

AUTOREFERAT

dr Monika Mioduchowska

Katedra Genetyki Ewolucyjnej i Biosystematyki
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 2023

Autoreferat

1. Imię i nazwisko: **Monika Mioduchowska**
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

07.07.2009: Dyplom magistra biologii, specjalność – Biologia Molekularna, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Tytuł pracy magisterskiej: „Zróżnicowanie genetyczne halibuta grenlandzkiego (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum,1792)) z zachodniego rejonu Morza Barentsa”; promotor: dr Barbara Wojtasik.

09.12.2016: Stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych w zakresie biologii uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Struktura genetyczna ginącego gatunku, skójki gruboskorupowej *Unio crassus* (Philipson, 1788), w rzekach Polski”; promotor: dr hab. Jerzy Sell, prof. UG.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

10.2014–02.2017: Asystent (pracownik naukowo–dydaktyczny) w Katedrze Genetyki i Biosystematyki, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (od 12.2014 do 05.2015 – urlop zdrowotny).

02.2017–obecnie: Adiunkt (pracownik badawczo–dydaktyczny) w Katedrze Genetyki Ewolucyjnej i Biosystematyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

08.2017–09.2018: Specjalista w Katedrze Genetyki i Biosystematyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

10.2018: Starszy specjalista w Katedrze Genetyki i Biosystematyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego.

- 10.2019–09.2021:** Staż podoktorski na stanowisku adiunkta naukowego (*post-doc*, etat badawczy) w Zakładzie Badań Planktonu Morskiego Instytutu Oceanografii na Wydziale Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego w ramach projektu OPUS (finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki) kierowanego przez dr hab. Agatę Weydmann-Zwolicką, prof. UG; tytuł projektu: „HIDEA – Hidden diversity of plankton in the European Arctic”; numer projektu: UMO-2017/27/B/NZ8/01056.
- 10.2021–06.2022:** Staż podoktorski na stanowisku adiunkta naukowego (*post-doc*, etat badawczy) w Katedrze Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w ramach projektu OPUS (finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki) kierowanego przez prof. dr hab. Magdalenę Błażewicz; tytuł projektu: „Biodiversity Patterns and Scale: the case of Peracarids Crustacea from south-eastern Australia BIOPASS”; numer projektu: UMO-2018/31/B/NZ8/03198.
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Molekularna identyfikacja (endo)symbiotycznych bakterii
związanych ze słodkowodnymi Bivalvia, Crustacea i Eutardigrada,
ze szczególnym uwzględnieniem bakterii z rodzaju *Wolbachia***

b) Wykaz autorskich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.

Na osiągnięcie naukowe składa się cykl siedmiu publikacji (prac oryginalnych) opublikowanych w latach 2018–2023 w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports.

Impact factor (IF) podano zgodnie z rokiem opublikowania pracy. Punkty Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) / Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) podano zgodnie z rokiem opublikowania pracy oraz według najnowszego wykazu czasopism naukowych (17 lipca 2023, <https://www.gov.pl/web/edukacja-i-nauka/komunikat-ministra-edukacji-i-nauki-z-dnia-17-lipca-2023-r-w-sprawie-wykazu-czasopism-naukowych-i-recenzowanych-materialow-z-konferencji-miedzynarodowych>). Liczbę cytowań podano według: Web of Science Core Collection, Scopus oraz Google Scholar. Natomiast kwartyle podano według Journal Citation Indicator (JCI) lub Journal Impact Factor (JIF) Category.

Oświadczenia współautorów wszystkich publikacji, wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, określające indywidualny wkład w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w Załączniku nr 5.

1) Mioduchowska M., Czyż M.J., Gołdyn B., Kur J., Sell J. 2018a. Instances of erroneous DNA barcoding of metazoan invertebrates: are universal *cox1* gene primers too “universal”? *PLoS ONE*, 13(6): e0199609, DOI: 10.1371/journal.pone.0199609; IF₂₀₁₈: 2,776; punkty MNiSW₂₀₁₈: 40; punkty MEiN₂₀₂₃: 140; liczba cytowań: wg Web of Science Core Collection: 31, wg Scopus: 39 wg Google Scholar: 58; kwartył (JCI Category): Q1.

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował:

- współudział w opracowaniu koncepcji badań;
- wykonanie wszystkich molekularnych prac laboratoryjnych;
- współudział w opracowaniu i interpretacji danych: analiza bioinformatyczna i wizualizacja graficzna otrzymanych wyników;
- przegląd i wybór literatury;
- napisanie większości tekstu jako autor główny i korespondujący.

2) Mioduchowska M., Czyż M.J., Gołdyn B., Kilikowska A., Namiotko T., Pinceel T., Łaciak M., Sell J. 2018b. Detection of bacterial endosymbionts in freshwater crustaceans: the applicability of non-degenerate primers to amplify the bacterial 16S rRNA gene. *PeerJ*, 6: e6039, DOI: 10.7717/peerj.6039; IF₂₀₁₈: 2,486; punkty MNiSW₂₀₁₈: 35; punkty MEiN₂₀₂₃:

100; liczba cytowań: wg Web of Science Core Collection: 10, wg Scopus: 13, wg Google Scholar: 17; kwartył (JCI Category): Q1.

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował:

- opracowanie koncepcji badań;
- wykonanie wszystkich molekularnych prac laboratoryjnych;
- współudział w opracowaniu i interpretacji danych: analiza bioinformatyczna i wizualizacja graficzna otrzymanych wyników;
- przegląd i wybór literatury;
- napisanie większości tekstu jako autor główny i korespondujący.

3) Mioduchowska M., Zając K., Zając T., Sell J. 2020a. *Wolbachia* and *Cardinium* infection found in threatened unionid species: a new concern for conservation of freshwater mussels? *Conservation Genetics*, 21: 381–386, DOI: 10.1007/s10592-020-01255-9; IF₂₀₂₀: 2,260; punkty MNiSW₂₀₂₀: 70; punkty MEiN₂₀₂₃: 70; liczba cytowań: wg Web of Science Core Collection: 6, wg Scopus: 6, wg Google Scholar: 9; kwartył (JCI Category): Q2.

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował:

- opracowanie koncepcji badań;
- wykonanie wszystkich molekularnych prac laboratoryjnych;
- opracowanie i interpretacja danych: analiza bioinformatyczna i wizualizacja graficzna otrzymanych wyników;
- przegląd i wybór literatury;
- napisanie większości tekstu jako autor główny i korespondujący.

4) Mioduchowska M., Zając K., Bartoszek K., Madanecki P., Kur J., Zając T. 2020b. 16S rRNA-based metagenomic analysis of the gut microbial community associated with the DUI species *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(2): 615–623, DOI: 10.1111/JZS.12377; IF₂₀₂₀: 2,047; punkty MNiSW₂₀₂₀: 70; punkty MEiN₂₀₂₃: 70; liczba cytowań: wg Web of Science Core Collection: 6, wg Scopus: 8, wg Google Scholar: 10; kwartył (JCI Category): Q1.

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował:

- opracowanie koncepcji badań;
- wykonanie wszystkich molekularnych prac laboratoryjnych;
- współudział w opracowaniu i interpretacji danych: analiza bioinformatyczna i wizualizacja graficzna otrzymanych wyników;
- przegląd i wybór literatury;
- napisanie większości tekstu jako autor główny.

- 5) Kaczmarek Ł., Roszkowska M., Poprawa I., Janelt K., Kmita H., Gawlak M., Fiałkowska E., **Mioduchowska M.** 2020. Integrative description of bisexual *Paramacrobotus experimentalis* sp. nov. (Macrobotidae) from republic of Madagascar (Africa) with microbiome analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 145: 106730, DOI:10.1016/j.ympev.2019.106730; IF₂₀₂₀: 3,889; punkty MNiSW₂₀₂₀: 140; punkty MEiN₂₀₂₃: 140; liczba cytowań: wg Web of Science Core Collection: 16, wg Scopus, 22; wg Google Scholar: 34; kwartył (JCI Category): Q1.

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował:

- opracowanie koncepcji badań z zakresu analiz mikrobiomu Tardigrada;
- wykonanie wszystkich molekularnych prac laboratoryjnych z zakresu analiz mikrobiomu Tardigrada oraz molekularnej części taksonomii integratywnej opisanego w niniejszej pracy nowego dla nauki gatunku Tardigrada;
- opracowanie i interpretację danych z zakresu analiz mikrobiomu Tardigrada oraz molekularnej części taksonomii integratywnej: analiza bioinformatyczna i wizualizacja graficzna otrzymanych wyników;
- przegląd i wybór literatury z zakresu analiz mikrobiomu oraz taksonomii integratywnej;
- jako ostatni autor, byłam odpowiedzialna za wszystkie prace związane z mikrobiomem Tardigrada oraz molekularną część taksonomii integratywnej, tym samym wszystkie fragmenty manuskryptu dotyczące tych zagadnień, zostały napisane przeze mnie.

