartość  $P < 0.05$  po poprawkach Benjamini–Yekutieli (B-Y) zaznaczono pogrubioną czcionką;  $H_o$  – heterozygotyczność obserwowana;  $F_{IS}$  – współczynnik inbredu; MAF – frekwencja rzadszego allele. Wartości  $F_{ST}$  istotne statystycznie przy  $p < 0,05$  oznaczono pogrubioną czcionką.

	Locus	Gen	Rejon	Podstawienie	Allel	$F_{ST}$	$H_o$	$F_{IS}$	No.	MAF	GenBank	Publikacja
1	BM101A	Ribosomal protein L7a	kodujący	synon	A/T	<b>0,957</b>	0,159	0,210	5	0,004	KT713378	Wenne i in. 2016
2	BM102A	Proteasome subunit beta type-6-like	kodujący	synon	C/T	<b>0,049</b>	0,295	-0,043	44	0,180	KT713379	Wenne i in. 2016
3	BM103B	Proteasome subunit beta type-5-like	kodujący	nonsyn	A/G	<b>0,736</b>	0,032	0,054	1	0,006	KT713380	Wenne i in. 2016
4	BM105A	UnKnown	NA	NA	A/G	<b>0,110</b>	0,492	0,326	43	0,383	KT713381	Wenne i in. 2016
5	BM106B	UnKnown	NA	NA	A/G	<b>0,088</b>	0,217	0,996	31	0,127	KT713382	Wenne i in. 2016
6	BM10B	Ribosomal protein S20	kodujący	synon	A/C	<b>0,805</b>	0,035	0,027	1	0,004	KJ871040	Zbawicka i in. 2014
7	BM116A	ATP synthase beta subunit	kodujący	synon	A/C	<b>0,965</b>	0,047	0,000	2	0,001	KT713387	Wenne i in. 2020
8	BM118A	UnKnown	NA	NA	A/G	<b>0,028</b>	0,274	0,017	44	0,165	KT713388	Wenne i in. 2016
9	BM11A	Ribosomal protein L22	kodujący	synon	A/G	<b>0,931</b>	0,045	-0,008	3	0,001	KJ871041	Zbawicka i in. 2014
10	BM121A	Ribosomal protein L30	kodujący	synon	A/T	0,000	0,001	0,000	1	0,000	KT713389	Wenne i in. 2020

11	BM12A	Ribosomal protein L23a	kodujący	synon	C/T	<b>0,750</b>	0,044	-0,060	7	0,006	KJ871042	Zbawicka i in. 2014
12	BM12C	Ribosomal protein L23a	kodujący	synon	C/T	<b>0,235</b>	0,482	0,034	45	0,254	KJ871042	Wenne i in. 2016
13	BM147A	UnKnown	NA	NA	C/T	<b>0,114</b>	0,312	0,048	43	0,173	KT713383	Wenne i in. 2016
14	BM16B	ribosomal protein L21	kodujący	synon	C/T	<b>0,021</b>	0,396	0,044	45	0,271	KJ871044	Wenne i in. 2016
15	BM17B	Ribosomal protein L7a	kodujący	synon	A/G	0,516	0,090	0,089	15	0,051	KJ871045	Zbawicka i in. 2014
16	BM201B	<i>H4 histone</i> gene	niekodujący	NA	A/C	<b>0,667</b>	0,032	0,616	3	0,007	AY267750. 1	Zbawicka i in. 2012
17	BM201C	<i>H4 histone</i> gene	kodujący	synon	G/T	<b>0,214</b>	0,417	0,001	43	0,214	AY267750. 1	Zbawicka i in. 2012
18	BM202A	<i>H3 histone</i> gene	niekodujący	NA	A/C	1,000	1,000	0,000	0	0,000	AY267749. 1	Zbawicka i in. 2012
19	BM202B	<i>H3 histone</i> gene	kodujący	synon	A/T	1,000	1,000	0,000	0	0,000	AY267749. 1	Zbawicka i in. 2012
20	BM203B	<i>H2B histone</i> gene	niekodujący	NA	C/T	<b>0,193</b>	0,442	0,054	43	0,262	AY267742. 1	Zbawicka i in. 2012
21	BM203D	<i>H2A histone</i> gene	niekodujący	NA	A/T	1,000	1,000	0,000	0	0,000	AY267757 .1	Zbawicka i in. 2012
22	BM204A	<i>p53</i>	kodujący	synon	C/T	<b>0,104</b>	0,498	-0,006	44	0,366	DQ865151	Zbawicka i in. 2012

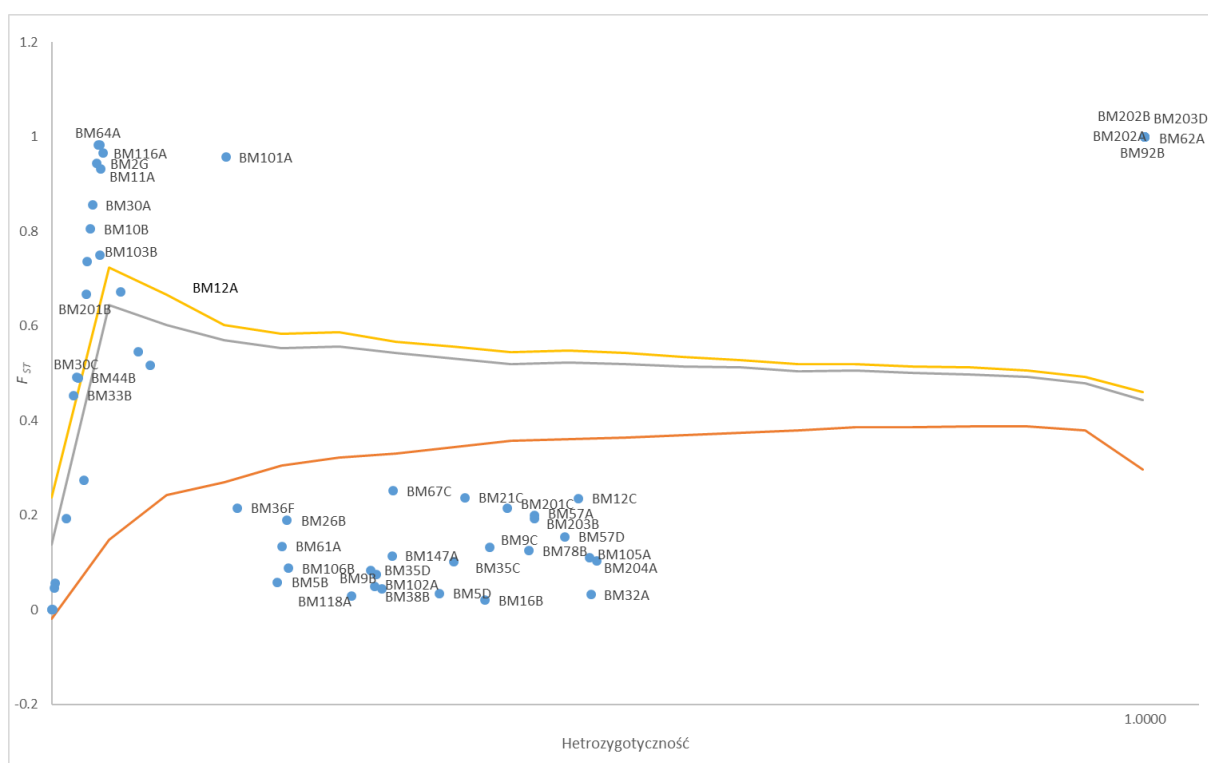
23	BM21B	qm-like protein	kodujący	nonsyn	C/G	<b>0,982</b>	0,043	0,000	1	0,000	KJ871047	Zbawicka i in. 2014
24	BM21C	qm-like protein	kodujący	synon	A/C/T	<b>0,237</b>	0,378	-0,035	45	0,080	KJ871047	Zbawicka i in. 2014
25	BM26B	UnKnown13	NA	NA	A/T	<b>0,190</b>	0,215	0,000	39	0,101	KJ871050	Zbawicka i in. 2014
26	BM2G	UnKnown05	kodujący	synon	G/T	<b>0,944</b>	0,041	-0,041	1	0,001	KJ871032	Zbawicka i in. 2014
27	BM30A	Ribosomal protein l17	kodujący	synon	A/G	<b>0,855</b>	0,037	-0,149	1	0,003	KJ871052	Zbawicka i in. 2014
28	BM30C	Ribosomal protein l17	kodujący	synon	A/T	<b>0,491</b>	0,023	0,082	2	0,011	KJ871052	Zbawicka i in. 2014
29	BM32A	ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 6	kodujący	synon	A/G	<b>0,032</b>	0,493	0,406	45	0,404	KT713371	Wenne i in. 2016
30	BM33B	Cytochrome c oxidase subunit IV	kodujący	synon	A/T	<b>0,453</b>	0,020	-0,327	1	0,010	KJ871054	Zbawicka i in. 2014
31	BM35C	Ribosomal protein L7	kodujący	synon	A/T	<b>0,102</b>	0,368	0,036	45	0,218	KJ871055	Wenne i in. 2016
32	BM35D	Ribosomal protein L7	kodujący	synon	A/G	<b>0,084</b>	0,292	0,128	43	0,168	KJ871055	Zbawicka i in. 2014
33	BM36F	ribosomal protein S3a	kodujący	synon	A/C	<b>0,215</b>	0,170	-0,003	44	0,071	KT713373	Wenne i in. 2016
34	BM38B	ribosomal protein S8e	kodujący	synon	A/G	<b>0,045</b>	0,302	0,054	45	0,175	KT713368	Wenne i in. 2016

35	BM44B	ubiquitin/ribosomal protein S27a	kodujący	synon	A/G	0,490	0,025	0,430	3	0,011	KJ871057	Zbawicka i in. 2014
36	BM50B	CoA-binding protein	kodujący	synon	A/G	0,056	0,003	-0,059	1	0,002	KJ871059	Zbawicka i in. 2014
37	BM54A	ETC_C1_NDUFA4	kodujący	synon	A/G	0,672	0,063	0,065	20	0,010	KJ871060	Zbawicka i in. 2014
38	BM57A	NADH-ubiquinone oxidoreductase	kodujący	nonsyn	C/T	<b>0,199</b>	0,442	0,028	43	0,240	KT713374	Wenne i in. 2016
39	BM57D	NADH-ubiquinone oxidoreductase	kodujący	synon	A/C	<b>0,155</b>	0,470	-0,003	44	0,290	KT713374	Wenne i in. 2016
40	BM5B	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	A/G	<b>0,058</b>	0,207	0,023	39	0,116	KJ871035	Wenne i in. 2016
41	BM5D	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	C/T	<b>0,035</b>	0,355	-0,004	45	0,231	KJ871035	Zbawicka i in. 2014
42	BM60A	UnKnown08	kodujący	synon	A/G	0,192	0,013	0,051	4	0,007	KJ871063	Zbawicka i in. 2014
43	BM61A	Ribosomal_L1	kodujący	synon	C/T	<b>0,134</b>	0,211	0,037	43	0,119	KT713375	Wenne i in. 2016
44	BM62A	Ribosomal L13e	kodujący	synon	A/G	1,000	1,000	0,000	0	0,000	KJ871064	Zbawicka i in. 2014
45	BM64A	Ribosomal protein L35	kodujący	synon	C/T	<b>0,982</b>	0,044	0,001	1	0,000	KJ871065	Zbawicka i in. 2014
46	BM67C	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	A/T	<b>0,252</b>	0,312	0,226	45	0,157	KJ871066	Wenne i in. 2016

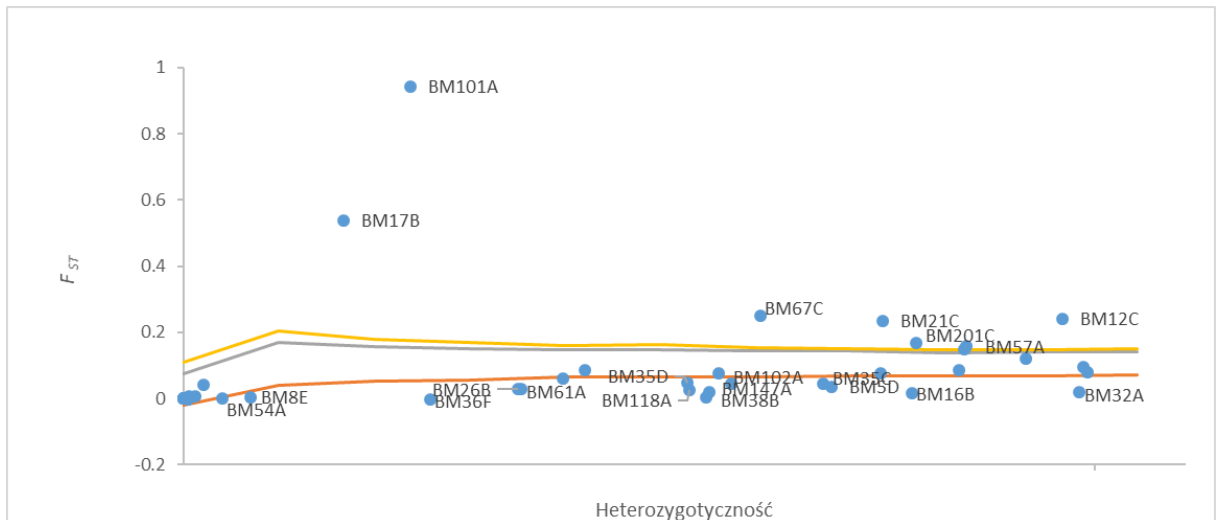
47	BM6C	EFG_N	kodujący	synon	C/T	0,273	0,029	0,124	7	0,015	KJ871036	Zbawicka i in. 2014
48	BM75C	UBA_UBA-TS-N_domain	kodujący	synon	C/G	0,047	0,003	-0,049	1	0,001	KT713370	Wenne i in. 2016
49	BM78B	UnKnown12	kodujący	synon	A/G	<b>0,125</b>	0,437	0,062	45	0,267	KJ871069	Zbawicka i in. 2014
50	BM8E	Ribosomal protein L3	kodujący	synon	A/G	0,546	0,079	0,067	27	0,018	KJ871038	Zbawicka i in. 2014
51	BM92B	UnKnown06	kodujący	synon	A/T	1,000	1,000	0,000	0	0,000	KJ871074	Zbawicka i in. 2014
52	BM9B	Ribosomal protein S2	kodujący	synon	A/G	<b>0,075</b>	0,297	0,037	45	0,174	KJ871039	Zbawicka i in. 2014
53	BM9C	Ribosomal protein S2	kodujący	synon	A/C/T	<b>0,132</b>	0,401	0,031	45	0,055	KJ871039	Zbawicka i in. 2014

### 6.1.3 Wykrywanie odstających i wysoce informatywnych SNP

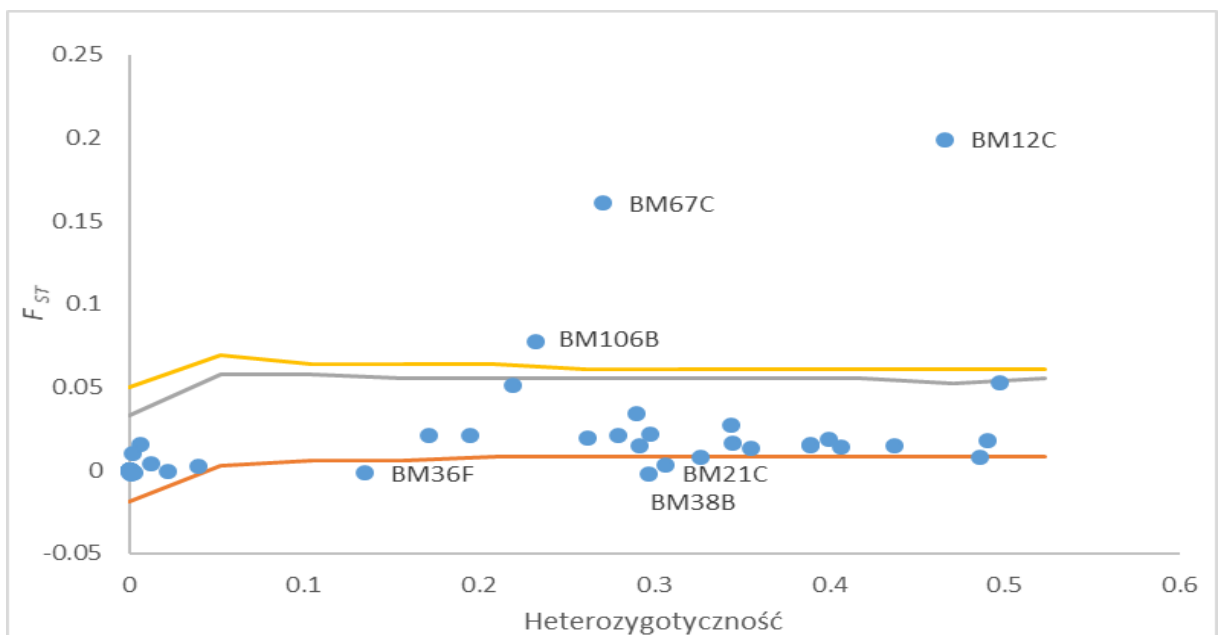
Osiemnaście SNP było istotnych statystycznie w różnicowaniu *M. trossulus* od innych taksonów (BM33B, BM44B, BM30C, BM201B, BM12A, BM103B, BM10B, BM30A, BM11A, BM2G, BM101A, BM116A, BM64A, BM62A, BM92B, BM202A, BM202B, BM203D) (Rysunek 7). Referencyjną próbę *M. trossulus* wykluczono z dalszej analizy i zidentyfikowano siedem odstających SNP różnicujących *M. edulis* od *M. galloprovincialis* (BM101A, BM12C, BM17B, BM21C, BM201C, BM57A, BM67C) (Rysunek 8). Po wykluczeniu próby *M. edulis* wykonano analizę dla populacji *M. galloprovincialis*, w której uzyskano SNP różnicujące próby w obrębie jednego gatunku (BM12C, BM67C, BM106B) (Rysunek 9).



**Rysunek 7.** Wykrywanie loci odstających różnicujących 45 prób. Rozkład wartości  $F_{ST}$  jako funkcja heterozygotyczności w neutralnym modelu dla 53 analizowanych SNP. SNP, które miały wartość  $F_{ST}$  powyżej wartości 0,95 lub poniżej 0,05 (górne i dolne ciągłe linie) były identyfikowane jako loci odstające.



**Rysunek 8.** Wykrywanie loci odstających różnicujących 44 próby (wyłączając z analizy *M. trossulus*). Rozkład wartości  $F_{ST}$  jako funkcja heterozygotyczności w neutralnym modelu dla 53 analizowanych SNP.



**Rysunek 9.** Wykrywanie loci odstających różnicujących 35 prób *M. galloprovincialis*. Rozkład wartości  $F_{ST}$  jako funkcja heterozygotyczności w neutralnym modelu dla 53 analizowanych SNP.

#### 6.1.4 Różnorodność genetyczna

Odsetek polimorficznych loci ( $P_o$ ) w *M. galloprovincialis* wahał się od 45% dla próby z Maroka (AGA) i Turcji (TURK) do 56,60% w Chorwacji (DUB) i próbach referencyjnych IMC (Włochy) (Tabela 3). Obserwowana heterozygotyczność ( $H_o$ ) dla 53 loci w 45 populacjach była niższa niż oczekiwano ( $H_e$ ), z wyjątkiem dwóch próbek: ORA1 i BLS (Tabela 3). Najwyższe wartości  $H_o$  wahały się od 0,310 do 0,327, które odnotowano w TURK, ORA1, AGA i ORA4. Najwyższe wartości heterozygotyczności oczekiwanej ( $H_e$ ) zaobserwowano w SET, TURK i AGA (odpowiednio 0,327, 0,328 i 0,341), natomiast najniższe wartości zaobserwowano w PIST i TES (0,278 i 0,287). Średni wewnątrzpopulacyjny wskaźnik  $F_{IS}$  (uśredniony dla wszystkich loci polimorficznych dla 45 prób) wyniósł 0,069. Dla siedmiu próbek (GRM, SIS, CIRP, GAR, BAN, VAL i *M. trossulus* KKA) istotne wartości  $F_{IS}$  wskazywały na nadmiar homozygot (Tabela 3), co może wskazywać na związek między osobnikami w populacji, wynikający z poboru kilkudziesięciu spokrewnionych osobników z niewielkiego obszaru.



**Tabela 3.** Parametry genetyczne dla 45 prób *Mytilus*: % loci polimorficznych ( $P_O$ ), heterozygotyczność obserwowana i spodziewana ( $H_O$  i  $H_E$ ), liczba loci odstających od równowagi HWE,  $P < 0.01$  ( $P$ ), współczynnik inbredu ( $F_{IS}$ ).

Nazwa próby	$P_O$	$H_O$	$H_E$	Poziom zróżnicowania genetycznego dla loci	Średnia liczba różnic między parami w obrębie populacji	Liczba loci z odstępstwami do HWE ( $P < 0,01$ )	$F_{IS}$
AGA	45,00	0,318	0,341	0,138	7,544	0	0,030
ALC	52,82	0,268	0,311	0,136	7,912	2	<b>0,117</b>
BAN	50,94	0,261	0,316	0,142	8,056	2	<b>0,157</b>
BGT	54,71	0,291	0,316	0,149	8,575	2	0,048
BLT	54,71	0,293	0,319	0,161	8,950	2	0,066
BOJ	52,82	0,251	0,305	0,138	7,938	1	<b>0,150</b>
BRI	52,82	0,276	0,298	0,140	7,879	2	0,053
CAT	52,82	0,275	0,309	0,135	7,674	2	0,076
CHW	50,94	0,284	0,292	0,134	6,867	0	-0,032
CIRP	49,05	0,261	0,311	0,132	7,681	0	<b>0,147</b>

DUB	56,60	0,254	0,277	0,131	7,434	2	0,027
EGE	50,94	0,254	0,286	0,126	7,198	1	<b>0,086</b>
GAE	52,82	0,295	0,319	0,145	8,347	2	0,042
GRK	52,82	0,263	0,297	0,145	8,045	1	0,102
GRM	50,94	0,263	0,314	0,139	7,890	2	<b>0,136</b>
HER	52,82	0,272	0,301	0,147	8,446	1	0,082
IMC	56,60	0,257	0,285	0,155	8,508	1	<b>0,097</b>
LAM2	52,82	0,265	0,293	0,138	7,633	1	0,067
LID	54,71	0,275	0,309	0,140	8,102	2	0,072
MAK	50,94	0,288	0,308	0,145	7,903	1	0,040
MOM	50,90	0,252	0,290	0,131	7,622	0	<b>0,110</b>
NEA	52,82	0,291	0,317	0,154	8,556	1	0,066
ORA1	52,82	0,327	0,318	0,150	8,376	1	-0,060
ORA4	50,94	0,316	0,317	0,139	8,075	0	-0,025

ORB	50,94	0,268	0,300	0,136	7,523	1	0,076
ORI	49,05	0,289	0,310	0,126	7,508	1	0,032
PIST	54,71	0,255	0,278	0,141	7,755	1	0,065
SAR	50,94	0,276	0,302	0,138	7,741	1	0,067
SET	50,94	0,296	0,327	0,145	8,161	1	0,064
SGL	52,82	0,276	0,316	0,156	8,564	1	<b>0,114</b>
SIS	52,82	0,247	0,295	0,141	7,840	1	<b>0,142</b>
TES	50,94	0,255	0,287	0,132	7,412	2	0,088
TURK	45,28	0,310	0,328	0,132	7,337	0	0,032
VAL	54,71	0,231	0,281	0,136	7,700	3	<b>0,161</b>
MSMA	50,94	0,226	0,245	0,072	5,630	1	-0,007
LOI	49,05	0,224	0,244	0,109	5,978	0	0,061
CHA	41,51	0,257	0,281	0,108	5,954	2	0,061
BID	50,94	0,319	0,338	0,152	8,713	1	0,035

VIG	54,71	0,279	0,309	0,149	8,644	2	0,084
CAS	52,82	0,270	0,298	0,146	8,004	0	0,077
CAM	47,17	0,318	0,341	0,143	8,108	1	0,044
SBRB	47,17	0,277	0,307	0,119	6,969	0	0,056
BLS	49,05	0,295	0,289	0,131	7,246	0	-0,040
AZO	50,94	0,274	0,275	0,133	7,293	1	-0,006
KKA	62,26	0,199	0,245	0,130	7,343	2	<b>0,146</b>

### 6.1.5 Zróżnicowanie populacji

Średnie różnice w parach w obrębie populacji *M. galloprovincialis* wykazały, że najbardziej zróżnicowaną próbą jest BLT z Tunezji, a najmniej zróżnicowaną CHW z Chorwacji. Wśród prób referencyjnych największe zróżnicowanie zaobserwowano w próbie atlantyckiej *M. galloprovincialis* BID z Hiszpanii, natomiast najmniejsze w próbie *M. edulis* MSMA z Francji. Te same próby wykazały najwyższą i najmniejszą różnorodność genów (Tabela 3).

