

Prof. dr hab. Roman Wenne
Instytut Oceanologii PAN
Ul. Powstańców Warszawy 55
Sopot

21.08.2020

Recenzja opracowana na prośbę Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne
Uniwersytetu Gdańskiego, Pani prof. dr hab. Joanny Skórko-Glonek.

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Lidii Agnieszki Sworobowicz
pt. "Phylogeography of water louse *Asellus aquaticus* (L.) (Crustacea: Isopoda) in Europe"

Oceniana praca doktorska została przygotowana pod opieką promotora dr hab. Anny Wysockiej w Katedrze Genetyki i Biosystematyki Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Praca została napisana w języku angielskim. Składa się ze strony tytułowej, podziękowań, spisu treści, streszczenia z krótkim podsumowaniem, bibliografii, załączonych 2 prac wchodzących w skład cyklu publikacji oraz oświadczeń mgr Lidii Sworobowicz i współautorów dotyczących ich wkładu w poszczególne publikacje. Streszczenie („Summary”) ma charakter wprowadzenia do części głównej tworzonej przez zbiór 2 opublikowanych artykułów. Streszczenie zawiera przedstawienie problemu badawczego, który doktorantka postanowiła rozwiązać, omówienie wybranego gatunku modelowego oraz prezentację własnych wyników na tle dotychczasowej wiedzy. W ocenianej pracy doktorskiej nie zamieszczono streszczenia w języku polskim.

Badania geologiczne i paleontologiczne umożliwiają poznanie historii obecnego ukształtowania lądów i zmian zasięgów zbiorników wodnych morskich i słodkowodnych. Dla znacznej części organizmów nie zachowały się skamieniałości lub odciski ze względu na brak pancerzy lub szkieletów wapiennych. Poznanie historii i ewolucji takich gatunków jest możliwe poprzez badania zróżnicowania genetycznego współcześnie żyjących populacji. Zarówno wyniki takich badań, jak i badań paleontologicznych wielu gatunków zwierząt i roślin przyczyniają się do zrozumienia ewolucji ekosystemów w zależności od zmian geologicznych i klimatycznych. Autorka pracy skoncentrowała swoją uwagę na gatunku skorupiaków *Asellus aquaticus* zasiedlającym wody słodkie, podziemne i słonawe, charakteryzującym się szerokim rozprzestrzenieniem na półkuli północnej. Wg. literatury protoplasta tego gatunku zasiedlił rejony obecnej Europy migrując z Azji przez Morze

Paratethys w Miocenie (12-8 mln lat) oraz później z przeciwnej strony z jeziora Panońskiego, które znajdowało się na wschód od Alp. Następnie, odizolowane populacje ulegały dywergencji tworząc nowe taksony o zróżnicowanym mitochondrialnym DNA. Pomimo tego, że ich badaniami filogeograficznymi zajmowało się kilku autorów zagranicznych, doktorantka objęła swoimi badaniami największy obszar Europy w porównaniu z wcześniejszymi pracami. Autorka wskazuje, że gatunek ten jest gatunkiem modelowym w badaniach filogeograficznych i może się stać modelowym w badaniach ewolucyjnych, genetycznych i genomowych.

W „Summary” autorka omówiła i zsyntetyzowała wyniki badań przedstawione w dwóch publikacjach tworzących zestaw monotematyczny. Do badań użyto 700 osobników pobranych lub dla których autorka znalazła sekwencje genu oksydazy cytochromowej I (*COI*) w bazach danych. Osobniki te pochodziły z 250 miejsc, co oznacza, że średnio 2,8 osobnika reprezentowało jedno miejsce poboru prób. Tak małe próby nie są zwykle wystarczające do przeprowadzenia badań w zakresie genetyki populacyjnej. Można natomiast je grupować i analizować jako próby łączone. Dlatego zawarte w Streszczeniu na stronie 10. stwierdzenie o generalnym braku przestrzennej struktury genetycznej populacji nie wydaje się wynikać z przeprowadzonych typowych analiz populacyjnych, ale głównie z oceny podobieństwa haplotypów oraz analizy tworzonych grup osobników z większej liczby miejsc ich poboru. Nie jest to jednak zarzut, a jedynie potwierdzenie prawidłowego sformułowania tytułu pracy doktorskiej. Podzielam pogląd autorki przedstawiony na stronie 11. że gen *COI* mitochondrialnego DNA został uznany za bardzo dobry marker do identyfikacji taksonów, jednak gatunki muszą się różnić również na poziomie DNA jądrowego. Dlatego ważne są wyniki badań innych typowych markerów taksonomicznych takich jak *ITS* czy *rDNA* umożliwiające identyfikację części polimorfizmu DNA jądrowego. Są to jednak markery nieodpowiednie do badań zróżnicowania populacji. W ostatnim dziesięcioleciu najlepszymi markerami do badań różnic między populacjami stał się polimorfizm pojedynczych nukleotydów w mniej konserwatywnych rejonach genomu. Streszczenie zawiera szerszą tematykę niż dwie publikacje dotyczące implikacji uzyskanych wyników dla taksonomii i filogeografii *Asellus*.