- 6) **Mioduchowska M.**, Nitkiewicz B., Roszkowska M., Kačarević U., Madanecki P., Pinceel T., Namiotko T., Gołdyn B., Kaczmarek Ł. 2021. Taxonomic classification of the bacterial endosymbiont *Wolbachia* based on next-generation sequencing: is there molecular evidence for its presence in tardigrades? *Genome*, 64(10): 951–958, DOI: 10.1139/gen-2020-0036;

IF₂₀₂₁: 2,449; punkty MEiN₂₀₂₁: 70; punkty MEiN₂₀₂₃: 70; liczba cytowań: wg Web of Science Core Collection: 5, wg Scopus: 5, wg Google Scholar: 8; kwartyl (JCI Category): Q3.

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował:

- opracowanie koncepcji badań;
- wykonanie wszystkich molekularnych prac laboratoryjnych;
- współudział w analizie bioinformatycznej – klasyfikacja otrzymanych ampliconów do operacyjnych jednostek taksonomicznych (ang. *Operational Taxonomic Units*, OTU);
- opracowanie i interpretacji danych: analiza filogenetyczna i wizualizacja graficzna otrzymanych wyników;
- przegląd i wybór literatury;
- jako główny autor i korespondencyjny napisałam większość tekstu manuskryptu.

7) **Mioduchowska M.**, Konecka E., Gołdyn B., Pinceel T., Brendonck L., Lukić D., Kaczmarek Ł., Namiotko T., Zając K., Zając T., Jastrzębski J.P., Bartoszek K. 2023. Playing peekaboo with a master manipulator: metagenetic detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* supergroups in freshwater invertebrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 9400, DOI: [org/10.3390/ijms24119400](https://doi.org/10.3390/ijms24119400); IF₂₀₂₃: 5,600; punkty MEiN₂₀₂₃: 140; kwartyl (JCI Category): Q1 (brak cytacji z uwagi na niedawne ukazanie się publikacji, tj. 28.05.2023).

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował:

- opracowanie koncepcji badań;
- wykonanie wszystkich molekularnych prac laboratoryjnych;
- współudział w opracowaniu i interpretacji danych: analiza bioinformatyczna i wizualizacja graficzna otrzymanych wyników;
- przegląd i wybór literatury;
- jako główny autor i korespondencyjny napisałam większość tekstu manuskryptu.

Podsumowując:

Sumaryczny IF: 21,507

Łączna liczba punktów MNiSW/MEiN: 565 (zgodnie z rokiem opublikowania); **730** (według najnowszego wykazu czasopism, 17 lipca 2023)

Liczba cytowań wg bazy Web of Science Core Collection: 74

Liczba cytowań wg bazy Scopus: 93

Liczba cytowań wg bazy Google Scholar: 136

Kwartył wg JCI lub JIF Category: Q1 – pięć publikacji, **Q2** – jedna publikacja, **Q3** – jedna publikacja

Źródła finansowania powyżej opisanych publikacji:

- **Publikacja 1:** współfinansowanie przeprowadzonych badań – środki własne;
- **Publikacja 2:** uzyskanie funduszy na przeprowadzone badania w ramach projektu, którego byłam kierownikiem w latach 2018-2019; tytuł projektu: „Zastosowanie zaprojektowanych starterów do metagenomowego sekwencjonowania genu kodującego 16S rRNA: nowe narzędzie do identyfikacji endosymbiotycznych bakterii u słodkowodnych skorupiaków (Crustacea: Branchiopoda)”; źródło finansowania: Uniwersytet Gdański, konkurs Młodzi Naukowcy; numer projektu: 538-L260-B149-18;
- **Publikacje 3 i 4:** uzyskanie funduszy na przeprowadzone badania molekularne w ramach projektu, którego byłam kierownikiem w latach 2018-2019; tytuł projektu: „Molekularna identyfikacja endosymbiotycznych gatunków bakterii u zagrożonego wyginięciem słodkowodnego małża *Unio crassus* (Philipsson 1788): analiza metagenomiczna”; źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki, konkurs Miniatura 1; numer projektu: 2017/01/X/NZ8/01873;
- **Publikacja 5:** współfinansowanie przeprowadzonych badań – środki własne;
- **Publikacja 6:** współfinansowanie przeprowadzonych badań – środki własne oraz realizacja pracy w ramach stażu podoktorskiego: „Coevolution of the endangered fairy shrimp *Branchipus schaefferi* (Branchiopoda, Anostraca) and intracellular endosymbiont *Wolbachia* bacteria”; źródło finansowania: European Molecular Biology Organization w ramach konkursu EMBO Short-Term Fellowship na przeprowadzenie badań w Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation, KU Leuven, Belgium; numer projektu: 7862; kierownik projektu (2019);

- **Publikacja 7:** współfinansowanie przeprowadzonych badań w ramach projektów: **i)** „Let’s dry up and survive together”: is anhydrobiosis in water bears (Tardigrades) modulated by a specific microbiome community and does it depend on bacteria that survive desiccation together with them?”; źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki, konkurs Sonata 17; numer projektu: 2021/43/D/NZ8/00344; kierownik projektu (od 2022 roku, projekt w trakcie realizacji); **ii)** „Wyschnij i przeżyj”: czy niezwykła zdolność niesporczaków (Tardigrada) do anhydrobiozy jest wynikiem obecności specyficznego mikrobiomu i infekcji endosymbiotycznymi bakteriami?”; źródło finansowania: Uniwersytet Gdański, konkurs UGrants-first w ramach Programu małych grantów; numer projektu: 1220/146/2021; kierownik projektu (2021); **iii)** „Coevolution of the endangered fairy shrimp *Branchipus schaefferi* (Branchiopoda, Anostraca) and intracellular endosymbiont *Wolbachia* bacteria”; źródło finansowania: European Molecular Biology Organization w ramach konkursu EMBO Short-Term Fellowship na przeprowadzenie badań w Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation, KU Leuven, Belgium; numer projektu: 7862; kierownik projektu (2019); **iv)** „Zastosowanie zaprojektowanych starterów do metagenomowego sekwencjonowania genu kodującego 16S rRNA: nowe narzędzie do identyfikacji endosymbiotycznych bakterii u słodkowodnych skorupiaków (Crustacea: Branchiopoda)”; źródło finansowania: Uniwersytet Gdański, konkurs Młodzi Naukowcy; numer projektu: 538-L260-B149-18; kierownik projektu (2018-2019); **v)** „Molekularna identyfikacja endosymbiotycznych gatunków bakterii u zagrożonego wyginięciem słodkowodnego małża *Unio crassus* (Philipsson, 1788): analiza metagenomiczna”; źródło finansowania: Narodowe Centrum Nauki, konkurs Miniatura 1; numer projektu: 2017/01/X/NZ8/01873; kierownik projektu (2018-2019).

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

We wstępie przedstawiono zarys problemu badawczego, powołując się na dane literaturowe z zakresu identyfikacji bakterii (endo)symbiotycznych u słodkowodnych Crustacea, Bivalvia i Eutardigrada, które były dostępne przed przystąpieniem do realizacji badań (do 2017 roku). W podsumowaniu otrzymanych wyników, zostały wskazane również prace, które pojawiły się podczas prowadzonych badań, dotyczące omawianego zakresu identyfikacji bakterii (endo)symbiotycznych u bezkręgowców słodkowodnych. Zastosowany termin „(endo)symbiont” dotyczy bakterii symbiotycznych, co do których nie ma pewności o występowaniu wewnątrzkomórkowym u swojego gospodarza, w przeciwieństwie do powszechnie opisywanych obligatoryjnych bakterii endosymbiotycznych, takich jak bakterie z rodzaju *Wolbachia* czy *Cardinium*. Dane bibliograficzne cytowanych prac zamieszczono w podrozdziale „Literatura”.

Osiągnięciem habilitacyjnym jest cykl siedmiu artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Tematem przewodnim cyklu jest molekularna identyfikacja bakterii (endo)symbiotycznych, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii z rodzaju *Wolbachia*, związanych z bezkręgowcami słodkowodnymi należącymi do trzech gromad w obrębie trzech typów: Crustacea (Arthropoda), Bivalvia (Mollusca) i Eutardigrada (Tardigrada).

Zarys problemu badawczego oraz cel naukowy badań.