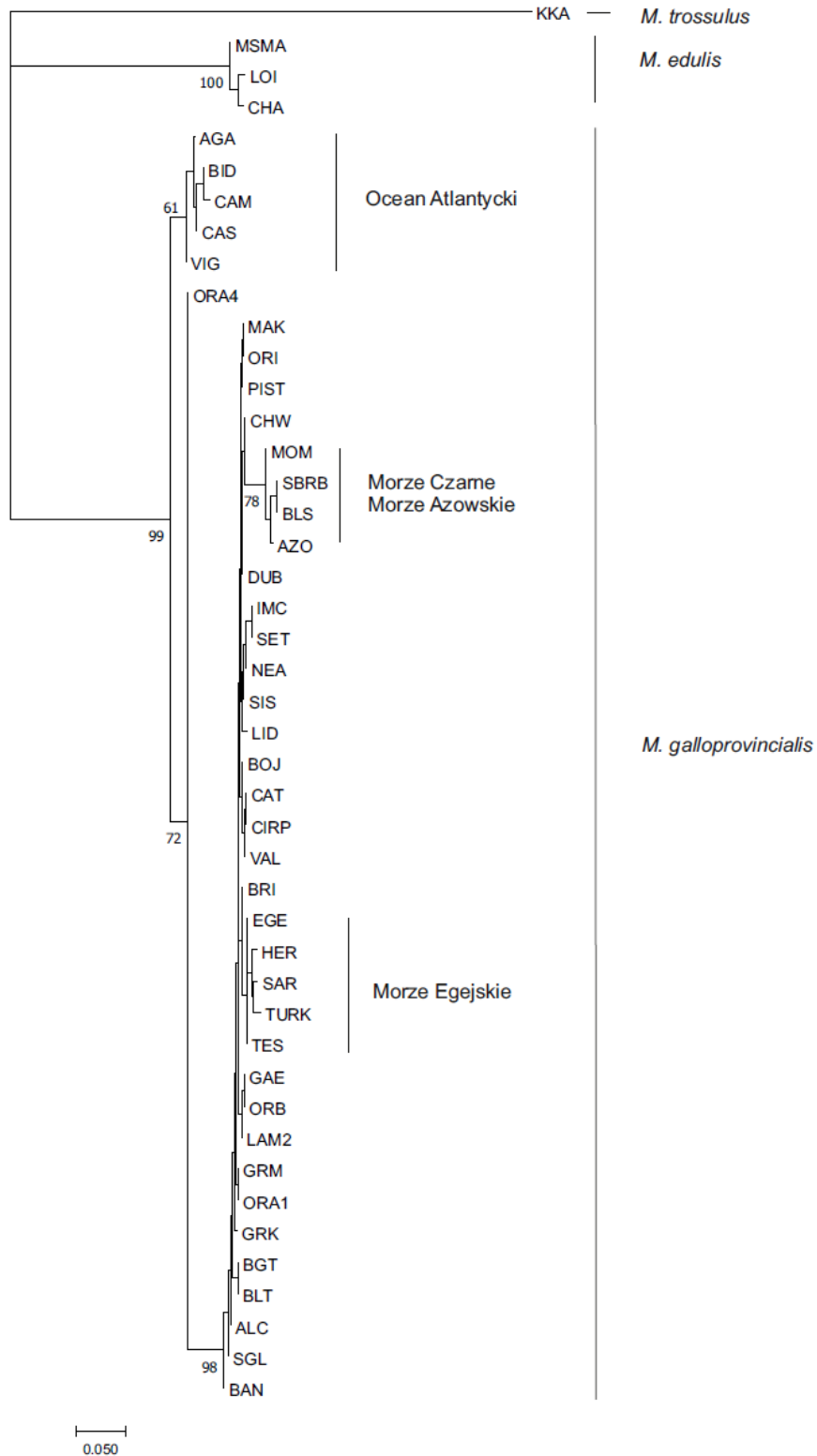
Porównanie wartości  $F_{ST}$  wśród wszystkich prób dla 53 SNP wskazało, że wiele populacji różniło się znacząco od siebie ( $P < 0,05$  po korekcie Benjamini-Yekutieli). Statystycznie istotne zróżnicowanie genetyczne zostało potwierdzone między próbą referencyjną *M. trossulus* (KKA) a próbami referencyjnymi Atlantyckiego *M. galloprovincialis* (BID, VIG, CAS i CAM) oraz *M. edulis* (MSMA, LOI i CHA). Istotnie statystycznie wysokie zróżnicowanie genetyczne wykazały próby *M. galloprovincialis* AGA, MOM i ORA4. Stwierdzono niski, ale statystycznie istotny poziom zróżnicowania między próbami z Morza Egejskiego i Morza Czarnego. Najwyższe wartości  $F_{ST}$  zaobserwowano porównując SBRB (Morze Czarne) z SAR ( $F_{ST} = 0,081$ ) i TURK ( $F_{ST} = 0,094$ ). Wartości różnorodności genetycznej dla prób z Morza Egejskiego i Morza Czarnego są istotnie statystycznie w porównaniu z próbami śródziemnomorskimi, gdzie najwyższą wartość zaobserwowano dla pary TURK i SGL (Laguna Santa Giusta, Włochy) i wyniosła 0,065. Większość pozostałych wartości  $F_{ST}$  wynosiła poniżej 0,03. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dla MOM (Dardanelle Strait) i prób z Morza Czarnego (SBRB, BLS, AZO), natomiast zaobserwowano zróżnicowanie MOM oraz prób z Morza Egejskiego: MOM-HER (0,050), MOM-SAR (0,043), MOM-TES (0,032) i MOM-TURK (0,060). W przypadku porównania parami MOM-EGE wartość  $F_{ST}$  nie różniła się istotnie statystycznie, co wskazuje na brak zróżnicowania genetycznego.

Analiza drzewa najbliższego sąsiada (NJ) potwierdziła znaczące różnice między populacjami *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* i *M. edulis*, które odpowiadały jednej próbie *M. trossulus* (KKA), trzem próbom *M. edulis* (MSMA, LOI, CHA) oraz 41 pozostałym próbom *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i Oceanu Atlantyckiego (Rysunek 10). Topologię drzewa wsparło 99 procent replikacji *bootstrap*. Osobną grupę stanowiły próby referencyjne z Oceanu Atlantyckiego *M.*

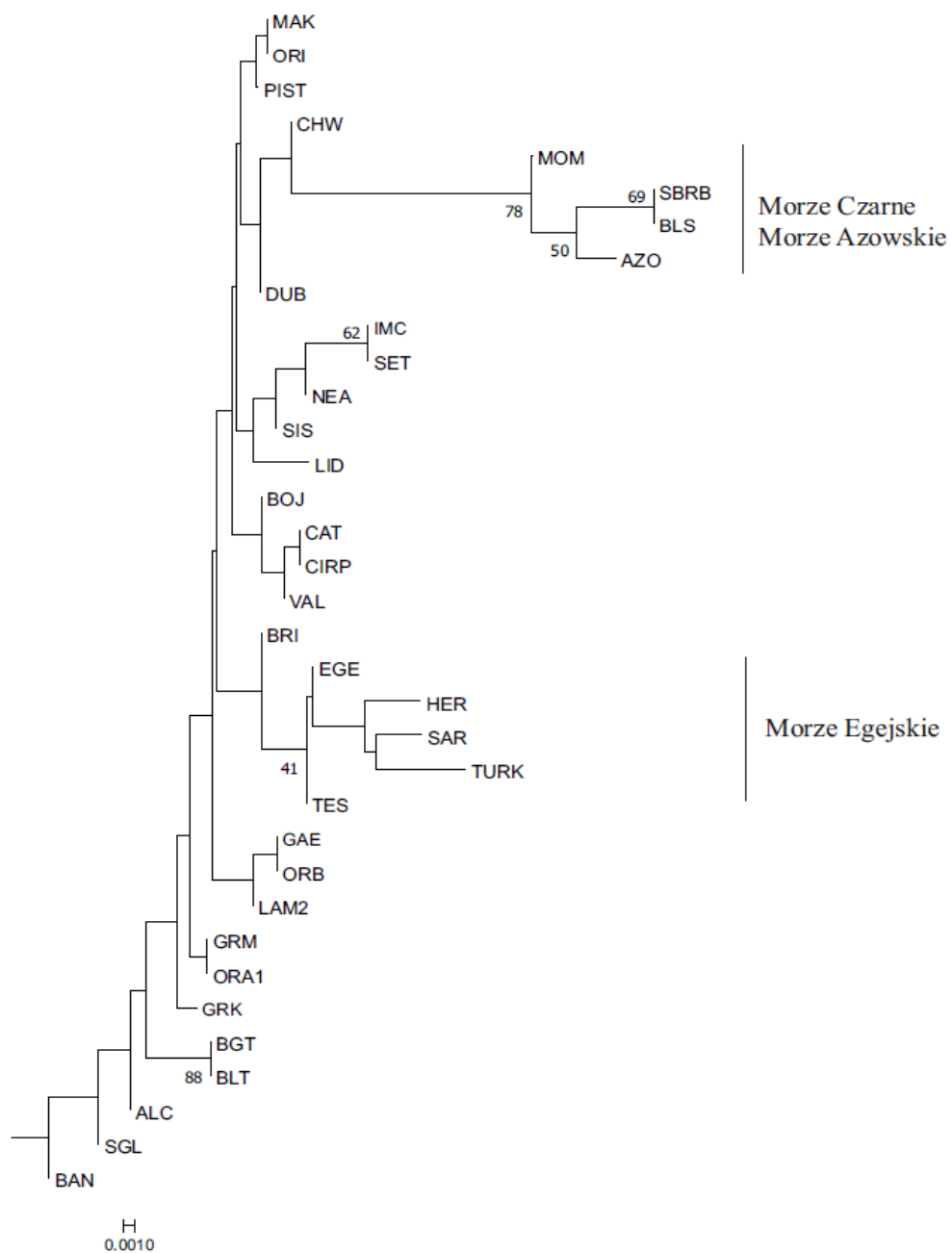
*galloprovincialis* (BID, CAM, CAS i VIG) oraz próba marokańska (AGA). W obrębie *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego wyróżniono dwie gałęzie drzewa: pierwsza obejmowała próby z Morza Azowskiego, Morza Czarnego i Morza Marmara (MOM, SBRB, BLS, AZO), a druga z wód wokół Morza Egejskiego (EGE, HER, SAR, TURK, TES) (Rysunek 11). Stwierdzono, że te dwa skupiska odpowiadają grupom wynikającym z analizy korespondencji (CA) (Rysunek 12). Próba z Algierii (ORA4) znajdowała się pomiędzy dwiema głównymi grupami *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i Oceanu Atlantyckiego. Próby z Tunezji utworzyły grupę z próbami z północno-zachodniego Morza Śródziemnego.

Analiza CA 41 prób *M. galloprovincialis* (z których 7 to próby referencyjne) wykazała wyraźne oddzielenie prób z Oceanu Atlantyckiego, prób z Morza Czarnego i Morza Azowskiego oraz trzeciej grupy obejmującej wszystkie inne próby, z wyjątkiem ORA4, która znajdowała się pomiędzy grupami z Oceanu Atlantyckiego i Morza Śródziemnego (Rysunek 13).

Analiza korespondencji (CA) przeprowadzona dla 34 prób obejmująca 3 próby referencyjne (LID, ORI, AZO) pozwoliła na wyodrębnienie trzech grup: *M. galloprovincialis* z Morza Czarnego i Azowskiego, *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i *M. galloprovincialis* z Morza Egejskiego (Rysunek 14).

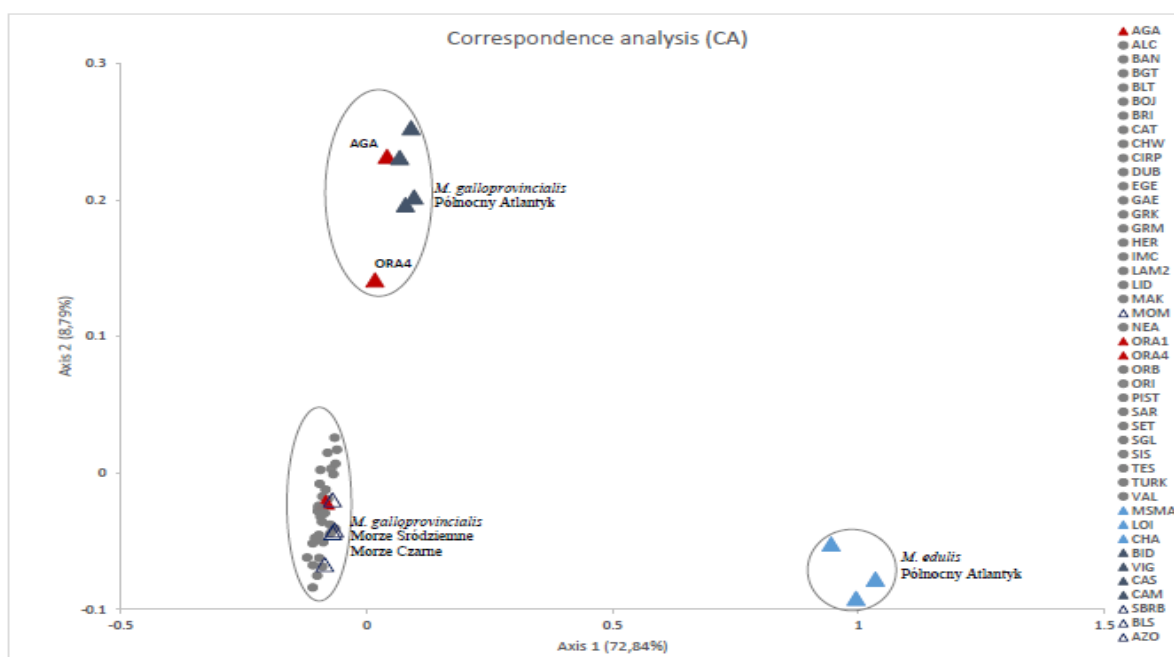


**Rysunek 10.** Drzewo zależności genetycznej NJ dla 45 prób z rodzaju *Mytilus* skonstruowane na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości) (Tabela 9). Wartości poparcia *bootstrap* są wyświetlane w procentach.

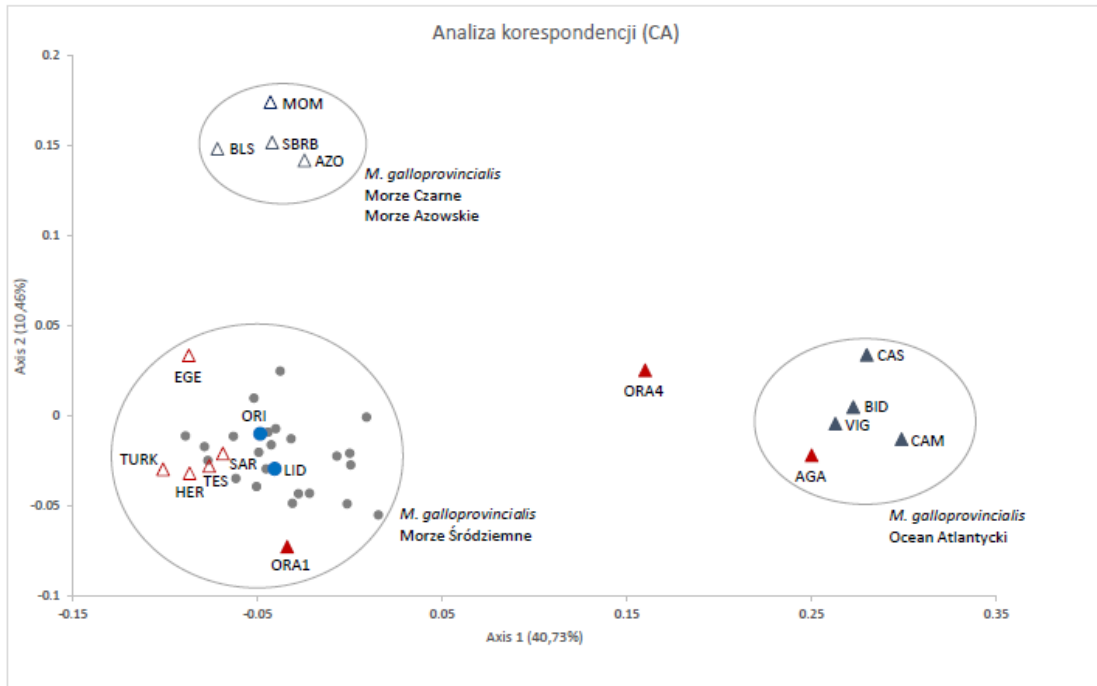


**Rysunek 11.** Drzewo zależności genetycznej NJ dla 35 prób *M. galloprovincialis* (wyłączając z analizy *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego, *M. edulis* i *M. trossulus*) skonstruowane na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości). Wartości poparcia *bootstrap* są wyświetlane w procentach.

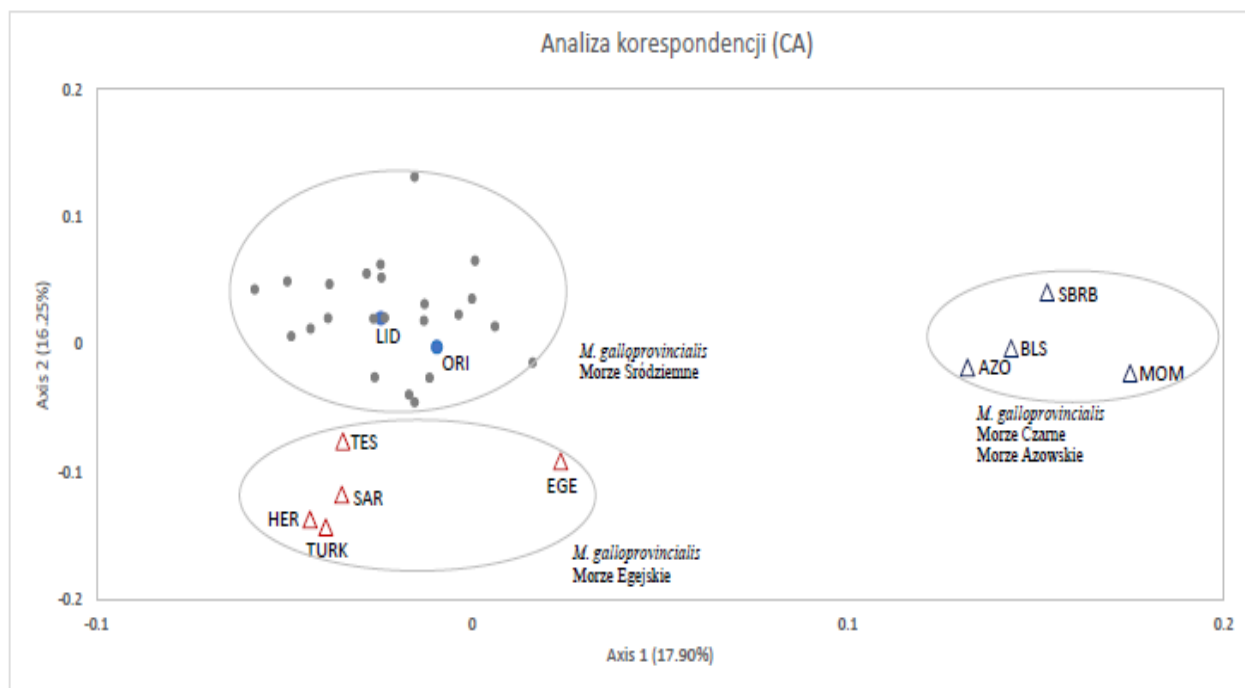




**Rysunek 12.** Analiza korespondencji (CA) obliczona na podstawie danych (Axis 1 i Axis 2) SNP dla 34 prób *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i Oceanu Atlantyckiego oraz prób referencyjnych *M. galloprovincialis* z Morza Czarnego i wybrzeża Oceanu Atlantyckiego oraz prób referencyjnych *M. edulis* z wybrzeża Oceanu Atlantyckiego. Próbkę z Maroka (AGA – Ocean Atlantycki) i Algierii (ORA1 i ORA4 – Morze Śródziemne) są pokazane jako czerwone wypełnione trójkąty, próbki z Morza Czarnego i Morza Azowskiego (AZO, BLS, SBRB i MOM) oznaczono granatowymi trójkątami. MSMA, LOI, CHA są próbkami referencyjnymi (jasnoniebieskie wypełnione trójkąty). Każdy punkt lub trójkąt jest jedną badaną próbą.



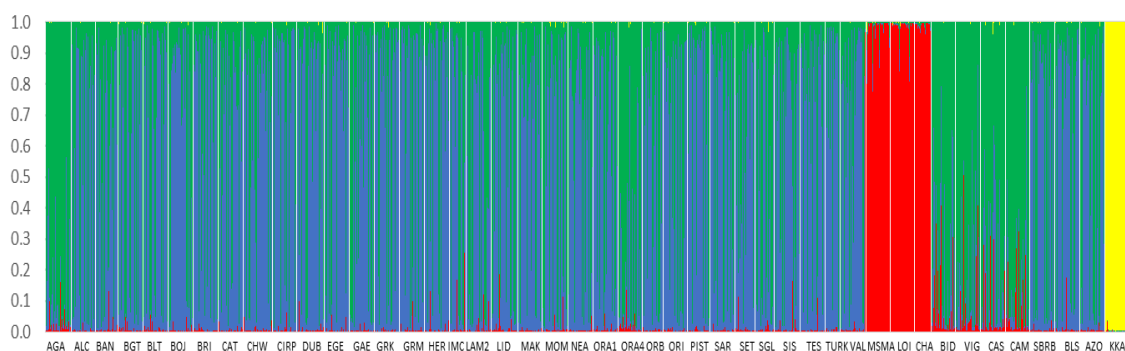
**Rysunek 13.** Analiza korespondencji (CA) obliczona na podstawie danych SNP dla 34 próbek *M. galloprovincialis* z południowej Europy (Morza Śródziemnego, Morza Czarnego i Oceanu Atlantyckiego) oraz 7 próbek referencyjnych. Próbkę z Maroka i Algerii oznaczone są czerwonymi trójkątami, próbki z regionu Morza Egejskiego (EGE, HER, SAR, TES, TURK) są pokazane jako czerwone niewypełnione trójkąty, próbki z Morza Czarnego i Morza Azowskiego (BLS, SBRB i MOM) oznaczono granatowymi trójkątami. LID i ORI (niebieskie wypełnione kropki), AZO (granatowy niewypełniony trójkąt) oraz BID, CAM, CAS i VIG (granatowe wypełnione trójkąty) są próbkami referencyjnymi. Każda kropka lub trójkąt to jedna z badanych próbek.



**Rysunek 14.** Analiza korespondencji (CA) obliczona na podstawie danych SNP dla 31 prób *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i Morza Egejskiego (EGE, HER, SAR, TES, TURK), Morza Czarnego i Morza Azowskiego (BLS, SBRB i MOM) oraz 3 prób referencyjnych: LID, ORI (niebieskie wypełnione kropki), AZO (granatowy niewypełniony trójkąt). Każda kropka lub trójkąt to jedna z badanych prób.

### 6.1.6 Struktura populacji

Analiza STRUKTURY dla 45 prób *Mytilus* wykazała największy wzrost  $\text{LnP}(D)$  dla  $K = 2$ , a następnie dla  $K = 3$  i  $K = 4$ . Najistotniejszy podział wykryto przy  $K = 2$ , gdzie klastry odpowiadające próbie *M. trossulus* zostały oddzielone od prób *M. galloprovincialis* i *M. edulis*. Przy  $K = 3$  (następowało rozdzielenie *M. galloprovincialis* i *M. edulis*). Natomiast dla  $K=4$  oprócz grupy *M. trossulus* zostały wyodrębnione *M. edulis* i dwie oddzielne grupy *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i Oceanu Atlantyckiego (Rysunek 15). Analiza STRUCTURE przy  $K = 4$ , wykazała, że większość osobników prawidłowo przypisano do ich pierwotnych populacji z  $q > 0,8$ . Małże pobrane z Maroka (AGA) i Algierii (ORA4) wykazywały domieszkę genów charakterystyczną dla grup referencyjnych *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego (BID, VIG, CAS i CAM). Druga próbka z Algierii (ORA1), wykazała udział genów charakterystycznych dla prób *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego.



**Rysunek 15.** Wykres strukturalny dla 45 badanych prób ( $K = 4$ ). Każdy osobnik jest reprezentowany przez pojedynczą pionową linię podzieloną na cztery kolorowe segmenty, o długościach proporcjonalnych do każdego z  $K$  wywnioskowanych klastrow. Skróty badanych prób podano w tabeli 1. Pionowe białe linie oddzielają populacje. Obecność *M. trossulus* w badanym rejonie wykluczono.