Obydwa załączone artykuły składające się na zestaw zostały opublikowane w uznanym międzynarodowym czasopiśmie „Freshwater Biology” (w latach poprzedzających rok publikacji: IF = 3,05 w 2014 oraz IF = 3.84 w 2019) będącego w 1. kwartylu „Marine & Freshwater Biology” oraz „Aquatic Science” w Journal Citation Reports oraz mającego 45 i 100 punktów za okres publikacji na liście czasopism MNiSW). Doktorantka jest pierwszą

autorką obydwu artykułów. Uczestniczyła w opracowaniu koncepcji badań, wykonała istotną część prac terenowych i laboratoryjnych, które umożliwiły uzyskanie wartościowych wyników badań, opracowała wyniki sekwencjonowania DNA, sformatowała zestaw danych do analiz bioinformatycznych i uczestniczyła w ich wykonaniu, przygotowała rysunki i tabele, zdeponowała sekwencje w GenBank i miała dominujący udział w przygotowaniu obydwu publikacji.

Pierwsza publikacja wchodząca w skład pracy doktorskiej jest zatytułowana “Revisiting the phylogeography of *Asellus aquaticus* in Europe: insights into cryptic diversity and spatiotemporal diversification” z roku 2015 (60: 1824-1840). Celem badań przedstawionych w publikacji była identyfikacja gatunków bliźniaczych *A. aquaticus*, rozpoznanie ich rozmieszczenia w Europie, określenie zależności filogenetycznych oraz pochodzenia. Do badań filogeograficznych użyto sekwencji *COI* i *28S rDNA* z 236 i 24 odpowiednio dla osobników pobranych z wód słodkich w Europie. Wybrano rejony, z których albo nie badano w ogóle albo badano b. mało osobników w pracach innych autorów, tzn. północne, wschodnie i centralne rejony Europy. Uzyskany zestaw danych połączono z sekwencjami opublikowanymi przez innych autorów. Ten rozszerzony zestaw haplotypów poddano analizie zaawansowanymi metodami analiz bioinformatycznych w tym, Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC), Bayesian Poisson tree processes (bPTP), analiza sieci i in. Liczba zidentyfikowanych operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTUs) *Asellus* zależała od przyjętej metody analizy haplotypów. Autorzy założyli, że liczba 13 jednostek wskazanych metodą ABGD jest bliższa rzeczywistości niż 89 jednostek wskazanych przez GMYC oraz bPTP. Z tych 13 jednostek grupa haplotypów A ma najszerszy zasięg w Europie, podczas gdy pozostałe 12 było ograniczone do południowej Europy. Analiza sieciowa haplotypów była zgodna z wynikami ABGD. Rozmieszczenie głównych grup haplotypów wykazywało zależności geograficzne. Różnorodność genetyczna ośliczki zmniejszała się w kierunku północnym w Europie. Okres dywergencji głównych odgałęzień drzewa filogenetycznego oszacowano na 8 do 6 mln lat. Użycie markera jądrowego 28S rDNA było ważnym rozszerzeniem badań przeprowadzonych z zastosowaniem markera mitochondrialnego i wykazało istotne niezgodności między zależnościami zidentyfikowanymi tymi metodami. Uzyskane wyniki przedyskutowano w kontekście znaczenia dla taksonomii i identyfikacji podgatunków *Asellus aquaticus* i filogeografii. Liczba wykrytych operacyjnych (hipotetycznych) jednostek taksonomicznych dla mtDNA była znacznie wyższa niż dla DNA jądrowego. Obecne rozmieszczenie