Symbioza obejmuje zróżnicowane relacje między organizmami, począwszy od mutualizmu, poprzez komensalizm, a skończywszy na pasożytnictwie (Douglas, 1994). Analizując relacje symbiotyczne z szerszej perspektywy, stwierdzono, że rozwój organizmów eukariotycznych został zapoczątkowany w wyniku serialnej endosymbiozy. Ten rodzaj asocjacji symbiotycznej należy do symbiozy wewnątrzkomórkowej (Roger i in., 2017). Obecnie uznaje się, że wielokomórkowe organizmy eukariotyczne są gospodarzami w relacji symbiotycznej z licznymi mikroorganizmami, w tym archeonami Archea, bakteriami Bacteria, czy też grzybami Fungi (Oliver i Russell, 2016).

Symbiotyczne bakterie, zarówno obligatoryjne P-endosymbionty, jak i fakultatywne S-symbionty (Buchner, 1965), pełnią istotną funkcję w biologii swoich gospodarzy, a także wpływają na procesy mikroewolucyjne (Toft i Andersson, 2010; Douglas, 2014). U bezkręgowców lądowych zidentyfikowano, do tej pory, cały szereg bakterii symbiotycznych oraz opisano liczne obligatoryjne asocjacje gospodarz-bakteria (Chaston i Goodrich-Blair, 2010). Jedną z najbardziej rozpowszechnionych bakterii endosymbiontycznych identyfikowaną u bezkręgowców lądowych, a szczególnie u owadów Insecta, jest bakteria z rodzaju *Wolbachia* (należąca do typu α -Proteobacteria). W wyniku przeprowadzonych przez Hilgenboecker'a i in. (2008) metaanaliz, aż 66% wszystkich lądowych gatunków stawonogów Arthropoda, jest zainfekowanych tym endosymbiontem. Bakterie te są transmitowane do potomstwa wertykalnie (w cytoplazmie komórek jajowych zakażonych samic) i/lub horyzontalnie (wraz z pokarmem). Endosymbionty te odgrywają kluczową rolę w procesach ewolucyjnych, w kształtowaniu struktury płciowej oraz reprodukcji swoich gospodarzy (Funkhouser i Bordenstein, 2013). Tym samym efektem zakażenia gospodarza przez bakterie z rodzaju *Wolbachia* może być: i) niezgodność cytoplazmatyczna (ang. *cytoplasmic incompatibility*, CI), tj. wywołanie śmierci embrionów, które powstały z plemników zainfekowanego samca i komórki jajowej niezainfekowanej samicy lub infekcji obu płci innymi szczepami tego endosymbionta; ii) zaburzenie struktury płci w populacji poprzez zwiększenie udziału samic

kosztem samców na drodze: indukowania śmierci genetycznych samców (ang. *male-killing*) lub wywołania feminizacji (zmiana genetycznych samców w samice); indukcji partenogenezy, czyli rozwoju z niezapłodnionych jaj (Charlat i in., 2003). Ponadto bakterie z rodzaju *Wolbachia* mogą mieć korzystny wpływ na funkcjonowanie i długość życia swojego gospodarza, a także mogą być niezbędna w procesie embriogenezy i dalszego rozwoju niektórych gatunków bezkręgowców (Nikoh i in., 2014).

Endosymbiotyczna bakteria z rodzaju *Cardinium*, podobnie jak *Wolbachia*, również wpływa na reprodukcję swojego gospodarza na drodze indukcji niezgodności cytoplazmatycznej (CI) oraz powoduje dysproporcję płci w populacji na korzyść potomstwa zakażonej samicy (Zhang i in., 2012). Początkowo wpływ *Cardinium* na swojego gospodarza określany był jako szkodliwy. Obecnie pojawia się coraz więcej danych wskazujących również na korzyści, jakie czerpie gospodarz z tej symbiozy (Zug i Hammerstein, 2018). W 2008 roku podano, że około 6-7% wszystkich gatunków Arthropoda jest zakażonych *Cardinium* (Duron i in., 2008). Niemniej kontynuacja badań nad identyfikacją zakażeń tą bakterią wewnątrzkomórkową wskazuje, że infekcje mogą być bardziej powszechne, niż wcześniej przewidywano (Dallai i in., 2011).

Mimo znaczącego wpływu bakterii symbiotycznych zarówno na ekologię, jak i ewolucję swoich gospodarzy (Dattagupta i in., 2009), obecność bakterii symbiotycznych jest słabo zbadana w przypadku bezkręgowców słodkowodnych. Odnotowano jedynie pojedyncze przypadki infekcji endosymbiotycznymi bakteriami, które były przekazywane potomstwu na drodze transferu wertykalnego (Perkins i in., 2005). Pojawiły się również liczne hipotezy o potencjalnych infekcjach bakterii z rodzaju *Wolbachia* u bezkręgowców słodkowodnych, czego efektem miał być m.in. manipulowany przez endosymbionta system reprodukcyjny (m.in. Maniatsi i in., 2010). Ponadto możliwość transmisji bakterii z rodzaju *Wolbachia* pomiędzy zarówno filogenetycznie bliskimi, jak i odległymi gospodarzami, a także możliwość infekcji bezpośrednio ze środowiska (wraz z pokarmem), również stanowiła argument o potencjalnych zakażeniach tym endosymbiontem u bezkręgowców słodkowodnych (Zhoa i in., 2021).

- i) Identyfikacja bakterii z rodzaju *Wolbachia* u skorupiaków słodkowodnych Crustacea
Bezkręgowce słodkowodne zasiedlające zbiorniki astatyczne są wysoce wyspecjalizowane i przystosowane do życia w warunkach okresowego wysychania ich siedlisk (Brendonck i in., 2017). Jest to możliwe dzięki zdolności do kryptobiozy, wytwarzaniu przetrwalnikowych cyst (Williams, 2006), krótkiemu cyklowi życiowemu oraz strategiom rozrodczym, które w dużej mierze zostają ukierunkowane na partenogenezę (Ford i Weeks,

2018). Pomimo iż tzw. duże skrzelonogi obejmujące taksony z gromady Branchiopoda (Anostraca, Notostraca, Laevicaudata, Spinicaudata i Cyclestherida) są ważnym oraz ginącym elementem astatycznych zbiorników wodnych, stanowią one najslabiej zbadaną grupę stosunkowo dużych bezkręgowców zamieszkujących wody słodkie (Colburn, 2004).

Jak do tej pory nie ma bezpośrednich dowodów wskazujących, że endosymbionty bakteryjne manipulują reprodukcją słodkowodnych skorupiaków zasiedlających astatyczne zbiorniki wodne. Niemniej jednak, istnieją hipotezy, że powszechnie obserwowana dysproporcja płci (z przewagą samic), a także zróżnicowane strategie reprodukcyjne, m.in. partenogeneza, androdioecja, a także maskulinizacja, feminizacja, mogą być efektem infekcji bakteriami endosymbiotycznymi (Kageyama i in., 2012). W 2017 roku Sazama i in. oszacowali, że infekcja bakteriami z rodzaju *Wolbachia* u owadów wodnych stanowi aż 52% badanych gatunków. W przypadku słodkowodnych skorupiaków, infekcje bakteriami z rodzaju *Wolbachia* odkryto zaledwie u jednego gatunku równonoga Isopoda (Bouchon i in., 1998) oraz czterech gatunków widłonogów Copepoda (Wiwatanaratanabutr, 2013). W 2010 roku podjęto próbę identyfikacji bakterii z rodzaju *Wolbachia* u partenogenetycznych, jak i rozdzielnopłciowych populacji skorupiaków z rodzaju *Artemia* (Branchiopoda) zasiedlających zbiorniki astatyczne. Celem badań było znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy bakterie z rodzaju *Wolbachia* są odpowiedzialne za indukcję partenogenezy u tych skorupiaków (Maniatsi i in., 2010). Jednakże, w wyniku zastosowania techniki sekwencjonowania fragmentów 16S rRNA metodą Sanger, otrzymano słabej jakości produkty reakcji PCR lub sekwencje innych bakterii. Niemniej do amplifikacji wybranego markera molekularnego zastosowano startery specyficzne dla supergrup bakterii z rodzaju *Wolbachia* zidentyfikowanych u bezkręgowców lądowych, u których infekcje bakteriami (endo)symbiotycznymi są powszechnie identyfikowane (Werren i in., 2008). Tym samym jednym z powodów braku detekcji bakterii z rodzaju *Wolbachia* mogły być nieodpowiednie narzędzia molekularne, w tym specyficzne startery.

ii) Identyfikacja bakterii z rodzaju *Wolbachia* u słodkowodnych małży Bivalvia

Małże słodkowodne stanowią konserwatywną grupę wolno ewoluujących zwierząt. Reprezentują organizmy bentosowe, wrażliwe na zmiany chemizmu wody, i jako biofiltratory przyczyniają się do samooczyszczania się wód. Obecnie małże słodkowodne, ze szczególnym uwzględnieniem rodziny skójkowatych Unionidae, są jednymi z najbardziej zagrożonych na świecie bezkręgowców wodnych (Bogan, 2008). W cyklu rozwojowym Unionidae obserwuje

się osobniki rozdzielnopłciowe, z pasożytniczym stadium larwalnym (glochidium), które pasożytuje na konkretnych gatunkach ryb (Wächtler i in., 2001).