## 6.2 Polimorfizm genetyczny populacji *M. galloprovincialis* z wybrzeży Południowej Afryki

### 6.2.1 Materiał

Na Rysunku 16 przedstawiono miejsca poboru prób z południowych wybrzeży Afryki Oceanu Atlantyckiego i Oceanu Indyjskiego. Lista prób z Południowej Afryki i użytych prób referencyjnych została przedstawiona w Tabeli 4.



**Rysunek 16.** Lokalizacje 6 prób *Mytilus* z Południowego Atlantyku oraz Oceanu Indyjskiego (Google Earth Pro). Nazwy prób oraz ich współrzędne geograficzne przedstawiono w Tabeli 4.

**Tabela 4.** Lista prób *Mytilus*, liczby badanych osobników (*No.*) oraz współrzędne poboru prób. Próby referencyjne oznaczono pogrubioną czcionką.

Próba	Miejsce	Kraj	<i>No.</i>	Współrzędne	
BSR	Blouberg Strand	RPA	32	33°48'47.82"S	18°27'55.08"E
PNR	Port Nolloth	RPA	32	29°16'7.79"S	16°51'49.02"E
SBR	Saldanha Bay	RPA	26	33° 1'37.64"S	18° 1'27.32"E
CFR	Cape St francis	RPA	31	34°12'11.43"S	24°50'21.15"E
KBR	Kaysers Beach	RPA	32	33°15'3.87"S	27°35'21.70"E
SKR	Skoenmakerskop	RPA	33	34° 2'50.62"S	25°32'42.28"E
<b>IRD</b>	Indian River Inlet, Delaware,	Stany Zjednoczone	25	36°52'6.19"N	75°58'2.16"W
<b>LOI</b>	Loire	Francja	30	47°14'43.83"N	2°13'48.88"W
<b>AGA</b>	Agadir	Maroko	31	30°18'3.36"N	9°48'56.60"W
<b>BID</b>	Bidasoa	Hiszpania	30	43°21'38.71"N	1°51'11.15"W
<b>CAM</b>	Punta Camarinal	Hiszpania	29	36°4'48.01"N	5°47'58.00"W
<b>ORI</b>	Oristano	Włochy	26	39°47'59.88"N	8°31'9.72"E
<b>AZO</b>	Ukraina	Ukraina	30	45°43'51.71"N	35° 5'0.26"E
<b>KKA</b>	Halifax	Kanada	28	44°30'33.79"N	63°29'24.91"W
<b>AKAR</b>	Akaroa	Nowa Zelandia	30	43°40'19" S	172°57'54" E
<b>CHT</b>	Chiloe	Chile	20	42°24'0.54"S	74°10'48.49"W

<b>COM</b>	Comodoro Rivadavia	Argentyna	35	45°56'00"S	67°32'0.00"W
------------	--------------------	-----------	----	------------	--------------

Próby referencyjne: *M. trossulus*- KAA; *M. edulis*- IRD, LOI; Morze Śródziemne *M. galloprovincialis*- ORI, AZO, Ocean Atlantycki *M. galloprovincialis*- AGA, BID, CAM; *M. planulatus*- AKAR; *M. chilensis*- CHT; *M. platensis*- COM.

### **6.2.1 Charakterystyka SNP**

Analiza wyników genotypowania 55 SNP została przeprowadzona dla 500 osobników z rodzaju *Mytilus* uzyskanych z 6 lokalizacji z Południowego Atlantyku i Oceanu Indyjskiego pobranych w 2012 roku (BSR, PNR, SBR, CFR, KBR, SKR) i 11 prób referencyjnych (IRD, LOI, AGA, BID, CAM, ORI, AZO, KKA, AKAR, CHT, COM). Spośród 55 SNP 46 (83,6%) znajdowało się w regionach kodujących, wśród których tylko 3 były niesynonimiczne, a 9 (16,4%) znajdowało się w regionach niekodujących (Tabela 5).



**Tabela 5.** Właściwości 55 loci SNP, lokalizacja genomu, typ podstawienia, wariant alleliczny, numer dostępu GenBank i wspierające odniesienie.

	Locus	Gen	Rejon	Podstawienie	Allele	GenBank	Publikacja
1	BM101A	Ribosomal protein L7a	kodujący	synon	A/T	KT713378	Wenne i in., 2016
2	BM102A	Proteasome subunit beta type-6-like	kodujący	synon	C/T	KT713379	Wenne i in., 2016
3	BM103B	Proteasome subunit beta type-5-like	kodujący	nonsyn	A/G	KT713380	Wenne i in., 2016
4	BM105A	UnKnown	NA	NA	A/G	KT713381	Wenne i in., 2016
5	BM106B	UnKnown	NA	NA	A/G	KT713382	Wenne i in., 2016
6	BM10B	Ribosomal protein S20	kodujący	synon	A/C	KJ871040	Zbawicka i in., 2014
7	BM113A	Protein BTG1	kodujący	synon	A/T	KT713385	Wenne i in., 2016
8	BM118A	UnKnown	NA	NA	A/G	KT713388	Wenne i in., 2016
9	BM11A	Ribosomal protein L22	kodujący	synon	A/G	KJ871041	Zbawicka i in., 2014
10	BM121A	Ribosomal protein L30	kodujący	synon	A/T	KT713389	Wenne i in., 2020
11	BM12A	Ribosomal protein L23a	kodujący	synon	C/T	KJ871042	Zbawicka i in., 2014
12	BM12C	Ribosomal protein L23a	kodujący	synon	C/T	KJ871042	Wenne i in., 2016
13	BM151A	adhesive foot protein gene	kodujący	synon	G/T	HQ257471.1	Gardner i in., 2016
14	BM16B	ribosomal protein L21	kodujący	synon	C/T	KJ871044	Wenne i in., 2016
15	BM17B	Ribosomal protein L7a	kodujący	synon	A/G	KJ871045	Zbawicka i in., 2014

16	BM201B	<i>H4 histone gene</i>	niekodujący	NA	A/C	AY267750.1	Zbawicka i in., 2012
17	BM201C	<i>H4 histone gene</i>	kodujący	synon	G/T	AY267750.1	Zbawicka i in., 2012
18	BM202A	<i>H3 histone gene</i>	niekodujący	NA	A/C	AY267749.1	Zbawicka i in., 2012
19	BM202B	<i>H3 histone gene</i>	kodujący	synon	A/T	AY267749.1	Zbawicka i in., 2012
20	BM203B	<i>H2B histone gene</i>	niekodujący	NA	C/T	AY267742.1	Zbawicka i in., 2012
21	BM203C	<i>H2B histone gene</i>	niekodujący	NA	C/T	AY267742.1	Zbawicka i in., 2012
22	BM203D	<i>H2A histone gene</i>	niekodujący	NA	A/T	AY267757.1	Zbawicka i in., 2012
23	BM204A	<i>p53</i>	kodujący	synon	C/T	DQ865151	Zbawicka i in., 2012
24	BM206A	<i>hsp70 gene</i>	kodujący	synon	A/G	AJ783713	Zbawicka i in., 2012
25	BM21B	qm-like protein	kodujący	nonsyn	C/G	KJ871047	Zbawicka i in., 2014
26	BM21C	qm-like protein	kodujący	synon	A/C/T	KJ871047	Zbawicka i in., 2014
27	BM26B	UnKnown13	NA	NA	A/T	KJ871050	Zbawicka i in., 2014
28	BM2G	UnKnown05	kodujący	synon	G/T	KJ871032	Zbawicka i in., 2014
29	BM30A	Ribosomal protein l17	kodujący	synon	A/G	KJ871052	Zbawicka i in., 2014
30	BM30C	Ribosomal protein l17	kodujący	synon	A/T	KJ871052	Zbawicka i in., 2014
31	BM32A	ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 6	kodujący	synon	A/G	KT713371	Wenne i in., 2016
32	BM33B	Cytochrome c oxidase subunit IV	kodujący	synon	A/T	KJ871054	Zbawicka i in., 2014

33	BM35C	Ribosomal protein L7	kodujący	synon	A/T	KJ871055	Wenne i in., 2016
34	BM35D	Ribosomal protein L7	kodujący	synon	A/G	KJ871055	Zbawicka i in., 2014
35	BM36F	ribosomal protein S3a	kodujący	synon	A/C	KT713373	Wenne i in., 2016
36	BM38B	ribosomal protein S8e	kodujący	synon	A/G	KT713368	Wenne i in., 2016
37	BM44B	ubiquitin/ribosomal protein S27a	kodujący	synon	A/G	KJ871057	Zbawicka i in., 2014
38	BM50B	CoA-binding protein	kodujący	synon	A/G	KJ871059	Zbawicka i in., 2014
39	BM54A	ETC_C1_NDUFA4	kodujący	synon	A/G	KJ871060	Zbawicka i in., 2014
40	BM57A	NADH-ubiquinone_oxidoreductase	kodujący	nonsyn	C/T	KT713374	Wenne i in., 2016
41	BM57D	NADH-ubiquinone_oxidoreductase	kodujący	synon	A/C	KT713374	Wenne i in., 2016
42	BM5B	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	A/G	KJ871035	Wenne i in., 2016
43	BM5D	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	C/T	KJ871035	Zbawicka i in., 2014
44	BM60A	UnKnown08	kodujący	synon	A/G	KJ871063	Zbawicka i in., 2014
45	BM61A	Ribosomal_L1	kodujący	synon	C/T	KT713375	Wenne i in., 2016
46	BM62A	Ribosomal L13e	kodujący	synon	A/G	KJ871064	Zbawicka i in., 2014
47	BM64A	Ribosomal protein L35	kodujący	synon	C/T	KJ871065	Zbawicka i in., 2014
48	BM67C	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	A/T	KJ871066	Wenne i in., 2016
49	BM6C	EFG_N	kodujący	synon	C/T	KJ871036	Zbawicka i in., 2014
50	BM75C	UBA_UBA-TS-N_domain	kodujący	synon	C/G	KT713370	Wenne i in., 2016

51	BM78B	UnKnown12	kodujący	synon	A/G	KJ871069	Zbawicka i in., 2014
52	BM8E	Ribosomal protein L3	kodujący	synon	A/G	KJ871038	Zbawicka i in., 2014
53	BM92B	UnKnown06	kodujący	synon	A/T	KJ871074	Zbawicka i in., 2014
54	BM9B	Ribosomal protein S2	kodujący	synon	A/G	KJ871039	Zbawicka i in., 2014
55	BM9C	Ribosomal protein S2	kodujący	synon	A/C/T	KJ871039	Zbawicka i in., 2014

### 6.2.2 Różnorodność genetyczna

Poziom polimorfizmu SNP ( $P_o$ ) w badanych próbach oscylował między 29,09% a 61,82% (Tabela 6). Najniższą wartość zaobserwowano w nowozelandzkiej referencyjnej próbie *M. planulatus* z Oceanu Spokojnego (AKAR). Najwyższy wskaźnik polimorfizmu stwierdzono u próby referencyjnej pochodzącej z Kanady (KKA). Wśród prób z Afryki Południowej polimorfizm osiągnął wartości od 45,73% do 54,55%. Zdecydowana większość loci SNP w badanych próbach znajdowała się w równowadze Hardy'ego-Weinberga (HWE). Heterozygotyczność obserwowana ( $H_o$ ) dla 55 loci wśród 17 prób dla większości była niższa niż heterozygotyczność oczekiwana ( $H_e$ ). Miary  $F_{IS}$  (uśrednione dla wszystkich loci polimorficznych w każdej próbie) wykazują znaczny nadmiar homozygot w 5 próbach.

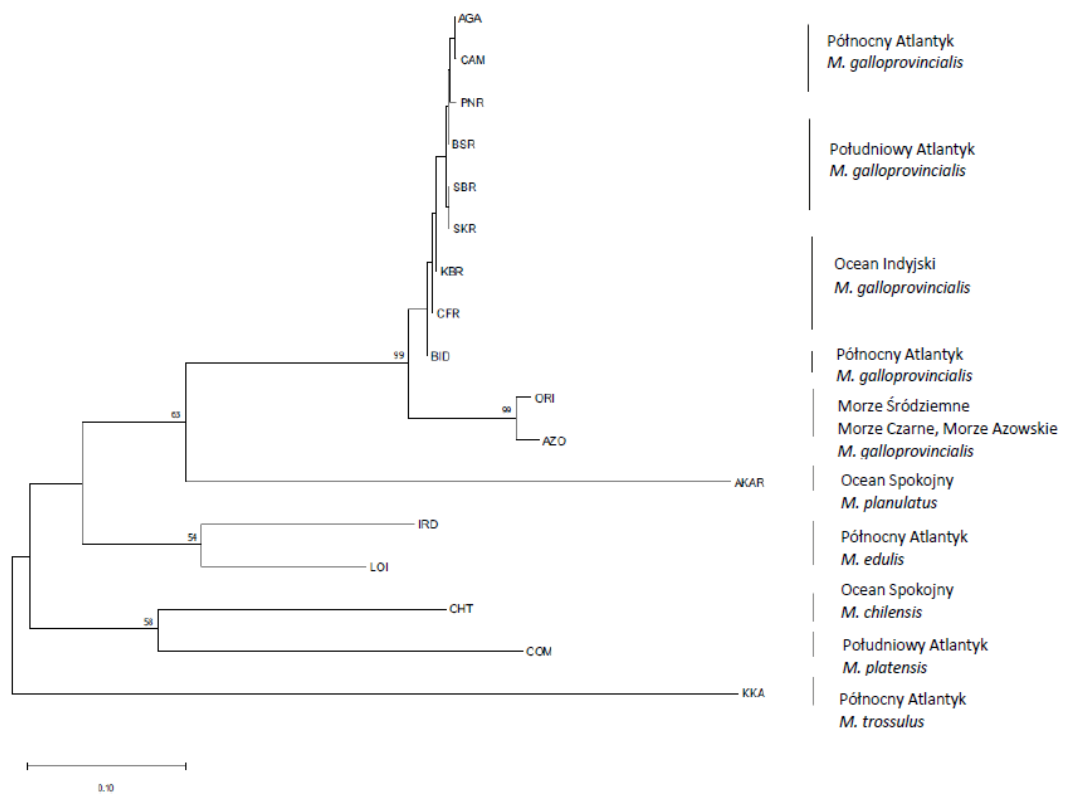
**Tabela 6.** Parametry genetyczne dla 17 badanych prób *Mytilus*: % loci polimorficznych ( $P_o$ ), heterozygotyczność obserwowana i spodziewana ( $H_o$  i  $H_E$ ), średnia różnorodności genów ( $Av.$ ), liczba różnic w parach w populacji ( $NP.$ ), liczba loci odstających od równowagi HWE,  $P < 0.01$  ( $P$ ). Próby referencyjne jak w Tabeli 4.

Nazwa próby	$P_o$	$F_{IS}$	HWE	$H_o$	$H_E$	Poziom zróżnicowania genetycznego dla loci ( $Av.$ )	Średnia liczba różnic między parami w obrębie populacji ( $NP.$ )
BSR	54,55	<b>0,153</b>	3	0,231	0,289	0,150	7,69
PNR	49,09	<b>0,123</b>	7	0,252	0,301	0,137	7,26
SBR	49,09	<b>0,143</b>	4	0,258	0,314	0,141	7,56
CFR	45,73	<b>0,094</b>	2	0,261	0,298	0,148	7,68
KBR	49,09	0,059	3	0,292	0,321	0,144	7,80
SKR	54,55	0,067	0	0,273	0,308	0,137	7,92
<b>IRD</b>	43,64	0,102	1	0,260	0,283	0,115	6,23
<b>LOI</b>	50,90	0,049	1	0,229	0,249	0,108	6,20
<b>AGA</b>	45,45	0,021	0	0,305	0,324	0,138	7,34
<b>BID</b>	50,90	-0,003	2	0,326	0,339	0,147	8,48
<b>CAM</b>	47,27	0,023	1	0,320	0,335	0,147	8,11
<b>ORI</b>	49,09	0,006	2	0,262	0,275	0,116	6,65
<b>AZO</b>	49,09	-0,013	1	0,272	0,274	0,131	6,78

<b>KKA</b>	61,82	<b>0,121</b>	5	0,201	0,245	0,133	6,97
<b>AKAR</b>	29,09	0,030	0	0,181	0,158	0,046	1,89
<b>CHT</b>	36,36	-0,082	1	0,316	0,306	0,107	5,19
<b>COM</b>	30,90	0,104	2	0,234	0,270	0,081	4,30

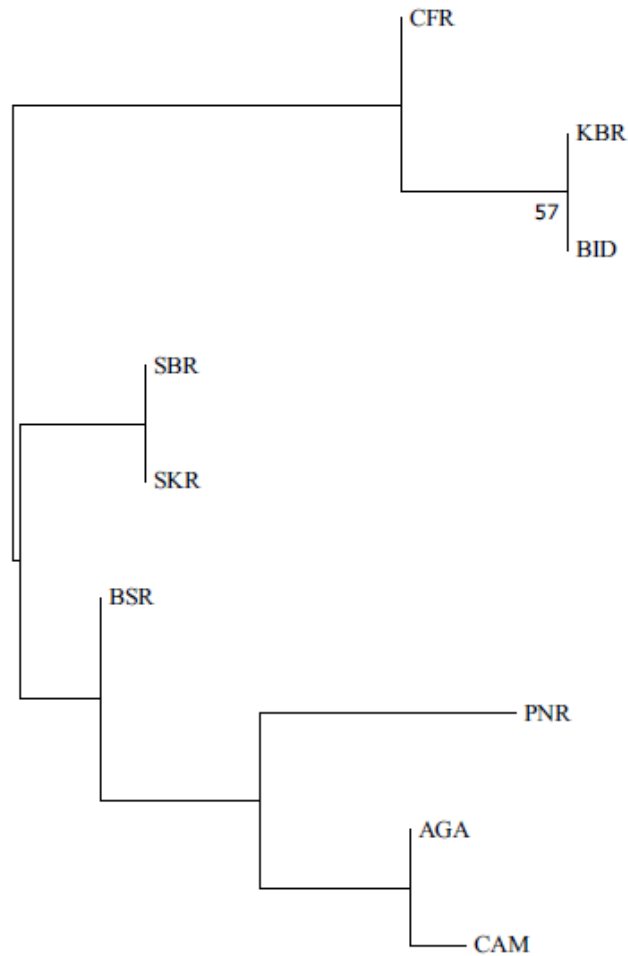
### 6.2.3 Zróżnicowanie populacji

Drzewo najbliższego sąsiada (NJ), skonstruowane na podstawie wartości  $F_{ST}$  ilustruje powiązania genetyczne 17 prób badanych i referencyjnych (Rysunek 17). Oprócz głównych grup reprezentujących *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego drzewo NJ ujawniło grupy z mocną strukturą geograficzną. Odrębną grupę stanowią referencyjne próby *M. trossulus* z Ameryki Północnej, *M. platensis* i *M. chilensis* z Ameryki Południowej oraz *M. planulatus* z Nowej Zelandii. Wśród prób *M. galloprovincialis* z Północnego Atlantyku pogrupowały się badane próby z Południowego Atlantyku i Oceanu Indyjskiego, co świadczy o ich małym zróżnicowaniu genetycznym (Rysunek 18).



**Rysunek 17.** Drzewo zależności genetycznej NJ dla 6 prób z Afryki Południowej i 11 prób referencyjnych z rodzaju *Mytilus* stworzono na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości). Wartości poparcia *bootstrap* są wyświetlane w procentach.



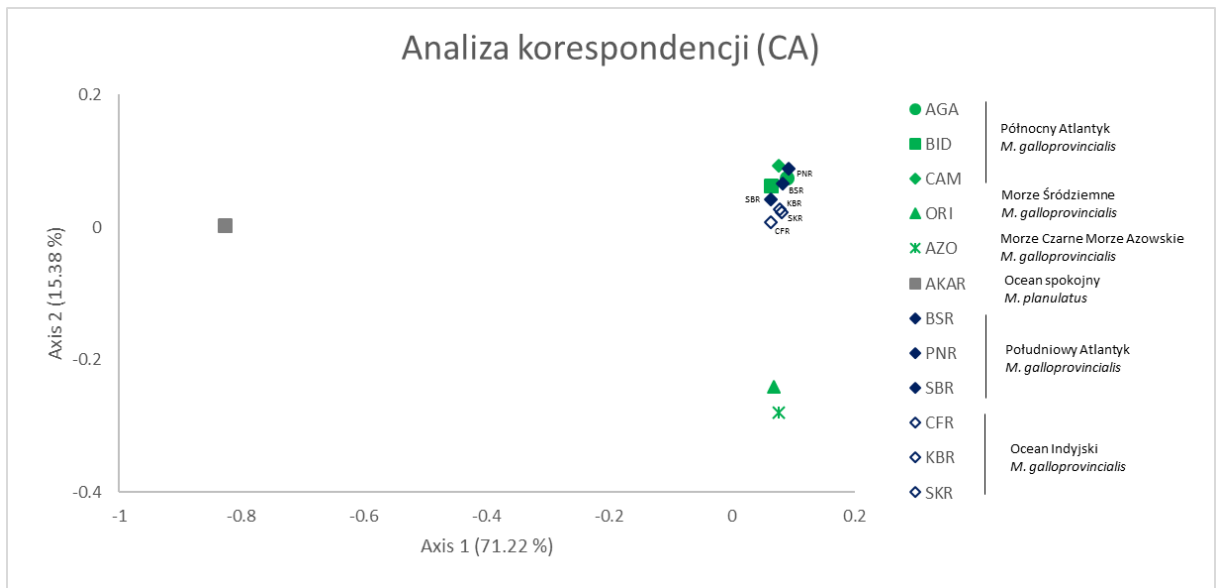


**Rysunek 18.** Drzewo zależności genetycznej NJ dla 6 prób z Afryki Południowej i 3 prób referencyjnych *M. galloprovincialis* stworzono na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości). Wartości poparcia *bootstrap* są wyświetlane w procentach.

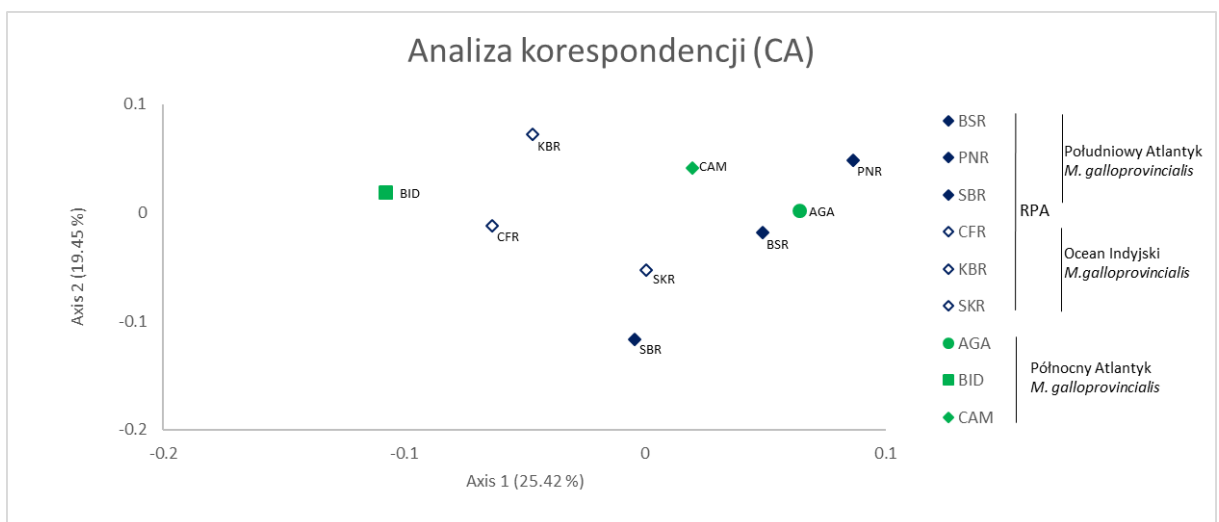
#### 6.2.4 Struktura populacji

Analizę korespondencji przeprowadzono w celu scharakteryzowania struktury populacji *M. galloprovincialis* w badanym rejonie. Analizę przeprowadzono z użyciem panelu 55 SNP dla badanych prób z Oceanu Atlantyckiego i prób referencyjnych. Zaobserwowano, że próby referencyjne *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. platensis*, *M. planulatus* i *M. chilensis* oraz *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego stworzyły odrębne grupy, co jest zgodne z podziałem na drzewie NJ. Wykluczając z analizy próby referencyjne dla *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. platensis* i *M. chilensis* badane populacje z Południowego Atlantyku i Oceanu Indyjskiego grupują się z próbami referencyjnymi

*M. galloprovincialis* z Północnego Atlantyku potwierdza to ich silne podobieństwo (Rysunek 19, 20).