geograficzne haplotypów jest związane ze zmianami zasięgów lodowców, refugiami i wtórnymi kolonizacjami. Populacje, które skolonizowały rejony zwolnione przez lodowce charakteryzują się niższym polimorfizmem niż populacje w rejonach refugialnych. Oprócz czynników historycznych, które uwarunkowały współczesne rozmieszczenie podgatunków i haplotypów *Assellus aquaticus*, w publikacji są również rozważane czynniki antropogeniczne lub naturalne, jak np. przypadkowy transport przez ptaki i ssaki w celu wyjaśnienia obecności podgatunku A (przypuszczalnie *A. a. aquaticus*) w niektórych rejonach południowych oddzielonych górami lub na Wyspach Brytyjskich. Ogólnie oceniając publikacja charakteryzuje się nie tylko wysoką wartością poznawczą uzyskanych wyników badań, ale również zaawansowaną i różnorodną metodologią przeprowadzonej analizy bioinformatycznej uzyskanych wyników.

Druga publikacja jest zatytułowana “ Lasting through the ice age: The role of the proglacial refugia in the maintenance of genetic diversity, population growth, and high dispersal rate in a widespread freshwater crustacean” z 2020 (65: 1028-1046). Celem badań było określenie różnorodności genetycznej *A. a. aquaticus* z uwzględnieniem zróżnicowania geograficznego populacji w rejonach polodowcowych, demografii i sposobów ekspansji. W pracy zweryfikowano hipotezy o zmniejszeniu liczebności *A. a. aquaticus* podczas ostatniego maksimum zlodowacenia (LGM) i wycofaniu się do refugium w rejonach peryglacialnych, z których następnie zasiedlił rejony zwolnione po cofnięciu się lodowca. Rejony peryglacialne znajdowały się zwykle na północ od rejonów określanych jako śródziemnomorskie. Do badań pobrano próby ze 165 miejsc w rejonach peryglacialnych i proglacialnych oraz z rejonów wcześniej pokrytych lodowcem. Do badań zastosowano dwa markery molekularne: mitochondrialny gen oksydazy cytochromowej I (*COI*) oraz niekodujący fragment DNA jądrowego, którym była wewnętrzna sekwencja transkrybowana (*ITS2*). Po sprawdzeniu jakości uzyskanych sekwencji utworzono zestaw danych z dołączonymi sekwencjami opublikowanymi przez innych autorów oraz z pierwszej publikacji i pochodzącymi z NCBI. Sekwencje obydwu fragmentów DNA uzyskano dla 280 osobników, jednak badania dla poszczególnych markerów obejmowały wyższe liczby osobników pochodzących z dużej ilości miejsc poboru prób. Liczba badanych osobników z poszczególnych miejsc poboru nie przekraczała kilka, dlatego do zbadania geograficznej struktury populacji próby grupowano biorąc pod uwagę strefy klimatyczne z okresu LGM, tj. głównie rejon proglacialny, peryglacialny i regiony ekologiczne Unii Europejskiej z podziałem na części dodatkowe zależnie od długości geograficznej. Analiza polimorfizmu sekwencji *ITS2* nie wykazała