W przypadku bezkręgowców słodkowodnych, szczególnie drugiego pod względem liczby gatunków typu zwierząt – mięczaków Mollusca – symbioza wewnątrzkomórkowa jest opisywana jako zjawisko rzadkie (Distel i in., 2011). W 1998 roku Schilthuisen i Gittenberger przeprowadzili próbę identyfikacji bakterii z rodzaju *Wolbachia* u 38 gatunków Mollusca, w tym: 24 gatunków lądowych ślimaków Gastropoda, 11 gatunków słodkowodnych gatunków ślimaków Gastropoda oraz trzech słodkowodnych gatunków małży. Bakterie z rodzaju *Wolbachia* identyfikowano w oparciu o sekwencję genu *ftsZ* kodującego białko podziału komórkowego mikroorganizmu, otrzymaną techniką PCR, przy użyciu specyficznych starterów. Nie stwierdzono zakażenia *Wolbachia* u badanych Mollusca. W rezultacie praca była cytowana przez innych autorów, którzy wskazywali, że bakterie z rodzaju *Wolbachia* nie występuje u mięczaków (Lis i in., 2015) lub podkreślali potrzebę dalszych badań nad infekcją endosymbiontów w tej grupie systematycznej (Correa i in., 2016). W efekcie pytanie o obecność *Wolbachia* i innych endosymbiotycznych bakterii u Mollusca, pozostaje otwarte od 25 lat. Tym samym zasadne jest podjęcie badań ukierunkowanych na kompleksową identyfikację endosymbiontów bakteryjnych u mięczaków.

W 2016 roku Whelan i Strong wskazali, że wysoka heterogeniczność mitochondriów miała wpływ na polifiletykę badanych Gastropoda należących do rodziny Pleuroceridae na poziomie markerów mitochondrialnego DNA (mtDNA). Zjawisko to zostało odnotowane u małży z podwójnie jednorodzielskim dziedziczeniem mitochondrialnego DNA (ang. *Doubly Uniparental Inheritance of mtDNA*, DUI). Ponadto w obrębie rodziny Pleuroceridae odnotowano również dysproporcję płci z przewagą samic (ang. *female-biased sex ratios*; Ciparis i in., 2012). Co więcej, obserwowany wzór niezgodności klasyfikacji taksonomicznej, na poziomie morfologicznym i na poziomie markerów mtDNA, wykazywał podobieństwo do nierównowagi sprzężeń, spowodowanej u bezkręgowców lądowych przez infekcję bakterii z rodzaju *Wolbachia*. Z uwagi na identyfikację bakterii z rodzaju *Neorickettsia* (która jest spokrewniona z *Wolbachia*) u ślimaków słodkowodnych należących do rodziny Pleuroceridae i Semisulcospiridae, taka infekcja endosymbiontem wydawała się być bardzo prawdopodobna (Fredricks, 2006). Ponadto, u małży morskich zasiedlających ekstremalne środowiska w okolicach kominów hydrotermalnych, stwierdzono obecność symbiotycznych bakterii chemosyntetyzujących (Ikuta i in., 2016) oraz obecność potencjalnych endosymbiontów, których transmisja do potomstwa u małży z rodziny Vesicomidae odbywała się na drodze wertykalnej (Cary i Giovannoni, 1993).

iii) Identyfikacja bakterii z rodzaju *Wolbachia* u niesporczaków Tardigrada

Niesporczaki dzięki zdolności do kryptobiozy mogą przetrwać w ekstremalnych warunkach środowiskowych. Jednym z rodzajów kryptobiozy jest anhydrobioza, czyli stan odwodnienia, w którym niesporczaki tracą ponad 90% wody i potrafią przetrwać do kilkunastu lat (Bertolani i in., 2004; Guidetti i in., 2012). Tym samym uznawane są za najbardziej odporne bezkręgowce na Ziemi (Erdman i Kaczmarek, 2016). W zależności od gatunku, można obserwować zróżnicowane systemy reprodukcyjne, tj. rozdzielność płci, jak i partenogenezę. Jednakże u licznych gatunków Tardigrada nie poznano do tej pory szczegółowych mechanizmów rozrodczych (Altiero i in., 2019).

Tardigrada pozostają nadal jednym z najslabiej poznanych typów zwierząt. Nawet pomimo ich unikalnych zdolności kryptobiotycznych. Nie prowadzono na nich również (tj. do 2017 roku, kiedy rozpoczęłam swoje analizy) badań ukierunkowanych na identyfikację bakterii (endo)symbiotycznych. Jedynie w pojedynczych pracach, jako marginalny aspekt ekologiczny, wspomniane były badania mikrobiomu niesporczaków (Vecchi i in., 2016). Ponadto w innej pracy eksperymentalnej udowodniono związek pomiędzy niesporczakami, a fitopatogenną bakterią *Xanthomonas* sp. i występującą w przewodzie pokarmowym człowieka połączkę krwawą *Serratia marcescens* Bizio, 1823 (Krantz i in., 1999).

Dotychczasowe trudności w molekularnej identyfikacji endosymbiontów, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii z rodzaju *Wolbachia*, u bezkręgowców słodkowodnych mogą być spowodowane przez:

- stosowanie niespecyficznych starterów, które zostały opracowane do identyfikacji endosymbiontów u stawonogów lądowych (Marubayashi i in., 2014);
- zmienny wskaźnik zakażenia lub rozpowszechnienia u gatunków żywicieli, tj. różne szczepy bakterii z rodzaju *Wolbachia* mogą infekować tylko niewielką część populacji żywiciela (Lorenzo-Carballa i in., 2019);
- niewystarczające miano bakterii endosymbiotycznej uniemożliwiające skuteczną detekcję (Flatau i in., 2021), tj. ograniczenia w amplifikacji wszystkich gatunków bakterii, znajdujących się w badanej próbce (pomimo zastosowania starterów uniwersalnych), co szczególnie dotyczy gatunków bakterii występujących w śladowych ilościach (Muyzer i in. 1996);

- brak możliwości hodowli endosymbiontów bakteryjnych na tradycyjnych podłożach mikrobiologicznych (tzw. uncultured bacteria), stąd tylko techniki biologii molekularnej pozwalają na wgląd w profil gatunkowy tych bakterii (Conceição i in., 2021);
- poziomy transfer genów z bakterii endosymbiotycznej do genomu gospodarza (Cordaux i Gilbert, 2017);
- koinfekcje genetycznie różnymi szczepami bakterii u tego samego gospodarza (Shapoval i in., 2021).

Z uwagi na brak odpowiednich narzędzi molekularnych i bioinformatycznych pozwalających na identyfikację bakterii z rodzaju *Wolbachia* i/lub innych bakterii (endo)symbiotycznych, związanych z bezkręgowcami słodkowodnymi, występowanie tych infekcji pozostawało wciąż w formie nie potwierdzonych hipotez. Tym samym celem moich badań była weryfikacja hipotezy o infekcji tymi (endo)symbiontami przedstawicieli trzech grup systematycznych bezkręgowców słodkowodnych, tj. Bivalvia, Crustacea i Eutardigrada. Badania te przeprowadzono m.in. z użyciem nowych narzędzi molekularnych i bioinformatycznych.

Poniżej omówiono wymienione prace wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej.

Publikacja 1:

Mioduchowska M., Czyż M.J., Gołdyn B., Kur J., Sell J. 2018a. Instances of erroneous DNA barcoding of metazoan invertebrates: are universal *coxI* gene primers too “universal”? *PLoS ONE*, 13(6): e0199609, DOI: 10.1371/journal.pone.0199609

Publikacja ta koncentruje się na identyfikacji błędnych sekwencji pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej (*coxI*; marker molekularny COI) u bezkręgowców wodnych. Analizami objęto sekwencje COI zdeponowane w referencyjnych bazach danych: GenBank (baza dystrybuowana przez NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*)) oraz BOLD Systems (ang. *Barcode of Life Database*). Stwierdzono, że błędnie opisane sekwencje COI stanowią głównie kontaminację bakteryjną (w tym bakteriami symbiotycznymi).