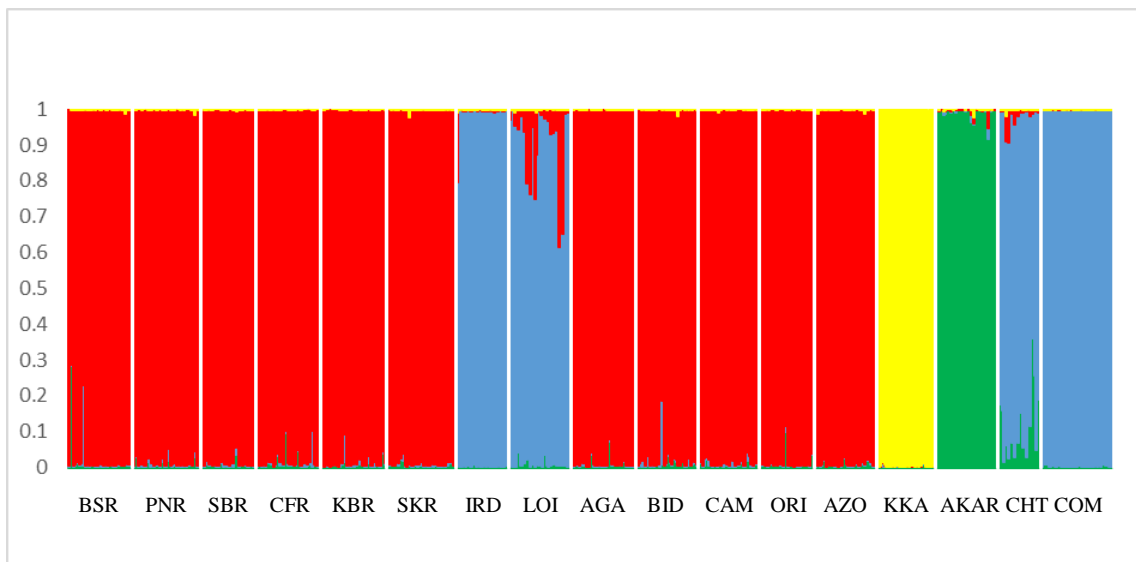


**Rysunek 19.** Analiza korespondencji (CA) dla 12 próbek *Mytilus* (6 próbek badanych oraz 6 próbek referencyjnych *M. galloprovincialis* oraz *M. planulatus*). Każdy z punktów reprezentuje jedną z badanych grup; próby referencyjne oznaczono zielonymi i szarymi punktami. CA wykazało, że osie 1 i 2 wyjaśniają odpowiednio 71,22% i 15,38% całkowitej zmienności genetycznej.

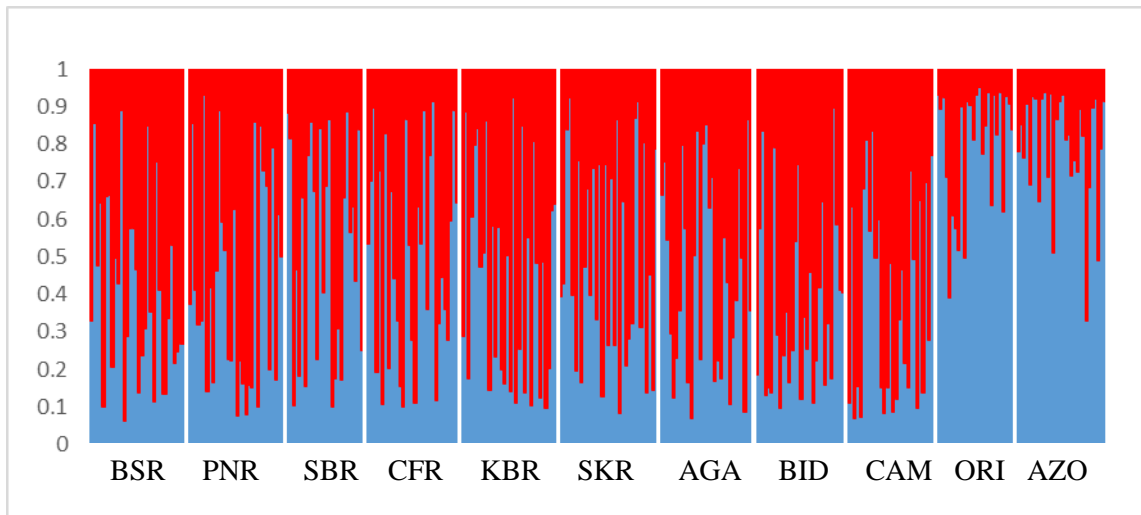


**Rysunek 20.** Analiza korespondencji (CA) dla 9 próbek *Mytilus* (6 próbek badanych i 3 próbek referencyjnych *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego). Każdy z punktów reprezentuje jedną z badanych grup; próby referencyjne oznaczono kolorem zielonym. CA wykazało, że osie 1 i 2 wyjaśniają odpowiednio 25,42% i 19,45% całkowitej zmienności genetycznej.

Analiza STRUKTURY wykonana dla 17 prób *Mytilus* wykazała najwyższy wzrost Ln P (D) (tj.  $\Delta K$  był najwyższy) dla  $K=2$  i następnie dla  $K=3$  i  $K=4$ . Najistotniejszy podział wykryto przy  $K=4$ , gdzie uzyskano rozdzielenie badanych prób na *M. edulis* razem z *M. chilensis* i *M. platensis* oraz *M. trossulus*, *M. planulatus* i *M. galloprovincialis* (Rysunek 21). Kolejne podziały (wykluczając z analizy próby referencyjne: IRD, LOI, KKA, CHT, COM) umożliwiły oddzielenie *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego od *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego. Poddane analizie wszystkie próby małży, pobrane z wybrzeży Południowej Afryki, wykazały domieszkę genów typową dla grup referencyjnych *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego (AGA, BID, CAM) (Rysunek 22).



**Rysunek 21.** Analiza struktury  $K=4$  dla 17 prób *Mytilus*. Każdy osobnik jest reprezentowany przez pojedynczą pionową linię podzieloną na trzy kolorowe segmenty, o długościach proporcjonalnych do każdego z  $K$  wnioskowanych klastrów. Skróty badanych populacji podano w Tabeli 4. Pionowe białe linie oddzielają analizowane próby.



**Rysunek 22.** Analiza struktury  $K=2$  dla 11 prób *M. galloprovincialis*. Każdy osobnik jest reprezentowany przez pojedynczą pionową linię podzieloną na dwa kolorowe segmenty, o długościach proporcjonalnych do każdego z  $K$  wywnioskowanych klastrów. Skróty badanych populacji podano w tabeli 4. Pionowe białe linie oddzielają analizowane próby.

## **6.3 Analiza taksonomiczna i pochodzenia geograficznego prób żywnościowych zawierających omulki *Mytilus* dostępnych w Europie**

### **6.3.1 Charakterystyka badanych prób**

Próby żywnościowe z zadeklarowaną na etykietach lub przez sprzedawcę zawartością omułek *Mytilus* zakupiono w sklepach rybnych, hipermarketach i bezpośrednio w gospodarstwach hodowlanych (Tabela 7). Genotypowanie SNP zostało przeprowadzone dla 21 prób, które składały się z 491 osobników zakupionych w latach 2011–2014. Użyto 5 prób referencyjnych (LET- *M. trossulus*; LID, PNV- *M. galloprovincialis*; LGF- *M. edulis*; PZC- *M. chilensis*), które były wykorzystywane w innych badaniach dotyczących polimorfizmu SNP (Zbawicka i in., 2012; Wenne i in., 2016). Jedną z prób referencyjnych (LID) to próba dziko żyjąca.

**Tabela 7.** Lista 21 prób żywnościowych i 5 referencyjnych *Mytilus*, liczby badanych osobników (*No.*), informacje dotyczące miejsc zakupów, poboru prób, kraju pochodzenia.

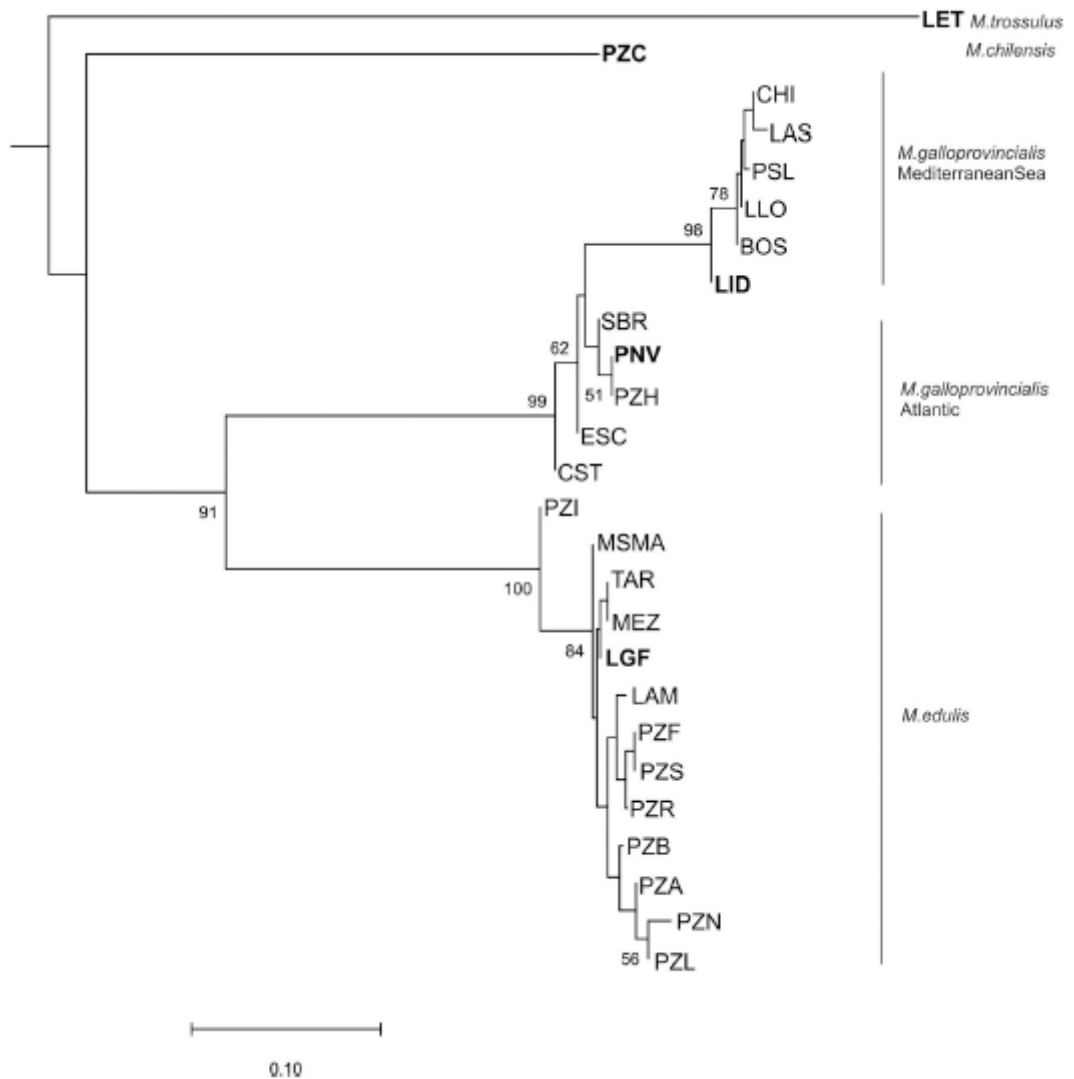
Próba	<i>No.</i>	Produkt/ gatunek	Nazwa produktu	Lokalizacja poboru/pozyskania próby	Kraj pochodzenia	Miejsce zakupu	Data
BOS	30	Świeży produkt	Cozza	Bosco Mesola, Po Delta	Włochy	Market we Włoszech	2012
CHI	29	Świeży produkt <i>M.</i> <i>galloprovin-cialis</i>	Mitili o cozze	Chioggia, Valli di Chioggia (VE)	Włochy, CE IT/2701 CDM-CSM, FAO 37	Strada Statale Romea, Włochy	2012
CST	30	Świeży produkt <i>M.</i> <i>galloprovin-cialis</i>	Cozza	Castro	Hiszpania, CE IT/304/CDM, CE IT/304/CSM	brak danych	2012
LAS	16	Świeży produkt <i>M.</i> <i>galloprovin-cialis</i>	Muscoli La Spezia	La Spezia	Włochy, CE IT/11/CSM	Włoch	2012
LAM	31	Świeży produkt	Mejillones 'rock mussels'	L'Ampolla	Hiszpania	L'Ampolla, Hiszpania	2014
LLO	30	Świeży produkt	Mejillones	L'Ampolla	Hiszpania	Lloret de Mar, Hiszpania	2014
TAR	28	Świeży produkt	Mejillones 'rock mussels'	Tarragona, Sant Carles de la Ràpita	Hiszpania	Lloret de Mar, Hiszpania	2013
MEZ	30	Świeży produkt	Mejillones	-	Hiszpania	Mezquitilla, Hiszpania	2012

PZB	19	Świeży produkt <i>M. edulis</i>	Irische miesmuscheln	Holandia	Netherlands, FAO 27	Bremen, Niemcy	2012
PZL	15	Świeży produkt <i>M. edulis</i>	Premier Mosselen, Mule, EG658SNL	Yerseke, Holandia, FAO 27, cultured	Holandia	Gdańsk, Polska	2012
MSMA	30	Świeży produkt <i>M. edulis</i>	Moules de Bouchots de la Baie du Mont Saint Michel	Le Vivier sur Mer	Francja, FR 35.078.045 CE	Gdańsk, Polska	2015
PSL	12	Świeży produkt	brak danych	Port-Saint-Louis-du-Rhône	Francja	brak danych	2013
PZN	19	Świeży produkt	małże	Norgeskjell AS, Afjord	Norwegia	Market w Gdyni, Polska	2012
ESC	29	Mrożony produkt	brak danych	nieznany	brak danych	brak danych	2015
PZI	17	Mrożony produkt	Mule	Bantry Bay, FAO 27	Irlandia, IE CK 0043 EC	Gdańsk, Polska	2012
PZA	19	Produkt gotowany i mrożony	Mule z makaronem i groszkiem	nieokreślony	nieokreślony, PL 04611803 WE	Gdańsk, Polska	2012
PZR	30	Produkt gotowany i mrożony	małże	Snaddar og Snaskum AS Rissa	Norwegia	brak danych	brak danych

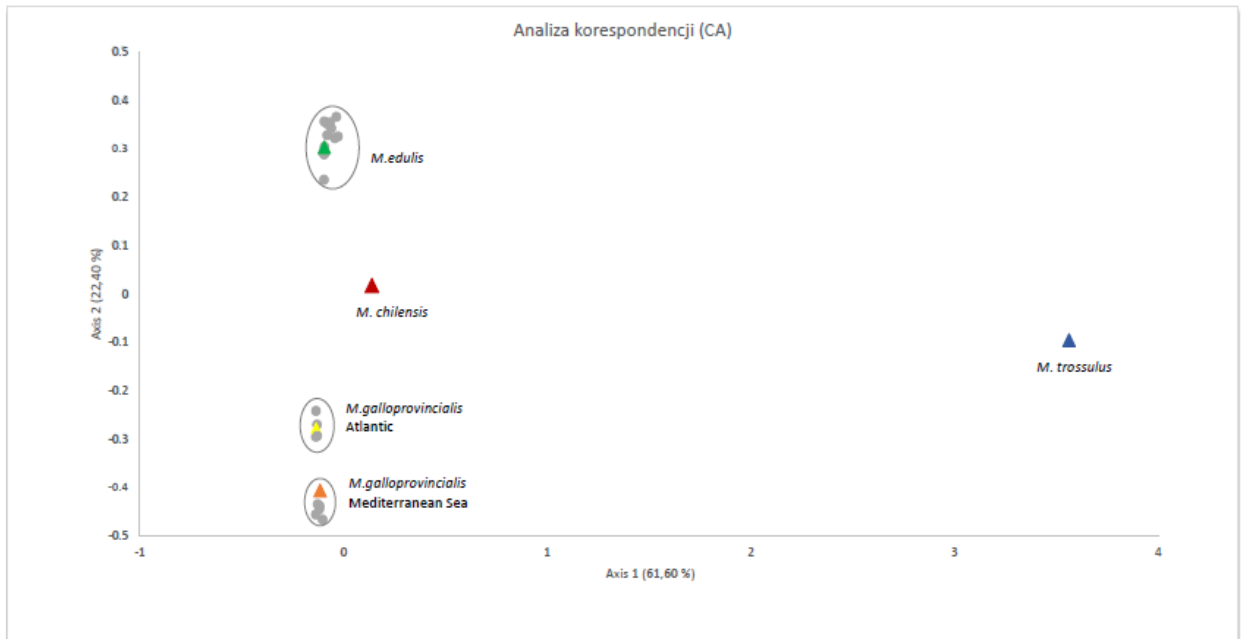
PZH	13	Małże w solance	małże	Bouzas, Vigo, Ria de Vigo	Hiszpania, ES 12.391/PO CE	Gdańsk, Polska	2011
PZS	19	Małże w solance	małże	nieokreślony	Dania, DK 2033 EC	Gdańsk, Polska	2011
PZF	20	Produkt marynowany	Cuisine Francaise, małże	nieokreślony	Dania, EC 2033 DK	Gdańsk, Polska	2013
SBR	25	Świeży produkt	Południowo Afrykańskie małże	Saldanha Bay	Południowa Afryka	Aquaculture Saldanha Bay, Południowa Afryka	2012
LET <sup>1</sup>	15	<i>M. trossulus</i>	brak danych	Loch Etive, Szkocja	Wielka Brytania	Achnacloich, Szkocja	2008
LGF <sup>2</sup>	28	<i>M. edulis</i>	brak danych	Lough Foyle, Ulster	Irlandia Północna	brak danych	2006
LID <sup>3</sup>	30	<i>M. galloprovincialis</i> z Morza Śródziemnego	brak danych	Lido, próba dziko żyjąca	Włochy	brak danych	2006
PNV <sup>4</sup>	19	Fresh <i>M. galloprovincialis</i> , z Oceanu Atlantyckiego	Mejillones	Pontevedra, North of Vigo	Hiszpania	Market w Barcelonie, Hiszpania	2013
PZC <sup>5</sup>	30	Produkt mrożony <i>M. chilensis</i>	Chilijskie małże w całości	Chiloe	Chile	Gdańsk, Polska	2012

Próby referencyjne: <sup>1</sup> – *M. trossulus* (Wenne i in., 2016), <sup>2</sup> – *M. edulis* (Kijewski i in., 2009; Zbawicka i in., 2012), <sup>3</sup> – Morze Śródziemne *M. galloprovincialis* (Wenne i in., 2016), <sup>4</sup> – Ocean Atlantycki *M. galloprovincialis* (Zbawicka i in., 2012, Wenne i in., 2020), <sup>5</sup> – *M. chilensis* (Zbawicka i in., 2018).

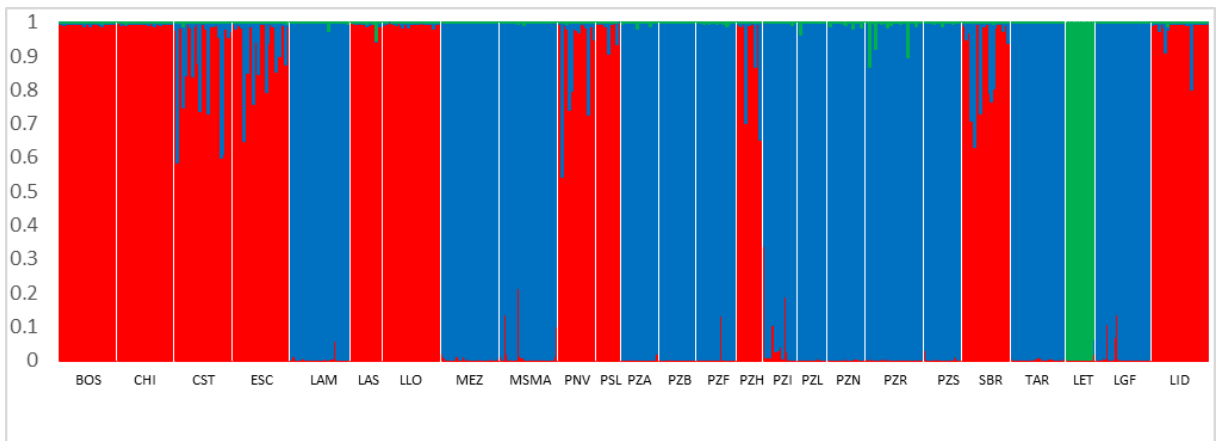




**Rysunek 23.** Drzewo zależności genetycznej NJ. Drzewko dla 21 prób i 5 prób referencyjnych z rodzaju *Mytilus* stworzono na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości). Wartości poparcia *bootstrap* są wyświetlane w procentach. Próbkę referencyjną taksonów zaznaczono pogrubioną czcionką (Wenne i in., 2022a).



**Rysunek 24.** Analiza korespondencji (CA) dla 21 prób *Mytilus*. Każdy kwadrat lub trójkąt reprezentuje jedną z badanych grup; próby referencyjne oznaczono kolorowymi trójkątami. CA wykazało, że osie 1 i 2 wyjaśniają odpowiednio 61,60% i 22,40% całkowitej zmienności genetycznej.



**Rysunek 25.** Analiza struktury K= 3 dla 25 prób, z wyłączeniem próby PZC. Każdy osobnik jest reprezentowany przez pojedynczą pionową linię podzieloną na trzy kolorowe segmenty o długościach proporcjonalnych do każdego z K wywnioskowanych klastrow. Skróty badanych prób podano w Tabeli 7. Pionowe białe linie oddzielają analizowane próby.

### 6.3.2 Identyfikacja taksonów *Mytilus*

Do genotypowania użyto panelu 54 SNP, z czego 45 znajdowało się w rejonach kodujących (Tabela 8). W celu określenia stopnia podobieństwa między taksonami, porównano grupy prób żywnościowych i prób referencyjnych. Zbudowano drzewo metodą najbliższego sąsiada NJ dla wszystkich osobników. Analiza NJ umożliwiła wyodrębnienie czterech taksonów: *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis* i *M. chilensis*, a podział został poparty wysokimi wartościami *bootstrap* (Rysunek 23). W obrębie populacji *M. galloprovincialis* zaobserwowano dwie podgrupy: z Morza Śródziemnego (BOS, CHI, LAS, LLO, PSL, LID) oraz z Oceanu Atlantyckiego (PZH, ESC, SBR, PNV, CST). Populacje *M. edulis* zostały wyraźnie oddzielone (poparcie 91% *bootstrap*) od innych taksonów, a wewnętrzny podział dodatkowo wyodrębnił populację PZI z silnym poparciem (poparcie 100% *bootstrap*), co sugeruje duże zróżnicowanie między osobnikami. Analiza korespondencji CA potwierdziła podział prób na te same grupy jak drzewo NJ (Rysunek 24).

Analiza STRUKTURY LnP (D) wykazała najwyższy wzrost (tj.  $\Delta K$  był najwyższy) dla  $K = 3$  i następnie  $K = 5$ . Po wykluczeniu z analizy *M. chilensis* najlepsze dopasowanie klastrów genetycznych uzyskano dla  $K = 3$ , dla których zróżnicowanie wystąpiło w próbach odpowiadających *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* i *M. edulis* (Rysunek 25). Wysoka wartość  $\Delta K$  dla  $K = 5$  sugerowała dalszy podział na pięć grup odpowiadających czterem taksonom: *M. trossulus*, *M. edulis*, *M. chilensis*, *M. galloprovincialis* z wyraźnym podziałem na próby z Morza Śródziemnego i Atlantyku. Analiza ta wykazała dodatkowo istnienie kilku mieszańców (Tabela 9).

Wśród kilku badanych prób żywnościowych można zaobserwować osobniki z mieszaną pulą genową, głównie *M. galloprovincialis* z domieszką genów *M. edulis*, tzw. hybrydy: CST (5 osobników), ESC (3 osobniki), PNV (3 osobniki), PZH (2 osobniki), SBR (5 osobniki), PZI (4 osobniki), MSMA (1 osobnik) (Tabela 9). Przyporządkowanie próby CST, grupującej się z *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego, świadczy o błędnej informacji dotyczącej lokalizacji umieszczonej na etykiecie, która sugeruje pochodzenie próby z Morza Śródziemnego. Analizując wyniki CA i NJ można zauważyć, że wśród prób żywnościowych PZH o niezadeklarowanej nazwie gatunkowej grupuje się z próbkami *M. galloprovincialis* z Oceanu

Atlantyckiego, referencyjna próba hodowlana PZC z Chiloe w Chile tworzy odrębną linię filogenetyczną a pozostałe próby żywnościowe tworzą grupę typową dla *M. edulis*. Wśród badanych prób europejskich można zaobserwować przyporządkowanie prób żywnościowych do dwóch taksonów: *M. galloprovincialis* i *M. edulis* (Rysunek 23).