struktury geograficznej *A. a. aquaticus* w przeciwieństwie do *COI*, która umożliwiła identyfikację 11. klastrow. Zidentyfikowano dwie główne grupy klastrow: jedna (klastry 1-4) w rejonie proglacjalnym i panońskim, a druga grupa (5-11) w rejonie peryglacjalnym. Najszerszy zasięg geograficzny miały klastry drugi i trzeci. Inne klastry występowały bardziej lokalnie. Stwierdzono, że różnorodność genetyczna w rejonie peryglacjalnym była większa niż w proglacjalnym. Analiza sieciowa wykazała, że proglacjalny klastrow jest utworzony przez haplotypy o słabej dywergencji. Peryglacjalne haplotypy charakteryzowały się znacznie większym stopniem dywergencji. *A. a. aquaticus* jako taxon wyodrębnił się ok. 1,5 mln lat temu, natomiast klady jego haplotypów powstały w środkowym i późnym plejstocenie. Na większości rejonów postglacjalnej Europy nie stwierdzono obecności struktury genetycznej. Ograniczenia w przepływie migrantów stwierdzono między niektórymi ekoregionami, szczególnie między nizinami węgierskimi, prowincją pontyjską i równinami południowo-wschodnimi. Proglacjalna grupa przypuszczalnie uległa szybkiemu wzrostowi liczebności populacji. W przeciwieństwie do tego, wielkość populacji peryglacjalnej grupy haplotypów była niestabilna.

Wykazano, że wbrew uznanym poglądom o rozprzestrzenianiu się gatunków z refugium z rejonu Morza Śródziemnego na obszary zwolnione przez lodowiec po LGM, w rzeczywistości *A. a. aquaticus* rozprzestrzenił się z wielu różnych refugium, które znajdowały się w strefach peryglacjalnej i proglacjalnej. W publikacji postuluje się, że siedliska proglacjalne nie powinny być uznawane za lodowe pustynie nie zamieszkałe przez różne organizmy, w tym zwierzęta.

Uwaga drobna: Autorka nie cytowała pełnej literatury przedmiotu, co można było zrobić w Summary, (np. Novaković i in. 2015. Recent Distribution of the Freshwater Crustacean *Asellus Aquaticus* (Linnaeus, 1758) (Isopoda; Crustacea) in Serbia (2007-2013 Period). Water Research and Management, 5: 43-46). Najnowsza literatura, która ukazała się przypuszczalnie po napisaniu pracy doktorskiej (np. Gross i in. 2020. Developmental Transcriptomic Analysis of the Cave-Dwelling Crustacean, *Asellus aquaticus*. Genes , 11, 42; Mojaddidi i in. 2018. Embryonic origin and genetic basis of cave associated phenotypes in the isopod crustacean *Asellus aquaticus*. Scientific Reports, 8, 16589; Perez-Moreno i in. 2018. Transcriptomic Insights into the Loss of Vision in Molnar Janos Cave's Crustaceans. Integrative and Comparative Biology, 58: 452–464) potwierdza przypuszczenie Autorki, o użyteczności *A. aquaticus* do dalszych kierunków badań, takich jak genomika i genetyka.

Mgr. Lidia Sworobowicz jest pierwszym autorem obydwu publikacji. W pierwszej publikacji ma sześciu współautorów a w drugiej trzech. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami jej udział w powstaniu tych publikacji wynosi odpowiednio 60% i 80%. Obydwa artykuły reprezentują jednolitą tematykę. Publikacja druga jest logicznym rozszerzeniem publikacji pierwszej. Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie różnorodnych metod bioinformatycznej analizy uzyskanych danych molekularnych. Opublikowane wyniki są nowatorskie w zestawieniu z obecną wiedzą. Praca doktorska mgr. Lidii A. Sworobowicz znacznie rozszerza dotychczasową wiedzę o prze- i po-glacialnej historii populacji skorupiaków na przykładzie ośliczek *Asellus*.

Podsumowanie:

Ogólnie oceniając, praca doktorska Pani mgr. Lidii A. Sworobowicz jest napisana w sposób przejrzysty. Poszczególne części pracy są ze sobą logicznie powiązane. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Kandydatka wykazała w niej ogólną wiedzę teoretyczną w swojej dyscyplinie naukowej oraz potwierdziła umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Praca wnosi wkład do aktualnej wiedzy naukowej i świadczy o dojrzałości kandydatki, jako naukowca. Biorąc pod uwagę dane bibliometryczne, wg. danych w SCOPUS na dzień 3.08.2020 jest współautorką czterech publikacji, ma indeks $H = 3$ oraz 62 cytaty swoich publikacji, co jest dobrym wynikiem dla kandydata do stopnia doktora.

Oceniana praca spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i dlatego przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Lidii A. Sworobowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wanna Roman