W 1994 roku Folmer i in. opisali „uniwersalne” startery forward-LCO1490 i reverse-HCO2198 (powszechnie nazywane starterami Folmera) umożliwiające amplifikację pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej u bezkręgowców. Startery te do tej pory są powszechnie stosowane do amplifikacji barkodowych sekwencji, głównie w celu molekularnej identyfikacji

badanych organizmów oraz przeprowadzenia analiz filogenetycznych. Jednocześnie wzrasta liczba błędnie opisanych sekwencji COI, które zostały zdeponowane w genetycznych bazach danych, a ich amplifikacja została przeprowadzona z użyciem starterów Folmera. W konsekwencji, niektóre sekwencje COI opisane jako sekwencje bezkręgowców, są w rzeczywistości sekwencjami bakteryjnymi (w tym sekwencjami bakterii symbiotycznych danego gospodarza). Ponadto stwierdzono również kontaminację sekwencjami grzybowymi, sekwencjami pochodzącymi od innych bezkręgowców, a także sekwencjami mitochondrialnego DNA amplifikowanymi z genomu jądrowego (ang. *nuclear mitochondrial DNA segments*, NUMTs).

W niniejszej pracy zastosowano startery Folmera do amplifikacji sekwencji COI słodkowodnego skorupiaka zadychry pospolitej *Branchipus schaefferi* (Fischer, 1834) (Crustacea: Branchiopoda) zasiedlającego zbiorniki astatyczne na poligonie wojskowym Poznań-Biedrusko. Nieoczekiwanie, oprócz sekwencji *B. schaefferi*, otrzymano również sekwencje bakteryjne. Kontaminacja była spowodowana przez *Aeromonas* sp. – bakterię opisaną jako symbiont pijawki lekarskiej *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758 (Annelida: Clitellata) (Graf 2000), ale także patogenną dla ryb (Gudmundsdottir, 1998) oraz mającą toksyczny wpływ na niektóre gatunki nicieni Nematoda (Cauillault i Ewbank, 2002).

W wyniku zastosowania odpowiednich narzędzi bioinformatycznych, zostały następnie zidentyfikowane inne błędnie opisane sekwencje bezkręgowców, będące sekwencjami bakteryjnymi, m.in. sekwencje COI opisane jako morskie gatunki *Patelloida striata* (Quoy & Gaimard, 1834) (Mollusca: Gastropoda) (Nakano i Ozawa, 2005) i *Tetranchyroderma* sp. 3 (Gastrotricha: Macrotrichida) (Todaro i in., 2011), w rzeczywistości będące sekwencjami symbiotycznej bakterii *Endozoicomonas* sp. (Ding i in., 2016). Bakterie należące do rodzaju *Endozoicomonas* mają pozytywny wpływ na żywotność swojego gospodarza (Ding i in., 2016) i powszechnie występują u morskich bezkręgowców, m.in. u *Elysia ornata* (Swainson, 1840) (Mollusca: Gastropoda) (Kurahashi i Yokota, 2007) i *Atrina pectinata* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Bivalvia) (Hyun i in., 2014).

W oparciu o przeprowadzone obliczenia statystyczne, ujawniono, że stopień kontaminacji zależy od danej grupy systematycznej, tj. najmniej błędnych sekwencji stwierdzono w typach Mollusca i Arthropoda – mniej niż 1% (z analizowanych 300 zdeponowanych sekwencji Mollusca i 300 zdeponowanych sekwencji Arthropoda), natomiast w przypadku bruchorzęsków Gastrotricha błędne sekwencje stanowiły aż 6,9% (analizą objęto wszystkie 363 zdeponowane w tym czasie sekwencje).

W niniejszej publikacji omówione zostały również przyczyny błędnie amplifikowanych sekwencji, takie jak: poziom konserwatywności i specyficzności starterów Folmera, czy też temperatura przyłączania starterów (ang. *annealing*) do matrycowej cząsteczki DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Ponadto zostały opisane również konsekwencje związane z deponowaniem takich sekwencji w referencyjnych bazach danych. Wykazano również, że w przypadku analiz metabarkodowych, związanych z techniką sekwencjonowania nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*, NGS), błędnie opisane sekwencje mogą prowadzić do przeszacowania bioróżnorodności na drodze niepoprawnie sklasyfikowanych jednostek taksonomicznych OTU (Staats i in., 2016).

Publikacja 2:

Mioduchowska M., Czyż M.J., Gołdyn B., Kilikowska A., Namiotko T., Pinceel T., Łaciak M., Sell J. 2018b. Detection of bacterial endosymbionts in freshwater crustaceans: the applicability of non-degenerate primers to amplify the bacterial 16S rRNA gene. *PeerJ*, 6: e6039, DOI: 10.7717/peerj.6039

W tej publikacji zostały opisane zaprojektowane przeze mnie, *in silico*, niezdegradowane startery: WOLBSL 5'-GCTAGTTGGTGGAGTAATAGCC-3' i WOLBSR 5'-GACTACCAGGGTATCTAATCCTG-3'. Startery WOLBSL i WOLBSR pozwoliły na amplifikację bakteryjnego fragmentu genu 16S rRNA. Uzyskane na drodze sekwencjonowania Sangera sekwencje nukleotydowe umożliwiły dokonanie pionierskich odkryć bakterii (endo)symbiotycznych związanych ze słodkowodnymi skorupiakami.

Specyficzność zaprojektowanych starterów do amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA bakterii (endo)symbiotycznych została przetestowana na przedstawicielu należącym do gromady małżoraczków Ostracoda, jak i na gatunkach zaliczanych do tzw. dużych skrzelonogów Branchiopoda.

Przy użyciu zaprojektowanych starterów dokonano odkrycia następujących (endo)symbiontów u słodkowodnych skorupiaków Crustacea: u *B. schaefferi* (Branchiopoda; populacje z Polski) – *Candidatus Gortzia*, *Methylophilus* sp., *Spirobacillus* sp., *Undibacterium* sp., *Wolbachia*; u *Streptocephalus cafer* (Lovén, 1847) (Branchiopoda; populacja z Republiki Południowej Afryki) – *Wolbachia*; u *Moina macrocopa* (Straus 1820) (Branchiopoda; populacja z Polski) – *Methylophilus* sp.; u *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) (Ostracoda; populacje z Polski i Włoch) – *Cardinium*, *Methylophilus* sp. Stwierdzono również występowanie uncultured bacterium u *B. schaefferi* (Branchiopoda; populacje z Polski) i

Branchipodopsis wolfi Daday, 1910 (Branchiopoda; populacja z Republiki Południowej Afryki). W publikacji zostały opisane wszystkie zidentyfikowane bakterie (endo)symbiotyczne.

Identyfikacja bakterii (endo)symbiotycznych stanowi duże wyzwanie dla naukowców. Konieczne są odpowiednie narzędzia molekularne – specyficzne startery niezbędne do amplifikacji sekwencji danego (endo)symbionta. W niniejszej pracy odnotowano, że efektywność amplifikacji sekwencji bakteryjnych przy użyciu nowo zaprojektowanych starterów wyniosła 100%. Niemniej jeśli w pojedynczej próbie były różne bakterie, mimo dobrych jakościowo produktów reakcji PCR, sekwencje nie były czytelne. Tym samym zaprojektowane startery są odpowiednie do identyfikacji (endo)symbiotycznych bakterii na pierwszym etapie identyfikacji, następnie powinny zostać użyte startery specyficzne gatunkowo.

Publikacja 3:

Mioduchowska M., Zając K., Zając T., Sell J. 2020a. *Wolbachia* and *Cardinium* infection found in threatened unionid species: a new concern for conservation of freshwater mussels? *Conservation Genetics*, 21: 381–386, DOI: 10.1007/s10592-020-01255-9

Kolejny artykuł koncentruje się na identyfikacji bakterii endosymbiotycznych z rodzaju *Wolbachia* i *Cardinium* związanych z zagrożonym wyginięciem słodkowodnym małżem skójką gruboskorupową *Unio crassus* Philipsson, 1788 z terenu Polski. Próby do badań zostały pobrane za zgodą Generalnej Dyrekcji Ochrony Środowiska.