**Tabela 8.** Właściwości 54 loci SNP, lokalizacja genomu, typ podstawienia, wariant alleliczny, numer dostępu GenBank i wspierające odniesienie.

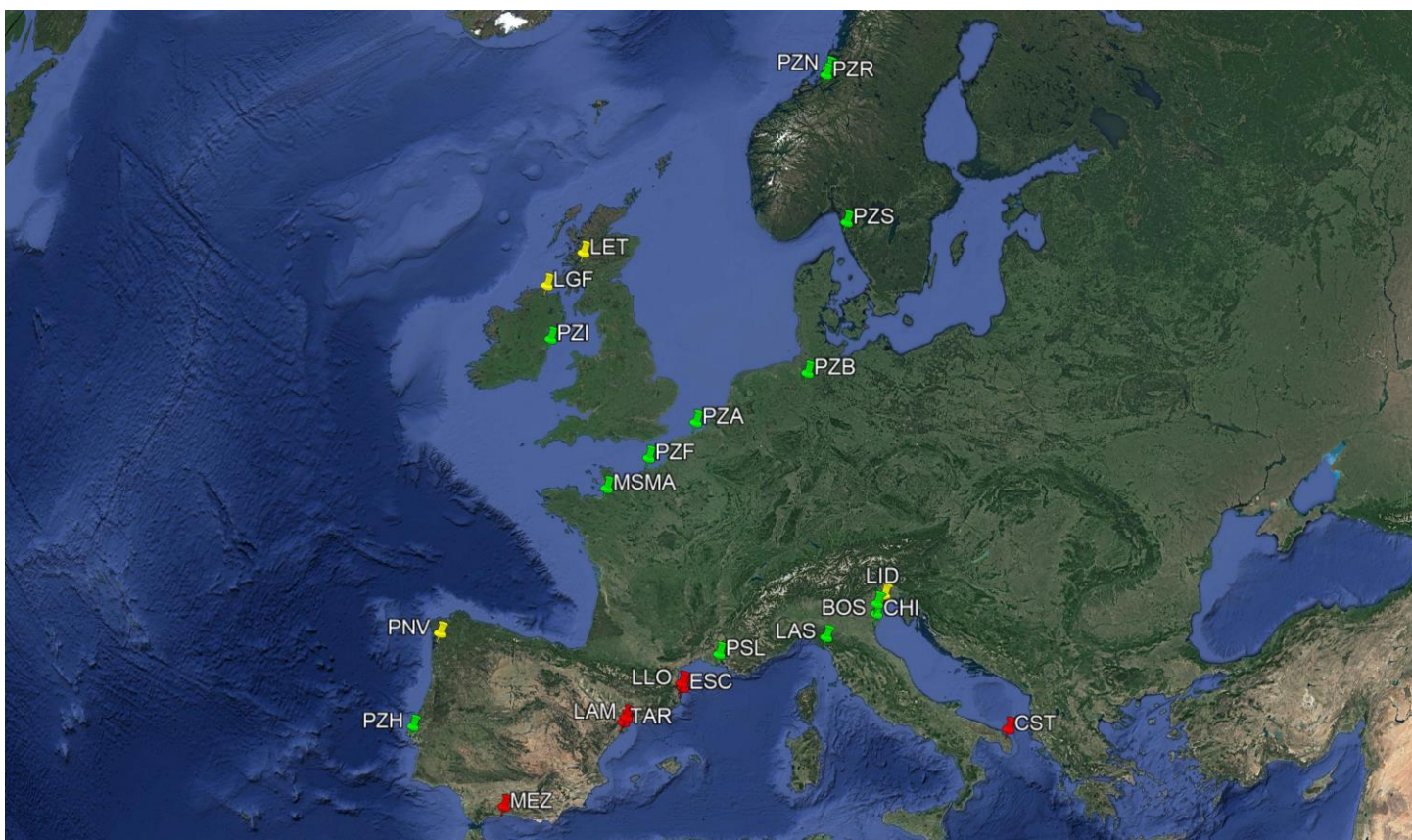
	Locus	Gen	Rejon	Podstawienie	Allele	GenBank	Publikacja
1	BM101A	Ribosomal protein L7a	kodujący	synon	A/T	KT713378	Wenne i in., 2016
2	BM102A	Proteasome subunit beta type-6-like	kodujący	synon	C/T	KT713379	Wenne i in., 2016
3	BM103B	Proteasome subunit beta type-5-like	kodujący	nonsyn	A/G	KT713380	Wenne i in., 2016
4	BM105A	UnKnown	NA	NA	A/G	KT713381	Wenne i in., 2016
5	BM106B	UnKnown	NA	NA	A/G	KT713382	Wenne i in., 2016
6	BM10B	Ribosomal protein S20	kodujący	synon	A/C	KJ871040	Zbawicka i in., 2014
7	BM113A	Protein BTG1	kodujący	synon	A/T	KT713385	Wenne i in., 2016
8	BM115B	UnKnown	NA	NA	A/G	KT713384	Wenne i in., 2016
9	BM118A	UnKnown	NA	NA	A/G	KT713388	Wenne i in., 2016
10	BM11A	Ribosomal protein L22	kodujący	synon	A/G	KJ871041	Zbawicka i in., 2014
11	BM121A	Ribosomal protein L30	kodujący	synon	A/T	KT713389	Wenne i in., 2020
12	BM12A	Ribosomal protein L23a	kodujący	synon	C/T	KJ871042	Zbawicka i in., 2014
13	BM12C	Ribosomal protein L23a	kodujący	synon	C/T	KJ871042	Wenne i in., 2016
14	BM151A	adhesive foot protein gene	kodujący	synon	G/T	HQ257471.1	Gardner i in., 2016
15	BM16B	ribosomal protein L21	kodujący	synon	C/T	KJ871044	Wenne i in., 2016

16	BM17B	Ribosomal protein L7a	kodujący	synon	A/G	KJ871045	Zbawicka i in., 2014
17	BM201B	<i>H4 histone gene</i>	niekodujący	NA	A/C	AY267750.1	Zbawicka i in., 2012
18	BM201C	<i>H4 histone gene</i>	kodujący	synon	G/T	AY267750.1	Zbawicka i in., 2012
19	BM202A	<i>H3 histone gene</i>	niekodujący	NA	A/C	AY267749.1	Zbawicka i in., 2012
20	BM202B	<i>H3 histone gene</i>	kodujący	synon	A/T	AY267749.1	Zbawicka i in., 2012
21	BM203B	<i>H2B histone gene</i>	niekodujący	NA	C/T	AY267742.1	Zbawicka i in., 2012
22	BM203D	<i>H2A histone gene</i>	niekodujący	NA	A/T	AY267757.1	Zbawicka i in., 2012
23	BM204A	<i>p53</i>	kodujący	synon	C/T	DQ865151	Zbawicka i in., 2012
24	BM21B	qm-like protein	kodujący	nonsyn	C/G	KJ871047	Zbawicka i in., 2014
25	BM21C	qm-like protein	kodujący	synon	A/C/T	KJ871047	Zbawicka i in., 2014
26	BM26B	UnKnown13	NA	NA	A/T	KJ871050	Zbawicka i in., 2014
27	BM2G	UnKnown05	kodujący	synon	G/T	KJ871032	Zbawicka i in., 2014
28	BM30A	Ribosomal protein l17	kodujący	synon	A/G	KJ871052	Zbawicka i in., 2014
29	BM30C	Ribosomal protein l17	kodujący	synon	A/T	KJ871052	Zbawicka i in., 2014
30	BM32A	ubiquinol-cytochrome c reductase subunit 6	kodujący	synon	A/G	KT713371	Wenne i in., 2016
31	BM33B	Cytochrome c oxidase subunit IV	kodujący	synon	A/T	KJ871054	Zbawicka i in., 2014
32	BM35C	Ribosomal protein L7	kodujący	synon	A/T	KJ871055	Wenne i in., 2016

33	BM35D	Ribosomal protein L7	kodujący	synon	A/G	KJ871055	Zbawicka i in., 2014
34	BM36F	ribosomal protein S3a	kodujący	synon	A/C	KT713373	Wenne i in., 2016
35	BM38B	ribosomal protein S8e	kodujący	synon	A/G	KT713368	Wenne i in., 2016
36	BM44B	ubiquitin/ribosomal protein S27a	kodujący	synon	A/G	KJ871057	Zbawicka i in., 2014
37	BM50B	CoA-binding protein	kodujący	synon	A/G	KJ871059	Zbawicka i in., 2014
38	BM54A	ETC_C1_NDUFA4	kodujący	synon	A/G	KJ871060	Zbawicka i in., 2014
39	BM57A	NADH-ubiquinone_oxidoreductase	kodujący	nonsyn	C/T	KT713374	Wenne i in., 2016
40	BM57D	NADH-ubiquinone_oxidoreductase	kodujący	synon	A/C	KT713374	Wenne i in., 2016
41	BM5B	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	A/G	KJ871035	Wenne i in., 2016
42	BM5D	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	C/T	KJ871035	Zbawicka i in., 2014
43	BM60A	UnKnown08	kodujący	synon	A/G	KJ871063	Zbawicka i in., 2014
44	BM61A	Ribosomal L1	kodujący	synon	C/T	KT713375	Wenne i in., 2016
45	BM62A	Ribosomal L13e	kodujący	synon	A/G	KJ871064	Zbawicka i in., 2014
46	BM64A	Ribosomal protein L35	kodujący	synon	C/T	KJ871065	Zbawicka i in., 2014
47	BM67C	Ribosomal protein S6e	kodujący	synon	A/T	KJ871066	Wenne i in., 2016
48	BM6C	EFG N	kodujący	synon	C/T	KJ871036	Zbawicka i in., 2014
49	BM75C	UBA UBA-TS-N domain	kodujący	synon	C/G	KT713370	Wenne i in., 2016
50	BM78B	UnKnown12	kodujący	synon	A/G	KJ871069	Zbawicka i in., 2014

51	BM8E	Ribosomal protein L3	kodujący	synon	A/G	KJ871038	Zbawicka i in., 2014
52	BM92B	UnKnown06	kodujący	synon	A/T	KJ871074	Zbawicka i in., 2014
53	BM9B	Ribosomal protein S2	kodujący	synon	A/G	KJ871039	Zbawicka i in., 2014
54	BM9C	Ribosomal protein S2	kodujący	synon	A/C/T	KJ871039	Zbawicka i in., 2014





**Rysunek 26.** Lokalizacje analizowanych prób *Mytilus* z Morza Śródziemnego oraz Oceanu Atlantyckiego (Google Earth Pro) z wyjątkiem lokalizacji SBR, PZC, ESC, PZA, PZF, PZI, PZL, PZS. Próby referencyjne (LET, LGF, LID, PNV) oznaczono na żółto, próby z właściwymi informacjami na etykietach oznaczono kolorem zielonym, próby z niezgodnościami dotyczącymi gatunku, lokalizacji lub miejsca sprzedaży oznaczono kolorem czerwonym.

**Tabela 9.** Przynależność taksonomiczna próbek żywnościowych *Mytilus*. Kompleksowe wyniki analizy struktury dla K=3 obliczonej dla 21 populacji prób żywnościowych i 4 prób referencyjnych (wykluczając z analizy próbę PZC). Liczby odpowiadają liczbie osobników przypisanych do każdego gatunku z największym prawdopodobieństwem, a wartości procentowe wskazują na udział osobników bez mieszanej puli genowej oraz udział mieszańców w danej próbce. Próby referencyjne oznaczono pogrubioną czcionką.

GeneClass	Przypisanie do gatunku				Nazwa populacji	Structure (K=3)			
	<i>M.edulis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.trossulus</i>	<i>M.chilensis</i>		<i>M.edulis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.trossulus</i>	Mix <i>M.galloprovincialis</i> <i>M.edulis</i>
BOS		30 (100 %)			BOS	30 (100 %)			
CHI		29 (100 %)			CHI	29 (100 %)			
CST		30 (100 %)			CST	25 (83,33 %)		5 (16,67%)	
ESC		29 (100 %)			ESC	26 (89,66 %)		3 (10,34%)	
LAM	31 (100 %)				LAM	31 (100 %)			
LAS		16 (100 %)			LAS	16 (100 %)			
LLO		30 (100 %)			LLO	30 (100 %)			
MEZ	30 (100%)				MEZ	30 (100%)			
MSMA	30 (100%)				MSMA	29(96,67%)		1 (3,33%)	
<b>PNV</b>		19 (100 %)			<b>PNV</b>	16 (84,21 %)		3 (15,79%)	
PSL		12 (100 %)			PSL	12 (100 %)			
PZA	19 (100%)				PZA	19 (100%)			
PZB	19 (100%)				PZB	19 (100%)			

<b>PZC</b>			30 (100%)	<b>PZC</b>	NA	NA	NA
<b>PZF</b>	20 (100%)			<b>PZF</b>	20 (100%)		
<b>PZH</b>		13 (100 %)		<b>PZH</b>		11 (84,62 %)	2 (15,38%)
<b>PZI</b>	16(94,12%)	1 (5,88 %)		<b>PZI</b>	13(76,47%)		4 (23,53%)
<b>PZL</b>	15 (100%)			<b>PZL</b>	15 (100%)		
<b>PZN</b>	19 (100%)			<b>PZN</b>	19 (100%)		
<b>PZR</b>	30 (100%)			<b>PZR</b>	30 (100%)		
<b>PZS</b>	19 (100%)			<b>PZS</b>	19 (100%)		
<b>SBR</b>		25 (100 %)		<b>SBR</b>		20 (80 %)	5 (20%)
<b>TAR</b>	28 (100%)			<b>TAR</b>	28 (100%)		
<b>LET</b>			15(100%)	<b>LET</b>			15(100%)
<b>LGF</b>	28 (100 %)			<b>LGF</b>	28 (100 %)		
<b>LID</b>		30 (100 %)		<b>LID</b>		30 (100 %)	

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że większość informacji dotyczących pochodzenia prób żywnościowych była zgodna z opisem na etykietach, natomiast kilka prób posiadało błędną informację dotyczącą gatunku: LAM, MEZ i TAR zadeklarowane jako *M. galloprovincialis* okazały się należeć do *M. edulis*. Według informacji na etykiecie lub uzyskanej od sprzedawców próby CST, ESC, LAM, MEZ pochodziły z Morza Śródziemnego, natomiast analiza genetyczna wykazała, że grupują się z próbami z Oceanu Atlantyckiego. Próba SBR pobrana z hodowli w Zatoce Saldanha, Południowy Atlantyk, w analizach grupowała się z populacjami z Północnej części Oceanu Atlantyckiego (Tabela 9), co wynika z introdukowania do hodowli w Południowej Afryce omułków z tej części Atlantyku.

**Tabela 10.** Zestawienie danych z etykiet prób żywnościowych i prób referencyjnych z wynikami uzyskanymi w analizie genetycznej. Próby referencyjne oznaczono \*. Różnice między danymi na etykietach a wynikami zaznaczono pogrubioną czcionką.

Nazwa próby	Pochodzenie deklarowane przez producenta	Gatunek podany przez producenta	Nazwa taksonu zidentyfikowanego wyników genotypowania SNP	Pochodzenie według grup z drzewka NJ
BOS	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	Morze Śródziemne
CHI	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	Morze Śródziemne
CST	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	<b>Północny Atlantyk</b>
ESC	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	<b>Północny Atlantyk</b>
LAM	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<b><i>M.edulis</i></b>	<b>Północny Atlantyk</b>
LAS	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	Morze Śródziemne
LLO	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	Morze Śródziemne
MEZ	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<b><i>M.edulis</i></b>	<b>Północny Atlantyk</b>
MSMA	Północny Atlantyk	<i>M.edulis</i>	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
PNV	Północny Atlantyk	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	Północny Atlantyk
PSL	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	Morze Śródziemne

PZA	Północny Atlantyk	nie określono	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
PZB	Północny Atlantyk	<i>M.edulis</i>	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
PZC	Ocean Spokojny	<i>M.chilensis</i>	<i>M.chilensis</i>	Ocean Spokojny
PZF	Północny Atlantyk	nie określono	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
PZH	Północny Atlantyk	nie określono	<i>M.galloprovincialis</i>	Północny Atlantyk
PZI	Północny Atlantyk	nie określono	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
PZL	Północny Atlantyk	<i>M.edulis</i>	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
PZN	Północny Atlantyk	nie określono	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
PZR	Północny Atlantyk	<i>M.edulis</i>	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
PZS	Północny Atlantyk	nie określono	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk
SBR	Południowy Atlantyk	<i>M.galloprovincialis</i>	<i>M.galloprovincialis</i>	Północny Atlantyk
TAR	Morze Śródziemne	<i>M.galloprovincialis</i>	<b><i>M.edulis</i></b>	Północny Atlantyk
LET*	Północny Atlantyk	<i>M.trossulus</i>	<i>M.trossulus</i>	Północny Atlantyk
LGF*	Północny Atlantyk	<i>M.edulis</i>	<i>M.edulis</i>	Północny Atlantyk

LID*	NA	NA	<i>M.galloprovincialis</i>	Morze Śródziemne
------	----	----	----------------------------	------------------

## 7. Dyskusja

Rozmieszczenie gatunków *Mytilus* jest kontrolowane przez szereg procesów środowiskowych i ekologicznych obejmujących zarówno siedliska bentosowe, jak i pelagiczne: rodzaj i dostępność podłoża, konkurencja innych gatunków bentosowych, podatność na pasożyty i inne czynniki chorobotwórcze, aktywność drapieżników, prądy morskie, zmiany fizycznych i chemicznych właściwości wody, produkcja fitoplanktonu oraz interakcje między tymi procesami, odporność na wysychanie podczas odpływów (Sandman i in., 2013; Kotta i in., 2015; Wenne i in., 2022b). Osiadły tryb życia dorosłych małży powoduje ich uzależnienie od zawartości pokarmu w wodzie, ale jego ilość i jakość jest zmienna w czasie i przestrzeni (Dahlhoff, 1996; Gardner, 2000, 2013; Saurel i in., 2007). *M. galloprovincialis* jest najlepiej przystosowanym gatunkiem omułków do tolerowania zmian termicznych, co może ułatwiać jego rozprzestrzenianie się do nowych rejonów, jak i jego zdolność do konkutowania z gatunkami lokalnymi (np. Alexander i in., 2015; Braby i Somero, 2006; Jones i in., 2010; Tomanek i Zuzow, 2010). Próby wykrycia powiązań między zmiennością genetyczną populacji i czynnikami środowiskowymi wymagają uwzględnienia w modelach czynników mających znaczenie ekologiczne.

Wenne i in. (2022b) zastosowali metody genetyki krajobrazowej (ang. seascape genetics) do zbadania zależności zróżnicowania genetycznego populacji *M. galloprovincialis* przedstawionego w niniejszej pracy doktorskiej z wybranymi czynnikami środowiskowymi. Z 13 zmiennych środowiskowych, których wartości uzyskano z baz danych dla 43 miejsc poboru prób tego gatunku z Morza Śródziemnego, zastosowanie analizy GLM (uogólnione modele liniowe) umożliwiło zidentyfikowanie 5 zmiennych środowiskowych (głębokość warstwy mieszania wody, promieniowanie fotosyntetycznie czynne (PAR) na powierzchni morza, PAR na dnie morskim, temperatura wody powierzchniowej, zachmurzenie), które wyjaśniały zmienność wartości  $F_{ST}$ . Zastosowanie sekwencyjnych testów w modelu najlepszego dopasowania analizy DistLM, dla frekwencji alleli wskazało 4 zmienne (wysokość fali, stężenie  $PO_4$ , temperaturę na powierzchni morza i PAR na powierzchni morza) jako istotne w modelu wielookresowym. Brak zasolenia, jako istotnego czynnika środowiskowego może być związany z tym, że jego gradient w Morzu Śródziemnym nie jest duży. Złożoność uzyskanych wyników może być skutkiem interakcji między testowanymi zmiennymi,



działania czynników ekologicznych oraz złożoną historią geologiczną Morza Śródziemnego (Wenne i in., 2022b). Nie można wykluczyć działania innych mechanizmów adaptacyjnych, których wykrycie wymagałoby zastosowania szeroko rozumianej genomiki populacyjnej.

### **7.1 Zróżnicowanie genetyczne *Mytilus galloprovincialis* rodzimych populacji z Morza Śródziemnego**

Morze Śródziemne charakteryzuje się dużą różnorodnością biologiczną i znaczną liczbą gatunków endemicznych. Dla części gatunków populacje śródziemnomorskie zachowały odrębność genetyczną, pomimo napływu larw i postaci dorosłych z Oceanu Atlantyckiego przez Cieśninę Gibraltarską (Paternello i in., 2007; Wenne i in., 2022b). Należą do nich pąkla *Chthamalus montagui* (Pannacciulli i in., 2017; Shemesh i in., 2009), omulek *Mytilus galloprovincialis* (Varvio i in., 1988; Kijewski i in., 2011; Zbawicka i in., 2012) oraz krewetka *Palaemon elegans* (Reuschel i in., 2010). Oprócz naturalnych możliwości dyspersji, mieszanie się populacji śródziemnomorskich mogło być spowodowane długą historią działalności człowieka, w tym żeglugi i handlu silnie związanych z morzem (Blondel i in., 1999; Coll i in., 2010; Wenne i in., 2022b). Intensywna działalność żeglugowa, przemieszczanie zasobów między hodowlami i dryfowanie na materiałach naturalnych i sztucznych mogło przyczynić się do możliwego zmniejszenia zróżnicowania genetycznego między populacjami w basenach Morza Śródziemnego (Giantsis i in., 2014a).

Czynnikiem izolującym, dla niektórych gatunków morskich przemieszczających się między Morzem Śródziemnym a Oceanem Atlantyckim, może być wpływ frontu Almeria-Oran (Wenne i in., 2022b). Front ten tworzą dwa kołowe prądy morskie, z których jeden płynie z północy na południowy wschód do Morza Śródziemnego a drugi zawraca wody pochodzące z Oceanu Atlantyckiego do Morza Albozańskie (Milot i Taupier-Letage, 2005; Millot, 2013). Czynniki środowiskowe oraz możliwe występowanie izolujących mechanizmów wewnętrznych utrzymują strefę hybrydyzacji u wybrzeży Afryki (El Ayari i in., 2019). Wyniki genotypowania SNP uzyskane w niniejszej pracy potwierdziły występowanie atlantyckiej linii *M. galloprovincialis* na

wybrzeżu Afryki (populacja ORA4) oraz linii śródziemnomorskiej na wschód od Oranu (ORA1).

Zróznicowanie populacji *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i Mórza Czarnego oraz Azowskiego zostało w niniejszej pracy określone z zastosowaniem panelu 53 SNP. W badaniach innych autorów, przeprowadzonych z wykorzystaniem 512 loci SNP również stwierdzono istotne różnice między populacjami z Morza Czarnego i Morza Śródziemnego (Paterno i in., 2019). Natomiast przy genotypowaniu z użyciem 998 loci SNP nie wykryto istotnych różnic między populacjami w Morzu Czarnym (Paterno i in., 2019), co jest zgodne z wynikami badań przedstawionymi w niniejszej pracy. Zróznicowanie genetyczne zostało również zaobserwowane między populacjami z Morza Czarnego i Morza Śródziemnego na poziome mtDNA (Ladoukakis i in., 2002). Na podstawie analizy RFLP polimorfizmu genu COIII przeprowadzonej dla populacji *M. galloprovincialis* stwierdzono, że populacje w Cieśninie Dardaneelskiej wykazują istotne podobieństwo struktury genetycznej do populacji z Morza Śródziemnego. Wyniki badań SNP w niniejszej pracy potwierdzają ten kierunek zmian. Najczęściej występujący haplotyp mtDNA w populacji z Morza Azowskiego określony na podstawie analizy RFLP dla ND2-COIII był również obecny w populacji z Villafranche-sur-Mer, w północno-zachodniej części Morza Śródziemnego (Śmietanka i in., 2004). Genotypowanie za pomocą sekwencjonowania tego samego regionu mtDNA ujawniło różnice między populacjami z Morza Azowskiego i Morza Czarnego pod względem częstości haplotypów, najczęstsze z haplotypów były również obecne w północno-zachodnim Morzu Śródziemnym (Śmietanka i in., 2009, 2014). Dywergencja haplotypów mtDNA występujących w populacjach czarnomorskich i śródziemnomorskich *M. galloprovincialis* została oszacowana na kilkaset tysięcy lat (Śmietanka i in., 2014). Dlatego można przyjąć, że populacje *M. galloprovincialis* wyewoluowały w Morzu Śródziemnym i Morzu Egejskim, na długo przed powstaniem współczesnego Morza Czarnego. Cechą charakterystyczną allelu SNP BM105A „A” *M. edulis* i *M. trossulus* jest zwiększona częstość występowania w populacji z Morza Czarnego i Azowskiego oraz zmniejszona w Morzu Śródziemnym. Niemniej jednak, ogólny brak genotypów *M. edulis* i *M. trossulus*, który wynika z przeprowadzonych badań wyklucza możliwość inwazji populacji *Mytilus* do Morza Czarnego z mórza północno-wschodniej Europy. Analiza literatury paleoceanograficznej dotyczącej czasu uformowania się systemu dynamiki

wymiany wód z powierzchniowym odpływem wód o niskim zasoleniu z Morza Czarnego i przydennym napływem wód o wysokim zasoleniu z Morza Śródziemnego oraz opublikowanych danych o datowaniu muszli obecnych w osadach, populacje *Mytilus* zasiedliły Morze Czarne ponad 8 tys. lat temu (Wenne i in., 2022b). Dlatego można stwierdzić, że zróżnicowanie genetyczne między populacjami *M. galloprovincialis* z Morza Czarnego i Śródziemnego jest ewolucyjnie niedawne i może być związane z efektem wąskiego gardła, późniejszą ekspansją populacji i czynnikami selekcyjnymi, np. zasoleniem.