W pracy Mioduchowskiej i in. (2016) opisaliśmy zaobserwowany u *U. crassus* model dziedziczenia mtDNA typu DUI. Efektem zjawiska DUI, zarówno w tkankach somatycznych, jak i gonadalnych, było występowanie dwóch rodzajów mtDNA, tj. typu F (pochodzenia matczynego) i typu M (pochodzenia ojcowskiego), ze zróżnicowaną dystrybucją mitotypu M. Sekwencje obu genomów mtDNA opublikowaliśmy w pracy Burzyńskiego i in. (2017). Do niniejszych badań zostały wytypowane osobniki, u których stwierdziliśmy heteroplazmię pod względem genomu mtDNA typu M i F w tkance somatycznej (nodze), a także niskie zróżnicowanie genetyczne (częściowe wyniki opisaliśmy w pracy Kilikowskiej i in., 2020) i nierówną proporcję płci z dominacją samic, co mogłoby wskazywać na efekt wpływu infekcji bakteriami endosymbiotycznymi. Zastosowano dwie techniki analiz molekularnych: i) pierwszym etapem był kompleksowy wgląd w profil mikrobiomu na drodze sekwencjonowania nowej generacji regionu hiperzmiennego V3–V4 bakteryjnego fragmentu 16S rRNA; ii)

drugim etapem było molekularne potwierdzenie infekcji potencjalnymi bakteriami endosymbiotycznymi i analiza ich dystrybucji u samców oraz samic badanego małża. W tym celu przeprowadzono szereg amplifikacji, przy użyciu specyficznych starterów, na drodze techniki sekwencjonowania Sangera.

W wyniku analizy mikrobiomu *U. crassus*, zostały zidentyfikowane endosymbiotyczne bakterie z rodzaju *Cardinium* oraz sekwencje należące do bakterii z rzędu Rickettsiales. Niemniej jednak nie stwierdzono OTU sklasyfikowanego do niższego poziomu taksonomicznego, tj. do rodzaju *Wolbachia* (która należy do rzędu Rickettsiales). Zastosowane specyficzne startery do amplifikacji genów *Cardinium* oraz *Wolbachia* (Simões i in., 2011; Singh i in., 2013; Mains i in., 2016) pozwoliły ostatecznie na identyfikację tych endosymbiontów u samic *U. crassus*. Poziom infekcji wśród samic wynosił aż 33%. Nie stwierdzono koinfekcji *Wolbachia* i *Cardinium* u zainfekowanych samic.

Do tej pory wzorce różnorodności genetycznej i filogeografia większości gatunków małży słodkowodnych nie zostały dobrze scharakteryzowane, a ich filogeneza budzi wątpliwości. Odkrycie endosymbiontów *Wolbachia* i *Cardinium* u *U. crassus* otwiera nowe możliwości do przeprowadzenia dalszych badań, tj. poznania korelacji mechanizmów endosymbiont-gospodarz oraz ich wpływu na biologię i ekologię zagrożonego wyginięciem małża. W efekcie dalszych badań, umożliwiających właściwą identyfikację jednostek zarządzania (ang. *management units*, MU) i jednostek istotnych ewolucyjnie (ang. *evolutionary significant units*, ESU), możliwa będzie odpowiednia ochrona ginącego gatunku.

Publikacja 4:

Mioduchowska M., Zając K., Bartoszek K., Madanecki P., Kur J., Zając T. 2020b. 16S rRNA-based metagenomic analysis of the gut microbial community associated with the DUI species *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(2): 615–623, DOI: 10.1111/JZS.12377

W niniejszej publikacji został przedstawiony profil mikrobiomu wątrobotrzustki małża *Unio crassus* na tle linii ewolucyjnych gospodarza, jego płci, oraz występowania populacji w różnych warunkach siedliskowych. Przeprowadzone badania stanowią jednocześnie kontynuację identyfikacji (endo)symbiotycznych gatunków bakterii u tego małża.

W pracy tej metagenetykę profilu bakteryjnego przeprowadzono z wykorzystaniem sekwencjonowania NGS ampikonów obejmujących hiperzmienny fragment V3-V4 genu 16S rRNA, co umożliwiło identyfikację domen Bacteria i Archea. Badania obejmowały populacje

U. crassus zasiedlające odmienne warunki ekologiczne, w Polsce Północnej, Centralnej i Południowej, co pozwoliło na korelację składu profilu mikrobiomu w odpowiedzi na selekcję środowiskową (Lokmer i Wegner, 2015). Natomiast w oparciu o nasze wcześniejsze badania (Mioduchowska i in., 2016), zostały wytypowane populacje reprezentujące różne linie filogeograficzne, zarówno samce, jak i samice.

Kompleksowa analiza profilu mikrobiomu *U. crassus* pozwoliła na identyfikację szeregu bakterii, o zróżnicowanej dystrybucji na poziomie populacji i płci. Zidentyfikowano wspólny mikrobiom dla wszystkich badanych osobników, co stanowiło 69 bakteryjnych jednostek taksonomicznych OTU (23% wszystkich zidentyfikowanych OTU). Najliczniejsze OTU reprezentowane były przez takie typy bakterii jak: Proteobacteria (obecnie Pseudomonadota), Bacteroidetes (obecnie Bacteroidota) i Firmicutes (obecnie Bacillota).

W przypadku bakterii (endo)symbiotycznych, stwierdzono obecność bakterii umożliwiających trawienie celulozy: *Bacillus* sp. (Pinheiro i in., 2015), *Flavobacterium* sp. (Dar i in., 2015), *Pseudomonas* sp. (Watkins i Simkiss, 1990) i *Stenotrophomonas* sp. (Pinheiro i in., 2015). W jednej z badanych populacji zidentyfikowano również bakterie z rodzaju *Chryseobacterium*, które w pozostałych populacjach wystąpiły tylko u pojedynczych osobników (Van Horn i in., 2011). Wcześniejsze prace również wykazały występowanie wyspecjalizowanej mikrobioty bakteryjnej, pozwalającej na trawienie celulozy u szeregu gatunków mięczaków (Charrier i Rouland, 1992). Ponadto poznano potencjał ewolucyjny takich zależności z bakteriami chemosymbiotycznymi, które umożliwiają małżom zasiedlanie ekstremalnych ekosystemów (Taylor i Glover, 2010), a także nabycie rzadkich w świecie zwierząt zdolności ksyloτροφicznych (Distel i in., 2011).

Dokonano pionierskiego odkrycia endosymbiotycznej bakterii z rodzaju *Candidatus Xiphinematobacter*, znanej z indukcji partenogenezy u swoich gospodarzy, o niepoznanym do tej pory mechanizmie transmisji (tj. wertykalny i/lub horyzontalny) (Vandekerckhove i in., 2000). Endosymbiont wystąpił tylko w jednej z badanych populacji, u obu płci. Do tej pory *C. Xiphinematobacter* został zidentyfikowany u Nematoda, u których wykazano koewolucję gospodarz-endosymbiont (Vandekerckhove i in., 2000).

Podsumowując, w niniejszej pracy przedstawiono profil mikrobiomu *U. crassus*. Obserwowane zróżnicowanie składu bakteryjnego mikrobioty wątrobotrzustki jest bardziej uwarunkowane relacjami filogeograficznymi pomiędzy badanymi populacjami, niż odmiennym siedliskiem ich występowania. Nie stwierdzono znaczących różnic w składzie mikrobiomu jelitowego między samcami i samicami tego gatunku. Zidentyfikowano bakterie symbiotyczne umożliwiające trawienie celulozy, co jest niezwykle istotne w przypadku

organizmów, u których w pokarmie występują związki tego polisacharydu. W przypadku odkrytego endosymbionta *C. Xiphinematobacter*, nie stwierdzono korelacji jego występowania z płcią gospodarza. Natomiast biorąc pod uwagę powszechne występowanie bakterii symbiotycznych, umożliwiających trawienie celulozy, postawiliśmy hipotezę o specyficzności tej grupy bakterii dla badanego gatunku małża. Zarówno obecność endosymbionta *C. Xiphinematobacter* jak i bakterii celulolitycznych może być efektem transferu horyzontalnego (wraz z pokarmem).

Publikacja 5:

Kaczmarek Ł., Roszkowska M., Poprawa I., Janelt K., Kmita H., Gawlak M., Fiałkowska E., **Mioduchowska M.** 2020. Integrative description of bisexual *Paramacrobotus experimentalis* sp. nov. (Macrobotidae) from republic of Madagascar (Africa) with microbiome analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 145: 106730, DOI:10.1016/j.ympev.2019.106730

W tej interdyscyplinarnej publikacji badania skoncentrowane były między innymi na identyfikacji bakterii (endo)symbiotycznych związanych z nowym dla nauki gatunkiem niesporczaka *Paramacrobotus experimentalis*.

Wykorzystując taksonomiczne podejście integratywne (tj. analizę morfologiczną i genetyczną), opisano tu nowy gatunek niesporczaka z Madagaskaru – *Paramacrobotus experimentalis*, Kaczmarek, Mioduchowska, Poprawa & Roszkowska, 2020 (w Kaczmarek i in. 2020). Ponadto, analizy przeprowadzone na poziomie morfologicznym, strukturalnym i molekularnym, pozwoliły na odkrycie, że nowy gatunek jest rozdzielnopłciowy.

W publikacji tej w oparciu o sekwencjonowanie NGS bakteryjnego fragmentu genu 16S rRNA, opisano profil mikrobiomowy dwóch populacji *Pam. experimentalis*, które były utrzymywane przez dwa lata w hodowli laboratoryjnej. Stwierdzono, że badane populacje dzielą 31 z 86 zidentyfikowanych OTU bakteryjnych. Natomiast w wyniku porównania mikrobiomu *Pam. experimentalis* z mikrobiomem pożywki laboratoryjnej, w której utrzymywana była hodowla, jedynie 16 ze 137 zidentyfikowanych OTU bakteryjnych było wspólnych. Tym samym potwierdzono, że mikrobiom Tardigrada znacznie różni się od zgrupowania bakteryjnego zasiedlającego pożywkę stanowiącą środowisko życia badanych niesporczaków. W pracy przedstawiono również profile metaboliczne, które ujawniły, że analizowane mikrobiomy składały się z bakterii odpowiedzialnych głównie za transport błonowy, metabolizm aminokwasów i metabolizm węglowodanów.

Zidentyfikowano OTU sklasyfikowane do potencjalnych bakterii endosymbiotycznych należących do rzędu Rickettsiales, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami Vecchiego i in. (2018) oraz Mioduchowskiej i in. (2019a). Wspólną cechą tych bakterii jest obligatoryjna wewnątrzkomórkowa symbioza oraz transmisja horyzontalna (Gilbert i in., 2012). Cechy te przyczyniły się do określenia rzędu Rickettsiales jako *'host-dependent'*. Niemniej odnotowane zostały również pewne wyjątki, gdzie transmisja Rickettsiales była wertykalna i tym samym bakterie takie określono jako *non- 'host-restricted'* (Dale i Moran, 2006). Należy tutaj też podkreślić, że nasze badania były przeprowadzone na populacjach *Pam. experimentalis*, które utrzymywaliśmy w warunkach laboratoryjnych przez dwa lata. Tym samym bakterie badanego niesporczaka, których nie zaobserwowano w pożywce hodowlanej, musiały być ściśle związane ze swoim gospodarzem. Natomiast transmisja tych bakterii do kolejnych pokoleń musiała odbywać się na drodze wertykalnej. Brak OTU Rickettsiales w środowisku badanego gatunku stanowi zatem dowód na to, że bakterie te są ściśle związane ze swoim gospodarzem. Niemniej jednak, podobnie jak Vecchi i in. (2018), nie udało się nam zidentyfikować OTU, które można byłoby pewnie zaklasyfikować do niższego poziomu taksonomicznego, tj. rodzaju *Wolbachia*.

W niniejszej pracy stwierdzono ponadto obecność OTU należącego do endosymbiotycznego rodzaju *Polynucleobacter*. Bakterie te były opisane między innymi jako obligatoryjne endosymbionty słodkowodnych orzęsków Ciliata (Hoetzing i in., 2019). Znaczna frekwencja tego endosymbionta została zidentyfikowana w pożywce hodowlanej, w której występowały wrotki Rotifera stanowiące pokarm *Pam. experimentalis*. Natomiast śladowa liczba sekwencji pochodzących od tej bakterii była obserwowana również w jednej populacji badanego niesporczaka. Tym samym prawdopodobny wydaje się transfer horyzontalny tego endosymbionta, który jest związany z Rotifera.

Ostatecznie, powołując się na nasze wcześniejsze prace, w których zostały opisane nowe narzędzia molekularne i bioinformatyczne, wskazano na ich zastosowanie w celu identyfikacji endosymbiontów u nowych dla nauki gospodarzy, szczególnie bezkręgowców wodnych (**Publikacja 2**; Mioduchowska i in., 2019b).

Publikacja 6:

Mioduchowska M., Nitkiewicz B., Roszkowska M., Kačarević U., Madanecki P., Pinceel T., Namiotko T., Gołdyn B., Kaczmarek Ł. 2021. Taxonomic classification of the bacterial endosymbiont *Wolbachia* based on next-generation sequencing: is there molecular evidence for its presence in tardigrades? *Genome*, 64(10): 951–958, DOI: 10.1139/gen-2020-0036

W publikacji poddana została weryfikacji hipoteza o występowaniu wewnątrzkomórkowego symbionta z rodzaju *Wolbachia* w mikrobiomie niesporczaków Tardigrada.

Przeprowadzono wysokoprzepustowe sekwencjonowanie bakteryjnego fragmentu genu 16S rRNA, co pozwoliło na wgląd w profil mikrobiomu następujących gatunków należących do Eutardigrada: *Hypsibius exemplaris* Gąsiorek, Stec, Morek, i Michalczyk, 2018 z Wielkiej Brytanii; *Macrobiotus polypiformis* Roszkowska, Ostrowska, Stec, Janko, i Kaczmarek, 2017 z Ekwadoru; *Paramacrobiotus fairbanksi* Schill, Förster, Dandekar, i Wolf, 2010 z Antarktydy (dodatkowo analizie poddane zostały jaja); oraz dwa nowe nieopisane gatunki z rodzaju *Paramacrobiotus* z Polski. Słodkowodny skorupiak *Streptocephalus cafer*, u którego odkryłam infekcję *Wolbachia* (**Publikacja 2**) stanowił kontrolę pozytywną w niniejszym badaniu. Klasyfikacja jednostek taksonomicznych OTU została przeprowadzona natomiast z użyciem dwóch referencyjnych baz danych, które były zastosowane w poprzednich pracach z zakresu analiz mikrobiomu Tardigrada, tj. i) baza Greengenes, która została zastosowana przez nas w **Publikacji 5**; oraz ii) baza SILVA użyta przez Vecchiego i in. (2018).

Wykonane analizy bioinformatyczne otrzymanych amplikonów, w oparciu o dwie bazy sekwencji referencyjnych, ujawniły znaczące różnice w liczbie oraz taksonomii jednostek OTU. Jedynie przy zastosowaniu bazy Greengenes zidentyfikowano sekwencje przypisane do OTU *Wolbachia*. W celu weryfikacji poprawności sekwencji, dodatkowo została sprawdzona homologia istotności statystycznej porównań otrzymanych sekwencji ze zdeponowanymi w bazie GenBank sekwencjami nukleotydowymi przy użyciu aplikacji BLAST.

Zastosowanie bazy Greengenes pozwoliło na zidentyfikowanie OTU *Wolbachia* w badanych mikrobiomach dorosłych osobników Tardigrada, tj.: *Paramacrobiotus* sp. i *Mac. polypiformis*. Natomiast bakterie należące do rzędu Rickettsiales zostały stwierdzone w jajach partenogenetycznego gatunku *Pam. fairbanksi* oraz u rozdzielnopłciowych dorosłych osobników *Mac. polypiformis* i u dwóch taksonów *Paramacrobiotus* sp. Inaczej prezentowały się wyniki uzyskane z bazy SILVA, gdzie stwierdzono jedynie OTU Rickettsiales w mikrobiomie jednego taksonu tj. *Paramacrobiotus* sp. W przypadku zastosowanej kontroli pozytywnej (tj. *S. cafer*), otrzymano sekwencje sklasteryzowane do OTU Rickettsiales, przy zastosowaniu obu referencyjnych baz danych. Nie stwierdzono OTU Rickettsiales i *Wolbachia* u dwóch gatunków (osobniki dorosłe): *Hys. exemplaris* i *Pam. fairbanksi*. Poza tym nie stwierdzono w badanych próbkach innych endosymbiontów.

Przeprowadzone zostały również analizy filogenetyczne wszystkich uzyskanych OTU *Wolbachia* i Rickettsiales, z obu referencyjnych baz danych. Do analiz relacji filogenetycznych

użyto: i) wszystkie OTU Rickettsiales opisane w poprzednich pracach, tj. Vecchi i in. (2018) oraz w **Publikacji 5**; ii) OTU potencjalnych endosymbiontów należących do typu Alphaotobacteria, które zostały opisane w pracy Guidetti i in. (2020); iii) ortologiczne sekwencje zidentyfikowane na podstawie przyrównań w bazie GenBank; iv) wybrane OTU *Wolbachia* z bazy Greengenes i SILVA. Przeprowadzone analizy stanowiły dowód na poprawne sklasyfikowane OTU do rodzaju *Wolbachia* i rzędu Rickettsiales, gdyż wszystkie przyrównane sekwencje zostały przypisane do właściwych kładów na drzewie filogenetycznym.