Analizy genetyczne mitochondrialnego DNA *M. galloprovincialis* z północnego, środkowego i południowego wybrzeża Morza Egejskiego wykazały, że populacje te były jednorodne (Ladoukakis i in., 2002; Giantsis i in., 2014b). Populacje z Morza Marmara (Turcja), tj. rejonu znajdującego się najbliżej Cieśniny Dardanelskiej różnią się od populacji z Morza Egejskiego, podczas gdy populacje z Morza Egejskiego, Jońskiego i Północnego Adriatyku nie wykazują istotnego zróżnicowania (Giantsis i in., 2014b). Wyjątek stanowi jedna populacja z obszaru należącego do Zadaru w Chorwacji, dla której zaobserwowano istotne zróżnicowanie. Analizy sekwencji mtDNA ujawniły jednorodność genetyczną wśród wszystkich populacji z wybrzeży Grecji i wyraźne zróżnicowanie między populacją z Turcji a populacją z Morza Egejskiego (Giantsis i in., 2014b). Dane mikrosatelitarne wykazały zróżnicowanie populacji z wybrzeży Włoch i z Morza Egejskiego (Giantsis i in., 2014a). Wyniki genotypowania z użyciem dużej liczby SNP wykazały silniejsze zróżnicowanie populacji z północnego i południowego Adriatyku w porównaniu z populacjami z północnej części Morza Jońskiego (Paterno i in., 2019). Wyniki genotypowania 53 SNP uzyskane w niniejszej pracy nie wykazały znaczących różnic między populacjami *M. galloprovincialis* pochodzącymi z północnego i południowego Adriatyku, co może świadczyć o większej rozdzielczości SNP wykrywanych dla populacji bardziej lokalnych. W niniejszej pracy stwierdzono, że populacja Çanakkale z Morza Marmara istotnie różni się od populacji z Morza Egejskiego i wykazuje zmienność genetyczną podobną do populacji z Morza Czarnego. Bardzo rzadki allel (BM5B „G”) częściej występował u omułek z Morza Egejskiego niż we wszystkich innych populacjach *M. galloprovincialis* i referencyjnych próbach *M. edulis* i *M. trossulus*.

Nie zaobserwowano znaczącego zróżnicowania genetycznego wśród populacji *M. galloprovincialis* w zachodniej części basenu Morza Śródziemnego w niniejszej pracy z zastosowaniem analizy 53 SNP. Podobny wynik uzyskano w analizie prób z Banylus (Francja) i Haouaria (Tunezja) przy użyciu 512 loci SNP (Paterno i in., 2019). Brak zróżnicowania genetycznego między populacjami *M. galloprovincialis* w obrębie zachodniej części Morza Śródziemnego można częściowo wytłumaczyć przyczynami naturalnymi, w tym wspólną historią paleogeograficzną tego zbiornika. Zróżnicowanie między zachodnimi i wschodnimi populacjami Morza Śródziemnego stwierdzono również dla innych gatunków, takich jak okoń morski *Dicentrarchus labrax* (Bahri-Sfar i in., 2000), strzykwa *Holothuria polii* (Valente i in., 2015), krab *Carcinus aestuarii* (Ragionieri i Schubart, 2013) oraz sercówki pospolitej *Cerastoderma glaucum* (Sromek i in., 2019).

Współczesna struktura genetyczna populacji małży *M. galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym jest efektem działania czynników naturalnych i antropogenicznych. Wysoka zdolność do rozprzestrzeniania się tego gatunku implikuje przepływ genów przez miejsca hybrydyzacji między populacjami, co doprowadziło do ich genetycznej homogenizacji. Działania antropogeniczne, tj. transport wód balastowych statków, obrastanie kadłubów statków, ruchy platform poszukiwawczych oraz nierejestrowane wprowadzanie małży do celów akwakultury, mogły odegrać ważną rolę w pokonywaniu naturalnych barier dla omułek, co w konsekwencji przyczyniło się do ukształtowania obecnego podobieństwa genetycznego środkowo-zachodnich populacji Morza Śródziemnego. Zbadano, że w Europie forma atlantycka *M. galloprovincialis* została wprowadzona przez wody balastowe lub zanieczyszczenie kadłuba do portów na obszarze od północnej Francji po Norwegię. Forma ta może hybrydyzować z lokalnym taksonem *M. edulis* (Simon i in., 2020). Porty śródziemnomorskie podlegają również silnej presji ze strony gatunków inwazyjnych, w tym *M. edulis*. Grupy osobników *M. edulis* zostały zidentyfikowane z zastosowaniem genotypowania molekularnego na kadłubie barki, która przybyła z Middlesbrough w północnej Anglii i została zacumowana w pobliżu wraku statku wycieczkowego Costa Concordia (Isola del Giglio, północne Morze Tyrreńskie) w 2012 roku (Casoli i in., 2016). Jednak te grupy osobników ulegały wysokiej śmiertelności w temperaturach wody powyżej 22° C i nie żyły wystarczająco długo, aby skrzyżować się z lokalną populacją *M. galloprovincialis*.

Rozwój akwakultury w XX wieku ukierunkowanej na produkcję *Mytilus spp.* oraz innych gatunków małży i skorupiaków przyczynił się do niezamierzonego wprowadzenia i rozprzestrzenienia się wielu gatunków (Coll i in., 2010). Akwakultura może być również uznana za wektor transportu małży na Morzu Śródziemnym. Biorąc pod uwagę wprowadzanie do hodowli importowanych transportów, które nie były rejestrowane, bardzo trudno jest oszacować ich wpływ w obecny brak struktury geograficznej populacji *M. galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym. Coraz większą uwagę zwraca się na rozprzestrzenianie się *Mytilus spp.* przez dryf naturalnych lub sztucznych obiektów pływających (Miller i in., 2018; Recht i in., 2018; Zbawicka i in., 2019; Gardner i in., 2021). Plastikowe odpady mogły być ważnym wektorem transportującym *Mytilus spp.* na duże odległości na Północnym Atlantyku i w Oceanie Arktycznym (Kotwicki i in., 2021). Nie stwierdzono obecności *M. edulis* w warunkach naturalnych we Włoszech w rejonie Wenecji, który pochodziłby z handlu lub hodowli (Crocetta, 2012) i najprawdopodobniej nie ma jego populacji na całym wybrzeżu Włoch. Uzyskane wyniki w niniejszej pracy doktorskiej również nie potwierdzają istnienia *M. edulis* wśród rodzimych populacji *M. galloprovincialis* na wybrzeżach Hiszpanii.

## **7.2 Polimorfizm genetyczny inwazyjnych populacji *M. galloprovincialis* u wybrzeży południowej Afryki**

W niniejszej pracy po raz pierwszy zastosowano genotypowanie SNP do zbadania polimorfizmu genetycznego populacji *Mytilus* w Południowej Afryce. Przeanalizowano międzyregionalne różnicowanie genetyczne *M. galloprovincialis* z trzech lokalizacji na wybrzeżu Południowego Atlantyku i trzech na wybrzeżu Oceanu Indyjskiego. Stwierdzono niski poziom różnicowania genetycznego między populacjami tego gatunku w badanym rejonie, co jest charakterystyczne dla populacji inwazyjnych. Wszystkie badane próby z Afryki Południowej we wszystkich przeprowadzonych analizach wyników grupowały się z referencyjnymi próbami atlantyckiej formy *M. galloprovincialis*. Świadczy to o ich silnym podobieństwie jednoznacznie wskazującym na geograficzny rejon, z którego pochodzi populacja źródłowa, obejmujący Atlantyckie wybrzeża Afryki północnej (Maroko) i południowej Europy (Hiszpania i południowa Francja) i z którego nastąpiła inwazja. Tym samym wykluczono możliwość, że na części wybrzeża Południowej Afryki mogłaby się

znajdować populacja *M. galloprovincialis* pochodząca z Morza Śródziemnego. Uzyskane wyniki badań SNP potwierdziły wcześniej opublikowane przypuszczenia o pochodzeniu inwazyjnych populacji *M. galloprovincialis* z wybrzeży Południowej Afryki na podstawie badań z użyciem pojedynczych diagnostycznych markerów molekularnych: DNA jądrowego i mitochondrialnego (Daguin i Borsa, 2000; Zardi i in., 2018).

Jedna z badanych prób pochodziła z hodowli w Zatoce Saldanha, tj. rejonu, w którym stwierdzono po raz pierwszy pojawienie się *M. galloprovincialis* na początku lat 70. (Branch i Steffani, 2004). W zatoce tej jest od wielu lat prowadzona hodowla omułków do celów konsumpcyjnych (Stenton-Dozey i in., 2001). Z tego rejonu, *M. galloprovincialis* rozszerzał swój zasięg na wybrzeżach Południowej Afryki w kierunku północnym średnio 115 km na rok do środkowego wybrzeża Namibii oraz w kierunku południowym ok. 25 km rocznie do Przylądka Dobrej Nadziei i na wschód na wybrzeże Oceanu Indyjskiego (Hockey i Schurink, 1992; Zardi i in., 2007). Rozszerzenie jego zasięgu w kierunku południowym było również związane z introdukcją do celów akwakultury (Branch i Steffani, 2004; McQuaid i Phillips, 2000).

Wybrzeża Afryki Południowej są zasiedlone przez dwa gatunki natywne małży podobnych morfologicznie do omułków *Mytilus*: *Choromytilus meridionalis* i *Perna perna*, (Grant i in., 1984; Harris i in., 1998) oraz jeden inwazyjny *Semimytilus algosus* (de Greef i in., 2013). Z tego powodu, do pewnej identyfikacji inwazyjnego *M. galloprovincialis* niezbędne było zastosowanie metod genetycznych. Porównanie metodami elektroforezy allozymów i morfologii populacji z Południowej Afryki wykazało jej większe podobieństwo do populacji *M. galloprovincialis* ze Śródziemnomorskiego wybrzeża Hiszpanii niż do *M. edulis* z Danii (Grant i Cherry, 1985). Obecność *M. galloprovincialis* w rejonie od Hermanus (południowy- wschód od Kapsztadu) do Saldanha Bay została po raz pierwszy stwierdzona przez Grant i in. (1984), jednak zastosowanie metod elektroforezy allozymów nie wykazało obniżonej różnorodności genetycznej, której można się spodziewać w populacjach inwazyjnych. Użycie polimorficznego markera DNA jądrowego mac-1 wykazało podobieństwo populacji z Południowej Afryki do Atlantyckiego *M. galloprovincialis* z Portugalii (Daguin i Borsa, 2000). Użycie innego, mniej polimorficznego markera ME 15-16 potwierdziło podobieństwo frekwencji jednego allelu do populacji atlantyckich z południowej Europy a analiza restrykcyjna (RFLP) genu mitochondrialnego 16S

wykazała obecność haplogrup z półkuli północnej: *M. galloprovincialis* i *M. edulis* (Zardi i in., 2018). Natomiast, sekwencjonowanie części genu oksydazy cytochromowej I (COI) mitochondrialnego DNA o długości 400 pz wykazało niską dywergencję genetyczną (ang. low genetic divergernce), zinterpretowaną jako charakterystyczną dla populacji inwazyjnych (Zardi i in., 2007). W przeciwieństwie do tego, podobny poziom polimorfizmu SNP populacji z Południowej Afryki do populacji natywnych *M. galloprovincialis* wskazuje na brak widocznego obniżenia polimorfizmu genetycznego, który mógłby być spowodowany efektem założyciela oraz silną ekspansją populacji do nowego rejonu.

Otrzymane wyniki świadczą o potrzebie monitoringu dystrybucji *M. galloprovincialis* w Oceanie Południowym, w celu zrozumienia bioinwazji i kontroli ewentualnego wypierania rodzimych linii ewolucyjnych.

### **7.3 Identyfikacja pochodzenia geograficznego oraz przynależności taksonomicznej prób żywnościowych omułek *Mytilus***

Genetyczna identyfikacja omułek na poziomie gatunkowym i populacyjnym jest istotną częścią badań związanych z akwakulturą i przemysłem przetwórczym. Ze względu na duże podobieństwo morfologiczne omułek *Mytilus* mogą być one omyłkowo lub świadomie źle klasyfikowane. Analizowane produkty żywnościowe w niniejszej pracy pod kątem identyfikacji gatunkowej oraz pochodzenia geograficznego wykazały konsekwentnie podział badanych prób na 3 gatunki: *M. gallopovincialis*, *M. edulis* i *M. chilensis*, w tym dodatkowy podział *M. gallopovincialis* na dwie formy w zależności od lokalizacji - z Morza Śródziemnego, oraz z Oceanu Atlantyckiego. W kilku badanych próbkach żywności zaobserwowano osobniki z mieszaną pulą genów (mieszance). Wśród prób *M. galloprovincialis* zaobserwowano domieszkę genów *M. edulis*: CST (5 osobników), ESC (3 osobniki), PNV (3 osobniki), PZH (2 osobniki), SBR (5 osobników), PZI (4 osobniki), MSMA (1 osobnik). Próbka CST z etykietą wskazującą na *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego została przypisana do tego gatunku z Oceanu Atlantyckiego. Próba PZH z hiszpańskiego wybrzeża Atlantyku została umiejscowiona na drzewie NJ wśród innych prób *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego. Próbka referencyjna PZC z Chile utworzyła odrębną linię filogenetyczną, a pozostałe próbki żywności utworzyły grupę typową dla *M. edulis*.

Otrzymane wyniki analiz wykazały, że wśród badanych próbek żywności stwierdzono przyporządkowanie do dwóch taksonów: *M. galloprovincialis* i *M. edulis*. Można stwierdzić, że większość informacji dotyczących próbek była zgodna z opisem na etykietach, natomiast kilka próbek zawierało nieprawdziwe informacje o gatunku. Omułki pochodzące z okolic ujścia rzeki Ebro w Hiszpanii: próbki LAM, MEZ, TAR deklarowane przez sprzedawców jako *M. galloprovincialis*, w wyniku analiz okazały się należeć do *M. edulis*. Na etykiecie zadeklarowano, że próba CST, pochodziła z Morza Śródziemnego, jednak analiza SNP wykazała, że próba ta była najbardziej podobna do z prób *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego. Próba ESC o nieznanym pochodzeniu została również zidentyfikowana jako pochodząca najprawdopodobniej z hiszpańskiego wybrzeża Atlantyku. Zgodnie z oczekiwaniami, próbka SBR z Południowego Atlantyku z Zatoki Saldanha w Afryce Południowej to introdukowany *M. galloprovincialis* - analizy wykazały jego bliski związek z populacjami z Północnego Atlantyku. Otrzymane wyniki potwierdzają, że pojedyncze molekularne markery diagnostyczne mogą dostarczyć jedynie wstępnych informacji na temat statusu taksonomicznego małży półkuli północnej, w tym produktów żywnościowych (Araneda i in., 2021; Wenne i in., 2022a). Zestaw markerów molekularnych, takich jak SNP, jest potrzebny do uzyskania właściwych informacji dotyczących pochodzenia geograficznego i przynależności gatunkowej oraz weryfikacji danych na etykietach żywności oraz monitorowania handlu omułkami (Araneda i in., 2021; Wenne i in., 2022a).

Rosnąca na całym świecie konsumpcja ryb i owoców morza doprowadziła do pojawiających się oszustw gospodarczych związanych z nielegalnym połowem i zmianami nazw gatunków wpisywanych na etykietach (Martinez i in., 2005). Najczęstsze są dwa rodzaje fałszowania żywności: pierwszy to celowe zastąpienie jednego gatunku innym dokonywane przez nieuczciwych producentów lub sprzedawców dla korzyści finansowych, drugi to niezamierzone błędy w trakcie produkcji lub przechowywania (Belete, 2015). Unia Europejska ustanowiła przepisy nakazujące umieszczanie na etykietach ryb i owoców morza informacje o nazwie gatunku, kraju pochodzenia i metodach produkcji (Martinez i in., 2005; Wenne i in., 2022a). Egzekwowanie przepisów związanych z etykietowaniem jest skomplikowane, ponieważ wiele produktów żywnościowych jest przetwarzana, co maskuje cechy morfologiczne (Moran i Garcia-Vazquez, 2006). Do efektywnego egzekwowania



przepisów związanych z etykietowaniem i zastępowaniem produktów niezbędne jest stosowanie dokładnych metod analitycznych skutecznych przy identyfikowaniu gatunków z wyłączeniem cech morfologicznych (Mafra i in., 2007). Oprócz negatywnego wpływu fałszowania pochodzenia produktów żywnościowych na rynek komercyjny, złe oznakowanie może mieć negatywne konsekwencje dla ochrony bioróżnorodności mórz i skuteczności programów ochrony gatunków zagrożonych (Civera, 2003; Martinez i in., 2005; Teletchea i in., 2005; Wenne i in., 2022a). Dodatkowo stosowanie właściwych metod identyfikacji gatunkowej umożliwia weryfikowanie i ograniczanie działalności kłusowników i handlu gatunkami nadmiernie eksploatowanymi (Kyle i Wilson, 2007). Badania nad metodami identyfikacji gatunkowej muszą być optymalizowane pod kątem konkretnego produktu żywnościowego i dawać powtarzalne i niezaprzeczalne wyniki (Woolfe i Primrose 2004). Komplikacje mogą pojawić się wtedy, gdy gatunek charakteryzuje się dużą zmiennością wewnątrzgatunkową, ponadto niektóre sposoby przetwarzania denaturują białka i mogą doprowadzić do degradacji DNA (Chapela i in., 2002; Armani i in., 2013; Wenne i in., 2022a).

## 8. Wnioski

- Analiza polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) dla zestawu 53 loci jest odpowiednim narzędziem do zbadania zróżnicowania genetycznego naturalnych populacji *Mytilus galloprovincialis* w Morzu Śródziemnym i w akwenach do niego przyległych.
- Wartości wskaźnika zróżnicowania populacji  $F_{ST}$ , analiza korespondencji (CA) i analiza STRUCTURE wykazały cztery grupy populacji *M. galloprovincialis*: populacje reprezentujące formę Atlantycką, populacje w zachodniej części Morza Śródziemnego, populacje z Morza Egejskiego oraz Morza Marmara, Czarnego i Azowskiego.
- Populacja *M. galloprovincialis* w Morzu Czarnym reprezentuje podpróbę genotypów z M. Śródziemnego i powstała przez ekspansję populacji ze wschodniej części M. Śródziemnego po wlewie wód słonych przez M. Marmara i przyległe cieśniny do jeziora słodkowodnego później niż 10,5 tys. lat temu.
- Słabe zróżnicowanie populacji *M. galloprovincialis* wewnątrz M. Śródziemnego w zestawieniu ze zróżnicowaną historią poszczególnych basenów może być spowodowane przyczynami naturalnymi oraz działalnością człowieka.
- Aktualnie istniejące współczesne naturalne bariery środowiskowe jak układy prądów morskich (np. w rejonie Almeria-Oran) czy gradient zasolenia (na wschód od Dardaneli w Morzu Marmara) sprzyjają utrzymywaniu się zróżnicowania genetycznego populacji.
- Zbadanie zestawu SNP nie wykazało zmniejszonego polimorfizmu genetycznego introdukowanych populacji atlantyckiej formy *M. galloprovincialis* z warunków naturalnych i hodowlanych na wybrzeżach Oceanu Atlantyckiego i Indyjskiego Afryki Południowej.
- Uzyskane wyniki badań wykazują, że analiza SNP może służyć weryfikowaniu informacji dotyczących przynależności taksonomicznej *Mytilus* w produktach żywnościowych pozyskanych ze sprzedaży w Europie.
- Analiza SNP umożliwia ocenę zgodności informacji dotyczących taksonu i pochodzenia geograficznego znajdujących się na etykietach informacyjnych umieszczanych na produktach żywnościowych *Mytilus*.

## 9. Literatura

- Ahmad, M., Beardmore, J.A.,** 1976. Genetic evidence that the “Padstow mussel” is *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*. 35, 139-147.
- Alexander, M.E., Adams, R., Dick, J.T.A., Robinson, T.B.,** 2015. Forecasting invasions: resource use by mussels informs invasion patterns along the South African coast. *Marine Biology*. 162, 2493-2500.
- Álvarez-Varas, R., Véliz, D., Vélez-Rubio, G.M., Fallabrino, A., Zárata, P., Heidemeyer, M., Godoy, D.A., Benítez, H.A.,** 2019. Identifying genetic lineages through shape: An example in a cosmopolitan marine turtle species using geometric morphometrics. *Plos One*. 14, e0223587.
- Araneda, C., Pardo, M.Á., Jiménez, E., Longa, Á., Lee, R.-S., Segura, C., Zbawicka, M., Wenne, R., Gardner, J.P., Larraín, M.A.,** 2021. A comment on Giusti et al. (2020) “Mussels (*Mytilus* spp.) products authentication: A case study on the Italian market confirms issues in species identification and arises concern on commercial names attribution, *Food Control* Volume 118, December 2020, 107, 379”. *Food Control*. 121, 107626.
- Avdelas, L., Avdic-Mravlje, E., Borges Marques, A.C., Cano, S., Capelle, J.J., Carvalho, N., Cozzolino, M., Dennis, J., Ellis, T., Fernández Polanco, J.M., Guillen, J., Lasner, T., Le Bihan, V., Llorente, I., Mol, A., Nicheva, S., Nielsen, R., Oostenbrugge, H., Villasante, S., Visnic, S., Zhelev, K., Asche, F.,** 2021. The decline of mussel aquaculture in the European Union: causes, economic impacts and opportunities. *Reviews in Aquaculture*. 13, 91-118.
- Barsotti, G., Meluzzi, C.,** 1968. Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lamark. *Conchiglie*. 4, 50-58.
- Barton, N.H. & Hewitt, G.M.,** 1985. Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 113– 148.

- Bayne, B.L.**, (1976) Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Beaumont, A.R., Hawkins, M.P., Doig, F.L., Davies, I.M., Snow, M.**, 2008. Three species of *Mytilus* and their hybrids identified in a Scottish Loch: natives, relicts and invaders? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 367, 100-110.
- Belaústegui, Z., Muñiz, F.**, 2016. Ichnology of the Lepe area (Huelva, SW Spain): trace fossils at the Pliocene 'Arroyo Valleforero' section and modern traces at the Piedras Estuary. Comunicações Geológicas. 103, Especial I, 131-142.
- Benjamin, J., Rovere, A., Fontana, A., Furlani, S., Vacchi, M., Inglis, R.H., Galili, E., Antonioli, F., Sivan, D., Miko, S., Mourtzas, N., Felja, I., Meredith-Williams, M., Goodman-Tchernov, B., Kolaiti, E., Anzidei, M., Gehrels, R.**, 2017. Late Quaternary sea-level changes and early human societies in the central and eastern Mediterranean Basin: An interdisciplinary review. Quaternary International. 449, 29-57.
- Berge, J., Johnsen, G., Nilsen, F., Gulliksen, B., Slagstad, D.**, 2005. Ocean temperature oscillations enable reappearance of blue mussels *Mytilus edulis* in Svalbard after a 1000 year absence. Marine Ecology Progress Series. 303, 167-175.
- Bianchi, C.N., Morri, C., Chiantore, M., Montefalcone, M., Parravicini, V., Rovere, A.**, 2012. Mediterranean Sea biodiversity between the legacy from the past and a future of change. in: Stambler, N. (Ed.), Life in the Mediterranean Sea: a Look at Habitat Changes. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 1 - 55.
- Bierne, N., Borsa, P., Daguin, C., Jollivet, D., Viard, F., Bonhomme, F., David, P.**, 2003. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. Molecular Ecology. 12, 447-461.

- Bierne, N., David, P., Langlade, A., Bonhomme, F.,** 2002. Can habitat specialisation maintain a mosaic hybrid zone in marine bivalves? *Marine Ecology Progress Series*. 245, 157-170.
- Birckolz, C.J., Gernet, M.D.V., Baggio, R.A., Silveira Júnior, N., Simone, L.R.L.d., Belz, C.E.,** 2020. First record of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae) in Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 60, e20206007.
- Blicher, M. E., Sejr, M. K., & Høgslund, S.,** 2013. Population structure of *Mytilus edulis* in the intertidal zone in a sub-Arctic fjord, SW Greenland. *Marine Ecology Progress Series*, 487, 89– 100.
- Borja, Á., Dauer, D.M., Elliott, M., Simenstad, C.A.,** 2010. Medium- and Long-term Recovery of Estuarine and Coastal Ecosystems: Patterns, Rates and Restoration Effectiveness. *Estuaries and Coasts*. 33, 1249-1260.
- Braby, C.E., Somero, G.N.,** 2006. Ecological gradients and relative abundance of native (*Mytilus trossulus*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) blue mussels in the California hybrid zone. *Marine Biology*. 148, 1249-1262.
- Branch, G.M., Steffani, Nina C.,** 2004. Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 300, 189-215.
- Brannock, P.M., Wethey, D.S., Hilbish, T.J.,** 2009. Extensive hybridization with minimal introgression in *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* in Hokkaido, Japan. *Marine Ecology Progress Series*. 383, 161-171.
- Brooks, T.M., Cuttelod, A., Faith, D.P., Garcia-Moreno, J., Langhammer, P., Pérez-Espona, S.,** 2015. Why and how might genetic and phylogenetic diversity be reflected in the identification of key biodiversity areas? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 370, 20140019.

- Brumfield, R. T., Beerli, P., Nickerson, D. A., Edwards, S. V.,** 2003. The utility of single nucleotide polymorphism in inferences of population history. *Trends in Ecology and Evolution*. 18, 249–256.
- Cardenas, L., Leclerc, J.C., Bruning, P., Garrido, I., Detree, C., Figueroa, A., Astorga, M., Navarro, J.M., Johnson, L.E., Carlton, J.T., Pardo, L.,** 2020. First mussel settlement observed in Antarctica reveals the potential for future invasions. *Scientific Reports*. 10, 5552.
- Carlton, J.T., Geller, J.B.,** 1993. Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organisms. *Science*. 261, 78-82.
- Christensen, H.T., Dolmer, P., Petersen, J.K., Tørring, D.,** 2012. Comparative study of predatory responses in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) produced in suspended long line cultures or collected from natural bottom mussel beds. *Helgoland Marine Research*. 66, 1-9.
- Comesaña, A.S., Sanjuan, A.,** 1997. Microgeographic allozyme differentiation in the hybrid zone of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. on the continental European coast. *Helgolander Meeresuntersuchungen*. 51, 107-124.
- Comesaña, A.S., Toro, J.E., Innes, D.J., Thompson, R.J.,** 1999. A molecular approach to the ecology of a mussel (*Mytilus edulis* – *M. trossulus*) hybrid zone on the east coast of Newfoundland, Canada. *Marine Biology*. 133, 213-221.
- Daguin, C., Borsa, P.,** 2000. Genetic relationships of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck populations worldwide: evidence from nuclear-DNA markers. *Geological Society, London, Special Publications*. 177, 389-397.
- De Greef, K., Griffiths, C.L., Zeeman, Z.,** 2013. Deja vu? A second mytilid mussel, *Semimytilus algosus*, invades South Africa's west coast. *African Journal of Marine Science*. 35, 307-313.
- De Wit, P., Jonsson, P.R., Pereyra, R.T., Panova, M., André, C., Johannesson, K.,** 2020. Spatial genetic structure in a crustacean herbivore

highlights the need for local considerations in Baltic Sea biodiversity management. *Evolutionary applications*. 13, 974-990.

**Dias, P.J., Bland, M., Shanks, A.M., Beaumont, A., Piertney, S.B., Davies, I.M., Snow, M.,** 2008. *Mytilus* species under rope culture in Scotland: implications for management. *Aquaculture International*. 17, 437-448.

**Dias, P.J., Dordor, A., Tulett, D., Piertney, S., Davies, I.M., Snow, M.,** 2009. Survey of mussel (*Mytilus*) species at Scottish shellfish farms. *Aquaculture Research*. 40, 1715-1722.

**d'Orbigny, A.,** 1842. *Voyage dans l'Amérique méridionale (le Brésil, la république orientale de l'Uruguay, la république d'Argentine, la Patagonie, la république du Chili, la république de Bolivie, la république du Pérou), exécuté pendant les années 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832 et 1833. Vol. 5, Mollusques (1835–1843). Paris: P Bertrand. 758 str.*

**Edwards, C.A., Skibinski, D.O.F.,** 1987. Genetic variation of mitochondrial DNA in mussel (*Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*) populations from South West England and South Wales. *Marine Biology*. 94, 547-556.

**Eggermont, M., Cornillie, P., Dierick, M., Adriaens, D., Nevejan, N., Bossier, P., Van den Broeck, W., Sorgeloos, P., Defoirdt, T., Declercq, A.M.,** 2020. The blue mussel inside: 3D visualization and description of the vascular-related anatomy of *Mytilus edulis* to unravel hemolymph extraction. *Scientific Reports*. 10, 6773.

**FAO,** 2004a. Cultured aquatic species information programme. *Mytilus edulis*. Cultured aquatic species information programme. Text by Gulletquer, P. In: FAO Fisheries and Aquaculture Division [online]. Rome. Updated [Cited 21 October 2021]. [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus\\_edulis/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_edulis/en).

**FAO,** 2004b. Cultured aquatic species information programme. *Mytilus galloprovincialis*. Cultured aquatic species information programme. Text by figueras, A. In: FAO Fisheries and Aquaculture Division [Online]. Rome.

Updated [Cited 21 October 2021].  
[https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus\\_galloprovincialis/en](https://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/en).

**FAO**, 2016. Global Statistical Collections. Fisheries and aquaculture software. In FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/en>

**FAO**, 2022. FAO Yearbook Fishery and Aquaculture Statistics 2019. Rome, 110 str.

**Feder, H.M., Norton, D.W., Geller, J.B.**, 2003. A review of apparent 20th century changes in the presence of mussels (*Mytilus trossulus*) and macroalgae in Arctic Alaska, and of historical and paleontological evidence used to relate mollusc distributions to climate change. *Arctic*. 56, 391-407.

**Ferreira, J.G., Bricker, S.B.**, 2016. Goods and services of extensive aquaculture: Shellfish culture and nutrient trading. *Aquaculture International* 24, 803–825.

**Fraisse, C., Belkhir, K., Welch, J.J., Bierne, N.**, 2016. Local interspecies introgression is the main cause of extreme levels of intraspecific differentiation in mussels. *Molecular Ecology*. 25, 269-286.

**Fraser, C.I., Nikula, R., Waters, J.M.**, 2011. Oceanic rafting by a coastal community. *Proceedings. Biological Sciences*. 278, 649-655.

**Gaitán-Espitia, J.D., Quintero-Galvis, J.F., Mesas, A., D'Elía, G.**, 2016. Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomorpha): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. *Scientific Reports*. 6, 26853.

**Gardner, J.P.A.**, 1996. The *Mytilus edulis* species complex in southwest England: effects of hybridization and introgression upon interlocus associations and morphometric variation. *Marine Biology*. 125, 385-399.



- Gardner, J.P.A., Seed, R.,** 1992. Systematics Evolution and Distribution of Mussels Belonging to the Genus *Mytilus* - an Overview. American Malacological Bulletin. 9, 123-137.
- Gardner, J.P.A., Thompson, R.J.,** 2001. The effects of coastal and estuarine conditions on the physiology and survivorship of the mussels *Mytilus edulis*, *M. trossulus* and their hybrids. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 265, 119-140.
- Gardner, J.P.A., Thompson, R.J.,** 2009. Influence of genotype and geography on shell shape and morphometric trait variation among North Atlantic blue mussel (*Mytilus* spp.) populations. Biological Journal of the Linnean Society. 96, 875-897.
- Gardner, J.P.A., Zbawicka, M., Westfall, K.M., Wenne, R.,** 2016. Invasive blue mussels threaten regional scale genetic diversity in mainland and remote offshore locations: the need for baseline data and enhanced protection in the Southern Ocean. Global Change Biology. 22, 3182-3195.
- Gaston, K. J., Blackburn, T. M.,** 2000. Pattern and Process in Macroecology (Blackwell Science, Oxford).
- Geller, J.B.,** 1999. Decline of a Native Mussel Masked by Sibling Species Invasion. Conservation Biology. 13, 661-664.
- Gérard, K., Bierne, N., Borsa, P., Chenuil, A., Féral, J.P.,** 2008. Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. Molecular phylogenetics and Evolution. 49, 84-91.
- Giantsis, I.A., Abatzopoulos, T.J., Angelidis, P., Apostolidis, A.P.,** 2014a. Mitochondrial control region variability in *Mytilus galloprovincialis* populations from the central-Eastern Mediterranean Sea. International Journal of Molecular Sciences. 15, 11614-11625.
- Giantsis, I.A., Mucci, N., Randi, E., Abatzopoulos, T.J., Apostolidis, A.P.,** 2014b. Microsatellite variation of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in

central and eastern Mediterranean: genetic panmixia in the Aegean and the Ionian Seas. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 94, 797-809.

**Giantsis, I.A., Kravva, N., Apostolidis, A.P.,** 2012. Genetic characterization and evaluation of anthropogenic impacts on genetic patterns in cultured and wild populations of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Greece. *Genetics and Molecular Research*. 11, 3814-3823.

**Gosling, E.,** 1992a. Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. . In: *The mussel mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Developments in Aquaculture and Fisheries Science. Elsevier, Amsterdam. 25, 1-20.

**Gosling, E.,** 1992b. Genetics of *Mytilus*. In: Gosling E (ed) *The mussels Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, The Netherlands, Amsterdam, 25, 309–382.

**Gosling, E.,** 1992c. *The mussels Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, The Netherlands, Amsterdam, 25, 309–382.

**Gosling, E., Doherty, S., Howley, N.,** 2008. Genetic characterization of hybrid mussel (*Mytilus*) populations on Irish coasts. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 88, 341-346.

**Gould, A.A.,** 1850. Descriptions of new species of shells from the United States Exploring Expedition. *Proceedings of the Boston Society of Natural History*. 3: (1848-1851). Cambridge, Printed for the Society, Bolles and Houghton. 1851. 343-348.

**Gould, A.A.,** 1861. Descriptions of Shells collected by the North Pacific Exploring Expedition. *Proceedings of the Boston Society of Natural History*. 8 (1861-1862), Printed for the Society. 1862. 14-40.

**Grant, W.S., Cherry, M.I.,** 1985. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Southern Africa. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 90, 179-191.

- Han, Z., Mao, Y., Shui, B., Yanagimoto, T., Gao, T., 2017.** Genetic structure and unique origin of the introduced blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in the north-western Pacific: clues from mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) sequences. *Marine and Freshwater Research*. 68, 263-269.
- Handå, A., Ranheim, A., Olsen, A.J., Altin, D., Reitan, K.I., Olsen, Y., Reinertsen, H., 2012.** Incorporation of salmon fish feed and feces components in mussels (*Mytilus edulis*): Implications for integrated multi-trophic aquaculture in cool-temperate North Atlantic waters. *Aquaculture*. 370-371, 40-53.
- Harris, J.M., Branch, G.M., Elliott, B.L., Bronwen, C., Dye, A.H., McQuaid, C.D.T., Bruce J., Velasquez, C., 1998.** Spatial and temporal variability in recruitment of intertidal mussels around the coast of southern Africa. *African Zoology*. 33, 1-11.
- Hayhurst, S., Rawson, P.D., 2009.** Species-specific variation in larval survival and patterns of distribution for the blue mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in the Gulf of Maine. *Journal of Molluscan Studies*. 75, 215–222.
- Helyar, S.J., Hemmer-Hanson, J., Bekkevold, D. i in., 2011.** Applications of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources*. 11, 123– 136.
- Hilbish, T.J., Mullinax, A., Dolven, S.I., Meyer, A., Koehn, R.K., Rawson, P.D., 2000.** Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Marine Biology*. 136, 69-77.
- Hilbish, T., Carson, E., Plante, J., Weaver, L., Gilg, M., 2002.** Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. *Marine Biology*. 140, 137-142.

- Hockey, P.A.R., Schurink, v.E.C.**, 1992. The invasive biology of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on the southern african coast. Transactions of the Royal Society of South Africa. 48, 123-139.
- Holyoak, M., Leibold, MA., Moquet, N., Holt, RD., Hoopes, M.F.**, 2005. Metacommunities: a framework for large-scale community ecology. In: Holyoak, M.; Leibold, M.A.; Moquet, N., Holt, R.D. (eds) Metacommunities: spatial dynamics and ecological communities. University of Chicago Press, Chicago, IL, 2005. pp 1 – 34.
- Hughes, K.A., Pescott, O.L., Peyton, J., Adriaens, T., Cottier-Cook, E.J., Key, G., Rabitsch, W., Tricarico, E., Barnes, D.K.A., Baxter, N., Belchier, M., Blake, D., Convey, P., Dawson, W., Frohlich, D., Gardiner, L.M., Gonzalez-Moreno, P., James, R., Malumphy, C., Martin, S., Martinou, A.F., Minchin, D., Monaco, A., Moore, N., Morley, S.A., Ross, K., Shanklin, J., Turvey, K., Vaughan, D., Vaux, A.G.C., Werenkraut, V., Winfield, I.J., Roy, H.E.**, 2020. Invasive non-native species likely to threaten biodiversity and ecosystems in the Antarctic Peninsula region. *Global Change Biology*. 26, 2702-2716.
- Hupé, H.**, 1854. Moluscos de Chile. In: Gay C, editor. Historia fisica y politica de Chile. Zoologia, vol. 8. Paris: C. Gay. 407 str.
- Inoue, K., Odo, S., Noda, T., Nakao, S., Takeyama, S., Yamaha, E., Yamazaki, F., Harayama, S.**, 1997. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers. *Marine Biology*. 128, 91-95.
- Iwasaki, K., Yokoyama, I., Ishimori, K., Ishimori, T., Ishida, S., Kuwahara, Y.**, 2020. Discovery of the boreal mytilid mussel *Mytilus trossulus* or hybrids with *M. galloprovincialis* on the Pacific coast of Tohoku District, Japan. *Chiribotan*. 50, 112-124.
- Janssen, A.W., Peijnenburg, K.T.C.A.**, 2014. Holoplanktonic Mollusca: Development in the Mediterranean Basin During the Last 30 Million Years and Their Future. 341-362. In: Goffredo S and Dubinsky Z. (Eds.). *The*

*Mediterranean Sea*. Its history and present challenges. Springer, Dordrecht Heidelberg New York London. 678 str.

**Jura, J., Wegrzyn, P., Zarebski, A., Wladyka, B., Koj, A.,** 2004. Identification of changes in the transcriptome profile of human hepatoma HepG2 cells stimulated with interleukin-1 $\beta$ . *Biochimica et Biophysica Acta* 1689, 120–133.

**Kamermans, P., Capelle, J.J.,** 2019. Provisioning of Mussel Seed and Its Efficient Use in Culture. In: Smaal, A., Ferreira, J., Grant, J., Petersen, J., Strand, Ø. *Goods and Services of Marine Bivalves*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9_3), 27-49.

**Kamermans, P., Galley, T., Boudry, P., Fuentes, J., McCombie, H., Batista, F.M., Blanco, A., Dominguez, L., Cornette, F., Pincot, L., Beaumont, A.,** 2013. Blue mussel hatchery technology in Europe. *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*, 339-373.

**Karakousis, Y., Skibinski, D.O.F.,** 1992. An analysis of allozyme, mitochondrial DNA and morphological variation in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) populations from Greece. *Experientia*. 48, 878-881.

**Kartavtsev, Y.P., Katolikova, M.V., Sharina, S.N., Chichvarkhina, O.V., Masalkova, N.A.,** 2014. A population genetic study of the hybrid zone of *Mytilus trossulus* Gould, 1850 and an introduced species, *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819, (Bivalvia: Mytilidae) in Peter the Great Bay in the Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*. 40, 208-216.

**Kawecki, T. J., Ebert D.,** 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7, 1225–1241.

**Kijewski, T., Śmietanka, B., Zbawicka, M., Gosling, E., Hummel, H., Wenne, R.,** 2011. Distribution of *Mytilus* taxa in European coastal areas as inferred from molecular markers. *Journal of Sea Research*. 65, 224-234.

**Kijewski, T., Zbawicka, M., Strand, J., Kautsky, H., Kotta, J., Ratsep, M., Wenne, R.,** 2019. Random forest assessment of correlation between

environmental factors and genetic differentiation of populations: Case of marine mussels *Mytilus*. *Oceanologia*. 61, 131-142.

**Kotta, J., Oganjan, K., Lauringson, V., Parnoja, M., Kaasik, A., Rohtla, L., Kotta, I., Orav-Kotta, H.,** 2015. Establishing Functional Relationships between Abiotic Environment, Macrophyte Coverage, Resource Gradients and the Distribution of *Mytilus trossulus* in a Brackish Non-Tidal Environment. *PLoS One*. 10, e0136949.

**Kotwicki, L., Weslawski, J.M., Włodarska-Kowalczyk, M., Mazurkiewicz, M., Wenne, R., Zbawicka, M., Minchin, D., Olenin, S.,** 2021. The re-appearance of the *Mytilus* spp. complex in Svalbard, Arctic, during the Holocene: The case for an arrival by anthropogenic flotsam. *Global and Planetary Change*. 202, 103502.

**Krijgsman, W., Capella, W., Simon, D., Hilgen, F.J., Kouwenhoven, T.J., Meijer, P.T., Sierra, F.J., Tubbare, M.A., van den Berg, B.C.J., van der Schee, M., Flecker, R.,** 2018. The Gibraltar Corridor: Watergate of the Messinian Salinity Crisis. *Marine Geology*. 403, 238-246.

**Lamarck, De , M.,** 1819. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres présentant les caractères généraux et particuliers de ces animaux, leur distribution, leurs classes, leurs familles, leurs genres et la citation des principales espèces qui s'y rapportent. vol. 6. 1. Paris: Librairie Verdière; 1819. 232 str.

**Lander, T.R., Robinson, S.M.C., MacDonald, B.A., Martin, J.D.,** 2013. Characterization of the suspended organic particles released from salmon farms and their potential as a food supply for the suspension feeder, *Mytilus edulis* in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) systems. *Aquaculture*. 406-407, 160-171.

**Larraín, M.A., Zbawicka, M., Araneda, C., Gardner, J.P.A., Wenne, R.,** 2018. Native and invasive taxa on the Pacific coast of South America: Impacts on aquaculture, traceability and biodiversity of blue mussels (*Mytilus* spp.). *Evolutionary Applications*. 11, 298-311.

- Lindberg, D.R.**, 1991. Marine Biotic Interchange Between the Northern and Southern Hemispheres. *Paleobiology*. 17, 308-324.
- Linnaeus, C.**, 1758. *Systema Naturae*. 1, Editio Decima, Holmiae, Impensis Direct, Laurentii Salvii, 862 str.
- Lins, D.M., Zbawicka, M., Wenne, R., Poćwierz-Kotus, A., Molina, J.R.A., Alves, L.P., Rocha, R.M.**, 2021. Ecology and genetics of *Mytilus galloprovincialis*: A threat to bivalve aquaculture in southern Brazil. *Aquaculture*. 540, 736753.
- Lintas, C., Seed, R.**, 1994. Spatial variation in the fauna associated with *Mytilus edulis* on a wave-exposed rocky shore. *Journal of Molluscan Studies*. 60, 165-174.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., De Poorter, M.**, 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: A selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Group. [http://www.issg.org/pdf/publications/worst\\_100/english\\_100\\_worst.pdf](http://www.issg.org/pdf/publications/worst_100/english_100_worst.pdf)
- Lucas, J.M., Vaccaro, E., Waite, J.H.**, 2002. A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Experimental Biology*. 205, 1807.
- Mace, G.M.**, 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London Series B* 359, 711–719.
- Mathiesen, S.S., Thyrring, J., Hemmer-Hansen, J., Berge, J., Sukhotin, A., Leopold, P., Bekaert, M., Sejr, M.K., Nielsen, E.E.**, 2017. Genetic diversity and connectivity within *Mytilus* spp. in the subarctic and Arctic. *Evolutionary Applications*. 10, 39-55.
- McDonald, J.H., Koehn, R.K.**, 1988. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Marine Biology*. 99, 111-118.

- McDonald, J.H., Seed, R., Koehn, R.K.**, 1991. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the northern and southern hemispheres. *Marine Biology*. 111, 323-333.
- McQuaid, C.D., Phillips, T.E.**, 2000. Limited wind-driven dispersal of intertidal mussel larvae: in situ evidence from the plankton and the spread of the invasive species *Mytilus galloprovincialis* in South Africa. *Marine Ecology Progress Series*. 201, 211-220.
- Michalek, K., Ventura, A., Sanders, T.**, 2016. *Mytilus* hybridisation and impact on aquaculture: A minireview. *Marine Genomics*. 27, 3-7.
- Moen, T., Hayes, B., Baranski, M., Berg, P.R., Kjøglum, S., Koop, B.F., Davidson, W.S., Omholt, S.W., Lien, S.**, 2008. A linkage map of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on EST-derived SNP markers. *BMC Genomics*. 9, 223.
- Moore, J. M., Wein, R. W.**, 1977. Viable seed populations by soil depth and potential site recolonization after disturbance. *Canadian Journal of Botany*. 55, 2408–2412.
- Morin, P.A., Luikart, G., Wayne, R.K.**, 2004. The SNP Workshop Group. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 19, 208–216.
- Paterno, M., Bat, L., Souissi, J.B., Boscari, E., Chassanite, A., Congiu, L., Guarnieri, G., Kruschel, C., Mačić, V., Marino, I.A.M., Micu, D., Milchakova, N., Panayotova, M., Papetti, C., Planes, S., Strungaru, S., Todorova, V.R., Voutsinas, E., Zane, L.**, 2019. A Genome-Wide Approach to the Phylogeography of the Mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Adriatic and the Black Seas. *Frontiers in Marine Science*. 6, 566.
- Pariset, L., Chillemi, G., Bongiorno, S., Spica, V.R., Volentini, A.**, 2009. *New Biotechnology*. 25, 272–279.



- Pelini, S. L., Keppel, J. A., Kelley, A. E., Hellmann, J. J.,** 2010. Adaptation to host plants may prevent rapid insect responses to climate change. *Global Change Biology*. 16, 2923.
- Picotti, V., Negri, A., Capaccioni, B.,** 2014. The Geological Origins and Paleooceanographic History of the Mediterranean Region: Tethys to Present. in: Goffredo, S., Dubinsky, Z. (Eds.), *The Mediterranean Sea Its history and present challenges*. Springer, Dordrecht, pp. 3-10.
- Popovic, I., Riginos, C.,** 2020. Comparative genomics reveals divergent thermal selection in warm- and cold-tolerant marine mussels. *Molecular Ecology*. 29, 519-535.
- Quesada, H., Beynon, C.M., Skibinski, D.O.,** 1995a. A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation. *Molecular Biology and Evolution*. 12, 521-524.
- Quesada, H., Zapata, C., Alvarez, G.,** 1995b. A multilocus allozyme discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: the interaction of ecological and life-history factors. *Marine Ecology Progress Series*. 116, 99-115.
- Rawson, P.D., Agrawal, V., Hilbish, T.J.,** 1999. Hybridization between the blue mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* along the Pacific coast of North America: evidence for limited introgression. *Marine Biology*. 134, 201-211.
- Riginos, C., Cunningham, C.W.,** 2005. Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* x *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Molecular Ecology*. 14, 381-400.
- Riginos, C., Henzler, C.M.,** 2008. Patterns of mtDNA diversity in North Atlantic populations of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 155, 399-412.

- Riginos, C., Sukhdeo, K., Cunningham, C.W.,** 2002. Evidence for Selection at Multiple Allozyme Loci Across a Mussel Hybrid Zone. *Molecular Biology and Evolution*. 19, 347-351.
- Reimer, O., Tedengren, M.,** 1996. Phenotypical improvement of morphological defences in the mussel *Mytilus edulis* induced by exposure to the predator *Asterias rubens*. *Oikos*. 75, 383-390.
- Roux, C., Fraisse, C., Castric, V., Vekemans, X., Pogson, G.H., Bierne, N.,** 2014. Can we continue to neglect genomic variation in introgression rates when inferring the history of speciation? A case study in a *Mytilus* hybrid zone. *Journal of Evolutionary Biology*. 27, 1662-1675.
- Ruiz, G.M., Fofonoff, P.W., Carlton, J.T., Wonham, M.J., Hines, A.H.,** 2000 a. Invasion of coastal marine communities in North America: apparent patterns, processes, and biases. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31, 481–531.
- Ryan, W.B.F., Vachtman, D., McHugh, C., Çağatay, M.N., Mart, Y.,** 2014. A Channeled Shelf Fan Initiated by Flooding of the Black Sea. in: Goffredo, S., Dubinsky, Z. (Eds.), *The Mediterranean Sea Its history and present challenges*. Springer, Dordrecht, pp. 11-27.
- Saarman, N.P., Pogson, G.H.,** 2015. Introgression between invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) in the central California hybrid zone. *Molecular Ecology*. 24, 4723-4738.
- Sammer, O., Manchado, M., Infante, C., Zuasti, E., Crespo, A., Saoud, Y.,** 2008. Phylogenetic and introgression analyses of mitochondrial DNA in five natural populations of mussels (*Mytilus* spp.) from the North-Eastern Coasts of Morocco. *Moroccan Journal of Biology*. 4-5, 63 - 73.
- Sarver, S.K., Foltz, D.W.,** 1993. Genetic population structure of a species' complex of blue mussels (*Mytilus* spp.). *Marine Biology*. 117, 105-112.

- Seddon, J.M., Cote, J., Page, W.F., Aggen, S.H., Neale, M.C.,** 2005. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Archives of Ophthalmology*. 123:321–7.
- Seed, R.,** 1968. Factors Influencing Shell Shape in the Mussel *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 48, 561-584.
- Seed, R.,** 1996. Patterns of Biodiversity. In *The Macro-Invertebrate Fauna Associated With Mussel Patches On Rocky Shores*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 76, 203-210.
- Seed, R., Suchanek, T.H.,** 1992. Population and Community Ecology of *Mytilus*. In: Gosling, E., Ed., *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*, Elsevier, London, 87-169.
- Saavedra, C., Reyero, M.-I., Zouros, E.,** 1997. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*. 145, 1073– 1082.
- Shields, J.L., Barnes, P., Heath, D.D.,** 2008. Growth and survival differences among native, introduced and hybrid blue mussels (*Mytilus* spp.): genotype, environment and interaction effects. *Marine Biology*. 154, 919-928.
- Shaw, J.D., Terauds, A., Riddle, M.J., Possingham, H.P., Chown, S.L.,** 2014. Antarctica’s protected areas are inadequate, unrepresentative, and at risk. *PLoS Biology*. 12, e1001888.
- Simon, A., Arbiol, C., Nielsen, E.E., Couteau, J., Sussarellu, R., Burgeot, T., Bernard, I., Coolen, J.W.P., Lamy, J.-B., Robert, S., Skazina, M., Strelkov, P., Queiroga, H., Cancio, I., Welch, J.J., Viard, F., Bierne, N.,** 2020. Replicated anthropogenic hybridisations reveal parallel patterns of admixture in marine mussels. *Evolutionary Applications*. 13, 575-599.
- Simon, A., Fraisse, C., El Ayari, T., Liautard-Haag, C., Strelkov, P., Welch, J.J., Bierne, N.,** 2021. How do species barriers decay? Concordance and

local introgression in mosaic hybrid zones of mussels. *Journal of Evolutionary Biology*. 34, 208-223.

**Skibinski, D.O.F., Ahmad, M., Beardmore, J.A.,** 1978. Genetic Evidence for Naturally Occurring Hybrids Between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *Evolution*. 32, 354-364.

**Sokolowski, A., Lasota, R., Sami Alias, I., Pilczyńska, J., & Wołowicz, M.,** 2022. Prospects and opportunities for mussel *Mytilus trossulus* farming in the southern Baltic Sea (the Gulf of Gdańsk). *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 51(1), 53–73.

**Sosdian, S., Rosenthal, Y.,** 2009. Deep-Sea Temperature and Ice Volume Changes Across the Pliocene-Pleistocene Climate Transitions. *Science*. 325, 306-310.

**Stadmark, J., Conley, D.J.,** 2011. Mussel farming as a nutrient reduction measure in the Baltic Sea: Consideration of nutrient biogeochemical cycles. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 1385-1388.

**Stenton-Dozey J., Probyn T., Busby A.,** 2001. Impact of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) raft-culture on benthic macrofauna, in situ oxygen uptake, and nutrient fluxes in Saldanha Bay, South Africa. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 58, 1021-1031.

**Stuckas, H., Stoof, K., Quesada, H., Tiedemann, R.,** 2009. Evolutionary implications of discordant clines across the Baltic *Mytilus* hybrid zone (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*). *Heredity*. 103, 146-156.

**Suchanek, T.H., Geller, J.B., Kreiser, B.R., Mitton, J.B.,** 1997. Zoogeographic Distributions of the Sibling Species *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) and Their Hybrids in the North Pacific. *Biological Bulletin*. 193, 187 – 194.

**Śmietanka, B., Burzyński, A., Hummel, H., Wenne, R.,** 2014. Glacial history of the European marine mussels *Mytilus*, inferred from distribution of mitochondrial DNA lineages. *Heredity*. 113, 250-258.

- Telesca, L., Michalek, K., Sanders, T., Peck, L.S., Thyrring, J., Harper, E.M.,** 2018. Blue mussel shell shape plasticity and natural environments: a quantitative approach. *Scientific Reports*. 8, 2865.
- Teske, P.R., Sandoval-Castillo, J., Golla, T.R., Emami-Khoyi, A., Tine, M., von der Heyden, S., Beheregaray, L.B.,** 2019. Thermal selection as a driver of marine ecological speciation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 286, 20182023.
- Utermann, C., Parrot, D., Breusing, C., Stuckas, H., Staufenberger, T., Blumel, M., Labes, A., Tasdemir, D.,** 2018. Combined genotyping, microbial diversity and metabolite profiling studies on farmed *Mytilus* spp. from Kiel Fjord. *Scientific Reports*. 8, 7983.
- Väinölä, R., Hvilson, M.M.,** 1991. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae: Mollusca). *Biological Journal of the Linnean Society*. 43, 127-148.
- Väinölä, R., Strelkov, P.,** 2011. *Mytilus trossulus* in Northern Europe. *Marine Biology*. 158, 817-833.
- Vendrami, D.L.J., De Noia, M., Telesca, L., Brodte, E.M., Hoffman, J.I.,** 2020. Genome-wide insights into introgression and its consequences for genome-wide heterozygosity in the *Mytilus* species complex across Europe. *Evolutionary Applications*. 13, 2130-2142.
- Vera, M., Pardo, B.G., Pino-Querido, A., Álvarez-Dios, J.A., Fuentes, J., Martínez, P.,** 2010. Characterization of single-nucleotide polymorphism markers in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture Research*. 41, e568-e575.
- Vermeij, G.J.,** 1991. Anatomy of an invasion: the trans-Arctic interchange. *Paleobiology*. 17, 281-307.
- Vermeij, G.J.,** 1992. Trans-equatorial Connections Between biotas in the temperate eastern Atlantic. *Marine Biology*. 112, 343-348.

- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A.,** 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol* 34:275–305.
- Waters, J.M.,** 2008. Driven by the West Wind Drift? A synthesis of southern temperate marine biogeography, with new directions for dispersalism. *Journal of Biogeography*. 35, 417-427.
- Wenne, R.,** 2018. Single nucleotide polymorphism markers with applications in aquaculture and assessment of its impact on natural populations. *Aquatic Living Resources*. 31, 2.
- Wenne, R., Bach, L., Zbawicka, M., Strand, J., McDonald, J.H.,** 2016. A first report on coexistence and hybridization of *Mytilus trossulus* and *M. edulis* mussels in Greenland. *Polar Biology*. 39, 343-355.
- Wenne, R., Prądzińska, A., Poćwierz-Kotus, A., Larraín, M.A., Araneda, C., Zbawicka, M.,** 2022a. Provenance of *Mytilus* food products in Europe using SNP genetic markers. *Aquaculture*. 554, 738135.
- Wenne, R., Zbawicka, M., Bach, L., Strelkov, P., Gantsevich, M., Kuklinski, P., Kijewski, T., McDonald, J.H., Sundsaasen, K.K., Arnyasi, M., Lien, S., Kaasik, A., Herkul, K., Kotta, J.,** 2020. Trans-Atlantic Distribution and Introgression as Inferred from Single Nucleotide Polymorphism: Mussels *Mytilus* and Environmental Factors. *Genes*. 11, 530.
- 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., Sundsaasen, K.K., Árnýasi M., Kent M.P.,** 2022b. Molecular genetic differentiation of native populations of Mediterranean blue mussels, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819), and the relationship with environmental variables. *The European Zoological Journal*. 89, 755-784.
- Westerbom, M., Kilpi M., Mustonen O.,** 2002. Blue mussels, *Mytilus edulis*, at the edge of the range: Population structure, growth and biomass along a

salinity gradient in the northeastern Baltic Sea. *Marine Biology*. 140, 991-999.

- Williams, L.M., Ma, X., Boyko, A.R., Bustamante, C.D., Oleksiak, M.F.,** 2010. SNP identification, verification, and utility for population genetics in a non-model genus. *BMC Genetics*, 11, 32.
- Wilkins, N.P., Fujino, K., Gosling, E.M.,** 1983. The mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Japan. *Biological Journal of the Linnean Society*. 20, 365-374.
- Zardi, G.I., McQuaid, C.D., Jacinto, R., Lourenco, C.R., Serrao, E.A., Nicastro, K.R.,** 2018. Re-assessing the origins of the invasive mussel *Mytilus galloprovincialis* in southern Africa. *Marine and Freshwater Research*. 69, 607-613.
- Zardi, G.I., McQuaid, C.D., Teske, P.R., Barker, N.P.,** 2007. Unexpected genetic structure of mussel populations in South Africa: indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*. 337, 135-144.
- Zbawicka, M., Burzynski, A., Skibinski, D., Wenne, R.,** 2010. Scottish *Mytilus trossulus* mussels retain ancestral mitochondrial DNA: complete sequences of male and female mtDNA genomes. *Gene*. 456, 45-53.
- Zbawicka, M., Drywa, A., Śmietanka, B., Wenne, R.,** 2012. Identification and validation of novel SNP markers in European populations of marine *Mytilus* mussels. *Marine Biology*. 159, 1347–1362.
- Zbawicka, M., Gardner, J.P.A., Wenne, R.,** 2019. Cryptic diversity in smooth-shelled mussels on Southern Ocean islands: connectivity, hybridisation and a marine invasion. *Frontiers in Zoology*. 16, 32.
- Zbawicka, M., Sanko, T., Strand, J., Wenne, R.,** 2014. New SNP markers reveal largely concordant clinal variation across the hybrid zone between *Mytilus* spp. in the Baltic Sea. *Aquatic Biology*. 21, 25-36.

**Zbawicka, M., Trucco, M.I., Wenne, R., 2018.** Single nucleotide polymorphisms in native South American Atlantic coast populations of smooth shelled mussels: hybridization with invasive European *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics, Selection, Evolution*. 50, 5.

**Zbawicka, M., Wenne, R., Dias, P.J., Gardner, J.P.A., 2022.** Combined threats to native smooth-shelled mussels (genus *Mytilus*) in Australia: bioinvasions and hybridization. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 194, 1194-1211.



## Spis rysunków:

- Rysunek 1.** Muszle omułek z rodzaju *Mytilus*: *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758; *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819; *Mytilus trossulus* Gould, 1850 (źródło: marinespecies.org). ..... 19
- Rysunek 2.** Budowa wewnętrzna omułka (źródło: Eggermont i in., 2020). ..... 20
- Rysunek 3.** Cykl produkcyjny *Mytilus galloprovincialis* (fao.org). ..... 25
- Rysunek 4.** Mapa rozmieszczenia w Oceanie Światowym omułek z kompleksu *Mytilus edulis* spp. (Gaitán-Espitia i in., 2016). ..... 27
- Rysunek 5.** Mapa rozmieszczenia rodzaju *Mytilus* w Północnym Atlantyku. *M. edulis* zaznaczony jest kolorem czerwonym (forma amerykańska), żółtym (forma zachodnioeuropejska) i pomarańczowym (północnoeuropejski), *M. trossulus* kolorem niebieskim (linia bałtycka jasnoniebieski), *M. galloprovincialis* kolorem czarnym (linia śródziemnomorska) i zielonym (linia atlantycka) (Źródło: Wenne i in., 2020). ..... 28
- Rysunek 6.** Lokalizacje 44 prób *Mytilus* z Morza Śródziemnego oraz Oceanu Atlantyckiego (Google Earth Pro) z wyjątkiem próby KKA (z kanadyjskiego wybrzeża Atlantyku). Nazwy prób oraz ich współrzędne geograficzne przedstawiono w Tabeli 1. .... 36
- Rysunek 7.** Wykrywanie loci odstających różnicujących 45 prób. Rozkład wartości  $F_{ST}$  jako funkcja heterozygotyczności w neutralnym modelu dla 53 analizowanych SNP. SNP, które miały wartość  $F_{ST}$  powyżej wartości 0,95 lub poniżej 0,05 (górne i dolne ciągłe linie) były identyfikowane jako loci odstające. .... 46
- Rysunek 8.** Wykrywanie loci odstających różnicujących 44 próby (wyłączając z analizy *M. trossulus*). Rozkład wartości  $F_{ST}$  jako funkcja heterozygotyczności w neutralnym modelu dla 53 analizowanych SNP. .... 47
- Rysunek 9.** Wykrywanie loci odstających różnicujących 35 prób *M. galloprovincialis*. Rozkład wartości  $F_{ST}$  jako funkcja heterozygotyczności w neutralnym modelu dla 53 analizowanych SNP. .... 47
- Rysunek 10.** Drzewo zależności genetycznej NJ dla 45 prób z rodzaju *Mytilus* skonstruowane na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości) (Tabela 9). Wartości poparcia bootstrap są wyświetlane w procentach. .... 55
- Rysunek 11.** Drzewo zależności genetycznej NJ dla 35 prób *M. galloprovincialis* (wyłączając z analizy *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego, *M. edulis* i *M. trossulus*) skonstruowane na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości). Wartości poparcia *bootstrap* są wyświetlane w procentach. .... 56
- Rysunek 12.** Analiza korespondencji (CA) obliczona na podstawie danych (Axis 1 i Axis 2) SNP dla 34 prób *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i Oceanu Atlantyckiego oraz prób referencyjnych *M. galloprovincialis* z Morza Czarnego i wybrzeża Oceanu Atlantyckiego oraz prób referencyjnych *M. edulis* z wybrzeża Oceanu Atlantyckiego. Próbkę z Maroka (AGA – Ocean Atlantycki) i Algierii (ORA1 i ORA4 –

Morze Śródziemne) są pokazane jako czerwone wypełnione trójkąty, próbki z Morza Czarnego i Morza Azowskiego (AZO, BLS, SBRB i MOM) oznaczono granatowymi trójkątami. MSMA, LOI, CHA są próbkami referencyjnymi (jasnoniebieskie wypełnione trójkąty). Każdy punkt lub trójkąt jest jedną badaną próbą. .... 57

**Rysunek 13.** Analiza korespondencji (CA) obliczona na podstawie danych SNP dla 34 prób *M. galloprovincialis* z południowej Europy (Morza Śródziemnego, Morza Czarnego i Oceanu Atlantyckiego) oraz 7 próbek referencyjnych. próbki z Maroko i Algerii oznaczone są czerwonymi trójkątami, próbki z regionu Morza Egejskiego (EGE, HER, SAR, TES, TURK) są pokazane jako czerwone niewypełnione trójkąty, próbki z Morza Czarnego i Morza Azowskiego (BLS, SBRB i MOM) oznaczono granatowymi trójkątami. LID i ORI (niebieskie wypełnione kropki), AZO (granatowy niewypełniony trójkąt) oraz BID, CAM, CAS i VIG (granatowe wypełnione trójkąty) są próbkami referencyjnymi. Każda kropka lub trójkąt to jedna z badanych prób. .... 58

**Rysunek 14.** Analiza korespondencji (CA) obliczona na podstawie danych SNP dla 31 prób *M. galloprovincialis* z Morza Śródziemnego i Morza Egejskiego (EGE, HER, SAR, TES, TURK), Morza Czarnego i Morza Azowskiego (BLS, SBRB i MOM) oraz 3 prób referencyjnych: LID, ORI (niebieskie wypełnione kropki), AZO (granatowy niewypełniony trójkąt). Każda kropka lub trójkąt to jedna z badanych prób. .... 59

**Rysunek 15.** Wykres strukturalny dla 45 badanych prób ( $K = 4$ ). Każdy osobnik jest reprezentowany przez pojedynczą pionową linię podzieloną na cztery kolorowe segmenty, o długościach proporcjonalnych do każdego z  $K$  wywnioskowanych klastrow. Skrótów badanych prób podano w tabeli 1. Pionowe białe linie oddzielają populacje. Obecność *M. trossulus* w badanym rejonie wykluczono. .... 60

**Rysunek 16.** Lokalizacje 6 prób *Mytilus* z Południowego Atlantyku oraz Oceanu Indyjskiego (Google Earth Pro). Nazwy prób oraz ich współrzędne geograficzne przedstawiono w Tabeli 4. .... 61

**Rysunek 17.** Drzewo zależności genetycznej NJ dla 6 prób z Afryki Południowej i 11 prób referencyjnych z rodzaju *Mytilus* stworzono na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości). Wartości poparcia bootstrap są wyświetlane w procentach. .... 72

**Rysunek 18.** Drzewo zależności genetycznej NJ dla 6 prób z Afryki Południowej i 3 prób referencyjnych *M. galloprovincialis* stworzono na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości). Wartości poparcia bootstrap są wyświetlane w procentach. .... 73

**Rysunek 19.** Analiza korespondencji (CA) dla 12 prób *Mytilus* (6 prób badanych oraz 6 prób referencyjnych *M. galloprovincialis* oraz *M. planulatus*). Każdy z punktów reprezentuje jedną z badanych grup; próby referencyjne oznaczono zielonymi i szarymi punktami. CA wykazało, że osie 1 i 2 wyjaśniają odpowiednio 71,22% i 15,38% całkowitej zmienności genetycznej. .... 74

**Rysunek 20.** Analiza korespondencji (CA) dla 9 prób *Mytilus* (6 prób badanych i 3 prób referencyjnych *M. galloprovincialis* z Oceanu Atlantyckiego). Każdy z punktów reprezentuje jedną z badanych grup; próby referencyjne oznaczono kolorem zielonym. CA wykazało, że osie 1 i 2 wyjaśniają odpowiednio 25,42% i 19,45% całkowitej zmienności genetycznej. .... 74

- Rysunek 21.** Analiza struktury  $K=4$  dla 17 prób *Mytilus*. Każdy osobnik jest reprezentowany przez pojedynczą pionową linię podzieloną na trzy kolorowe segmenty, o długościach proporcjonalnych do każdego z  $K$  wynioskowanych klastrow. Skrótów badanych populacji podano w Tabeli 4. Pionowe białe linie oddzielają analizowane próby. .... 75
- Rysunek 22.** Analiza struktury  $K=2$  dla 11 prób *M. galloprovincialis*. Każdy osobnik jest reprezentowany przez pojedynczą pionową linię podzieloną na dwa kolorowe segmenty, o długościach proporcjonalnych do każdego z  $K$  wynioskowanych klastrow. Skrótów badanych populacji podano w tabeli 4. Pionowe białe linie oddzielają analizowane próby. .... 76
- Rysunek 23.** Drzewo zależności genetycznej NJ. Drzewko dla 21 prób i 5 prób referencyjnych z rodzaju *Mytilus* stworzono na podstawie danych  $F_{ST}$  (macierzy odległości). Wartości poparcia bootstrap są wyświetlane w procentach. Próbkę referencyjną taksonów zaznaczono pogrubioną czcionką (Wenne i in., 2022a). .... 81
- Rysunek 24.** Analiza korespondencji (CA) dla 21 prób *Mytilus*. Każdy kwadrat lub trójkąt reprezentuje jedną z badanych grup; próby referencyjne oznaczono kolorowymi trójkątami. CA wykazało, że osie 1 i 2 wyjaśniają odpowiednio 61,60% i 22,40% całkowitej zmienności genetycznej. .... 82
- Rysunek 25.** Analiza struktury  $K=3$  dla 25 prób, z wyłączeniem próby PZC. Każdy osobnik jest reprezentowany przez pojedynczą pionową linię podzieloną na trzy kolorowe segmenty o długościach proporcjonalnych do każdego z  $K$  wynioskowanych klastrow. Skrótów badanych prób podano w Tabeli 7. Pionowe białe linie oddzielają analizowane próby. .... 82
- Rysunek 26.** Lokalizacje analizowanych prób *Mytilus* z Morza Śródziemnego oraz Oceanu Atlantyckiego (Google Earth Pro) z wyjątkiem lokalizacji SBR, PZC, ESC, PZA, PZF, PZI, PZL, PZS. Próby referencyjne (LET, LGF, LID, PNV) oznaczono na żółto, próby z właściwymi informacjami na etykietach oznaczono kolorem zielonym, próby z niezgodnościami dotyczącymi gatunku, lokalizacji lub miejsca sprzedaży oznaczono kolorem czerwonym. .... 89

## Spis tabel:

- Tabela 1.** Lista prób *Mytilus*, liczby badanych osobników (No.) oraz współrzędne miejsc poboru prób. .... 37
- Tabela 2.** Właściwości i zmienność genetyczna 53 SNP dla 44 populacji z *Mytilus*. Nie uwzględniono próby *M. trossulus* (KKA). No. – liczba prób dla których locus było polimorficzne.  $F_{ST}$  – współczynnik zróżnicowania genetycznego, wartość  $P < 0.05$  po poprawkach Benjamini–Yekutieli (B-Y) zaznaczono pogrubioną czcionką;  $H_O$  – heterozygotyczność obserwowana;  $F_{IS}$  – współczynnik inbredu; MAF – frekwencja rzadszego allele. Wartości  $F_{ST}$  istotne statystycznie przy  $p < 0,05$  oznaczono pogrubioną czcionką. .... 41
- Tabela 3.** Parametry genetyczne dla 45 prób *Mytilus*: % loci polimorficznych ( $P_O$ ), heterozygotyczność obserwowana i spodziewana ( $H_O$  i  $H_E$ ), liczba loci odstających od równowagi HWE,  $P < 0.01$  ( $P$ ), współczynnik inbredu ( $F_{IS}$ ). .... 49
- Tabela 4.** Lista prób *Mytilus*, liczby badanych osobników (No.) oraz współrzędne poboru prób. Próby referencyjne oznaczono pogrubioną czcionką. .... 62
- Tabela 5.** Właściwości 55 loci SNP, lokalizacja genomu, typ podstawienia, wariant alleliczny, numer dostępu GenBank i wspierające odniesienie. .... 65
- Tabela 6.** Parametry genetyczne dla 17 badanych prób *Mytilus*: % loci polimorficznych ( $P_O$ ), heterozygotyczność obserwowana i spodziewana ( $H_O$  i  $H_E$ ), średnia różnorodności genów ( $Av.$ ), liczba różnic w parach w populacji ( $NP.$ ), liczba loci odstających od równowagi HWE,  $P < 0.01$  ( $P$ ). Próby referencyjne jak w Tabeli 4. .... 70
- Tabela 7.** Lista 21 prób żywnościowych i 5 referencyjnych *Mytilus*, liczby badanych osobników (No.), informacje dotyczące miejsc zakupów, poboru prób, kraju pochodzenia. .... 78
- Tabela 8.** Właściwości 54 loci SNP, lokalizacja genomu, typ podstawienia, wariant alleliczny, numer dostępu GenBank i wspierające odniesienie. .... 85
- Tabela 9.** Przynależność taksonomiczna próbek żywnościowych *Mytilus*. Kompleksowe wyniki analizy struktury dla  $K=3$  obliczonej dla 21 populacji prób żywnościowych i 4 prób referencyjnych (wykluczając z analizy próbę PZC). Liczby odpowiadają liczbie osobników przypisanych do każdego gatunku z największym prawdopodobieństwem, a wartości procentowe wskazują na udział osobników bez mieszanej puli genowej oraz udział mieszańców w danej próbce. Próby referencyjne oznaczono pogrubioną czcionką. .... 90
- Tabela 10.** Zestawienie danych z etykiet prób żywnościowych i prób referencyjnych z wynikami uzyskanymi w analizie genetycznej. Próby referencyjne oznaczono \*. Różnice między danymi na etykietach a wynikami zaznaczono pogrubioną czcionką. 93
- Tabela 11.** Wartość  $F_{ST}$  między parami 45 populacji. Pogrubione wartości są statystycznie istotne przy zakładanym poziomie istotności  $P < 0,05$ . .... 134

**Załącznik:**

**Tabela 11.** Wartość  $F_{ST}$  między parami 45 próbami. Pogrubione wartości są statystycznie istotne przy zakładanym poziomie istotności  $P < 0,05$ .