Stwierdzono, że odkryte bakterie z rodzaju *Wolbachia* występują u niesporczaków w małej liczbie sekwencji, a to może być przyczyną, że do tej pory nie udało się odkryć takiej infekcji stosując sekwencjonowanie Sangera (Mee i in., 2015). Odwołując się do naszej wcześniejszej publikacji, tj. **Publikacji 2**, wskazano że problemy metodologiczne, w tym zastosowanie odpowiednich specyficznych starterów do amplifikacji bakteryjnych markerów molekularnych, mogą stanowić rozwiązanie powstałego problemu. Tym samym, w przypadku zastosowanej kontroli pozytywnej (izolat *S. cafer*) w której zidentyfikowano *Wolbachia* (**Publikacja 2**), otrzymano OTU sklasyfikowane jedynie do rangi rzędu Rickettsiales. Zatem przypuszczalnie wśród sekwencji opisanych jako OTU Rickettsiales znajdują się sekwencje należące do bakterii z rodzaju *Wolbachia*.

Nasze badania wskazały, że wybór bazy referencyjnej jest kluczowy do poprawnej identyfikacji OTU bakterii i wpływa na dalszą interpretację otrzymanych wyników. Taksonomia OTU powinna być połączona z analizami filogenetycznymi, co stanowi sprawdzenie poprawności przeprowadzonej klasteryzacji. Odkryte infekcje bakteriami należącymi do rodzaju *Wolbachia* oraz rzędu Rickettsiales u kilku gatunków Tardigrada mogą zapoczątkować nowe kierunki badań nad niesporczakami, w tym nad koewolucją gospodarz-endosymbiont.

Publikacja 7:

Mioduchowska M., Konecka E., Gołdyn B., Pinceel T., Brendonck L., Lukić D., Kaczmarek Ł., Namiotko T., Zając K., Zając T., Jastrzębski J.P., Bartoszek K. 2023. Playing peekaboo with a master manipulator: metagenetic detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* supergroups in freshwater invertebrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 9400, DOI: [org/10.3390/ijms24119400](https://doi.org/10.3390/ijms24119400)

W kolejnej publikacji, wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego, opracowano nową metodę metagenetyczną, umożliwiającą identyfikację bakterii z rodzaju *Wolbachia* u bezkręgowców słodkowodnych w obrębie Crustacea, Bivalvia i Eutardigrada. W opisanym powyżej cyklu publikacyjnym wykazano, że sekwencjonowanie techniką Sangera nie pozwala na wykrycie koinfekcji różnymi szczepami *Wolbachia* u pojedynczego gospodarza (**Publikacja 2**). Natomiast NGS, przy zastosowaniu uniwersalnych, powszechnie stosowanych starterów do amplifikacji hiperzmiennego fragmentu V3-V4 bakteryjnego genu 16S rRNA, pozwoliło na wgląd w profil mikrobiomowy i identyfikację pojedynczych (endo)symbiontów (**Publikacje 3, 4, 5, 6**).

Z uwagi na kontynuację wcześniejszych badań, analizy przeprowadzono zarówno z użyciem wcześniej nie badanych gatunków, jak i gatunków wykorzystanych we wcześniej omówionych publikacjach, wchodzących w skład cyklu habilitacyjnego (Crustacea (**Publikacja 1 i 2**), Bivalvia (**Publikacja 3 i 4**), oraz Eutardigrada (**Publikacja 5 i 6**)).

W niniejszej publikacji identyfikację bakterii z rodzaju *Wolbachia* przeprowadzono na drodze:

i) porównania wyników metagenetycznych uzyskanych za pomocą zaprojektowanych starterów do fragmentu V3-V4 16S rRNA (**Publikacja 2**, opisano zaprojektowane startery, które pozwoliły na identyfikację różnych (endo)symbiontów związanych z Crustacea w wyniku sekwencjonowania Sangera) i powszechnie stosowanych starterów do amplifikacji tego bakteryjnego genu, a także porównania wyników uzyskanych na drodze sekwencjonowania Sangera (z użyciem starterów specyficznych dla szczepów *Wolbachia*). Zaprojektowane startery wykazały specyficzność do sekwencji bakterii z rodzaju *Wolbachia* w przeciwieństwie do starterów powszechnie stosowanych w analizach mikrobiomowych. Niemniej, z uwagi na mniejszą specyficzność do innych bakterii, zaprojektowane startery nie były odpowiednie do kompleksowej analizy składu mikrobiomu. Z kolei sekwencjonowanie Sangera umożliwiło jedynie niewielką detekcję infekcji *Wolbachia*.

ii) opracowania nowych narzędzi bioinformatycznych, tj. napisanego w języku Python nowego skryptu, który umożliwił identyfikację sekwencji *Wolbachia* (w oparciu o wartości odległości Hamminga) z analizowanych mikrobiomów złożonych z bakteryjnych ampikonów V3-V4 16S rRNA.

iii) przeprowadzenia analiz filogenetycznych, które pozwoliły na sklasyfikowanie otrzymanych sekwencji bakterii z rodzaju *Wolbachia* do trzech supergrup: a) zróżnicowanej supergrupy A zidentyfikowanej u Crustacea, Bivalvia i Eutardigrada; b) supergrupy E odkrytej

w mikrobiomie Crustacea; oraz c) nowej dla nauki supergrupy V, zidentyfikowanej u Crustacea i Bivalvia.

Endosymbiontyczne bakterie z rodzaju *Wolbachia* zostały zidentyfikowane w następujących gatunkach/rodzajach należących do trzech badanych grup systematycznych: a) Crustacea – potwierdzono zakażenie *Wolbachia* u *B. schaefferi* i *S. cafer* (u których wcześniej stwierdzono tego endosymbionta przy użyciu zaprojektowanych starterów i sekwencjonowania Sangera (**Publikacja 2**)) oraz dokonano pionierskiej detekcji *Wolbachia* u *Artemia salina* (Linnaeus, 1758), *Artemia parthenogenetica* Bowen and Sterling, 1978, *Eulimnadia* sp., *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) i *Chydorus* sp.; b) Bivalvia – potwierdzono infekcję bakterii z rodzaju *Wolbachia* u *U. crassus* (u których wcześniej stwierdzono zakażenie tym endosymbiontem przy użyciu specyficznych do *Wolbachia* starterów i sekwencjonowania Sangera (**Publikacja 3**)) oraz dokonano pionierskiej detekcji *Wolbachia* u *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771); c) Eutardigrada – dokonano pionierskiej detekcji *Wolbachia* u *Pam. experimentalis* (w **Publikacji 5**, zidentyfikowano jedynie infekcję bakterii należących do rzędu Rickettsiales, przy zastosowaniu metagenetyki i amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA, przy użyciu powszechnie stosowanych starterów) oraz u *Macrobotus basiatatus* Nelson, Adkins Fletcher, Guidetti, Roszkowska, Grobys and Kaczmarek, 2020. Szczegółowe informacje dotyczące supergrup *Wolbachia* u poszczególnych gatunków oraz zastosowanej metodyki opisane są w niniejszej publikacji.

We wszystkich badanych grupach systematycznych zidentyfikowano różne warianty z supergrupy A bakterii z rodzaju *Wolbachia*. Postawiono więc hipotezę, że występowanie blisko spokrewnionych supergrup *Wolbachia* u filogenetycznie odległych linii bezkręgowców słodkowodnych może być efektem transferu horyzontalnego. Natomiast supergrupa E i nowa supergrupa V mogą być przenoszone wertykalnie – poprzez dominujący sposób transmisji *Wolbachia* między gospodarzami (Yang i in., 2012). Niemniej mechanizmy wpływające na transmisję *Wolbachia* do nowych gospodarzy w dalszym ciągu pozostają słabo poznane (Hughes i in., 2014).

Do tej pory, z uwagi na powszechnie występujące infekcje bakterii z rodzaju *Wolbachia* u bezkręgowców lądowych i rzadkie występowanie *Wolbachia* u bezkręgowców wodnych, została przyjęta hipoteza o kontynentalnym pochodzeniu tego symbionta wewnątrzkomórkowego (Bouchon i in., 1998). Prezentowane wyniki jednak tej hipotezy nie potwierdzają, ponieważ najstarsze ewolucyjnie klady supergrup *Wolbachia* reprezentowane były przez bezkręgowce znane z obu typów środowisk, natomiast najmłodsze ewolucyjnie

klady składały się z supergrup *Wolbachia* zidentyfikowanych jedynie u bezkręgowców lądowych.

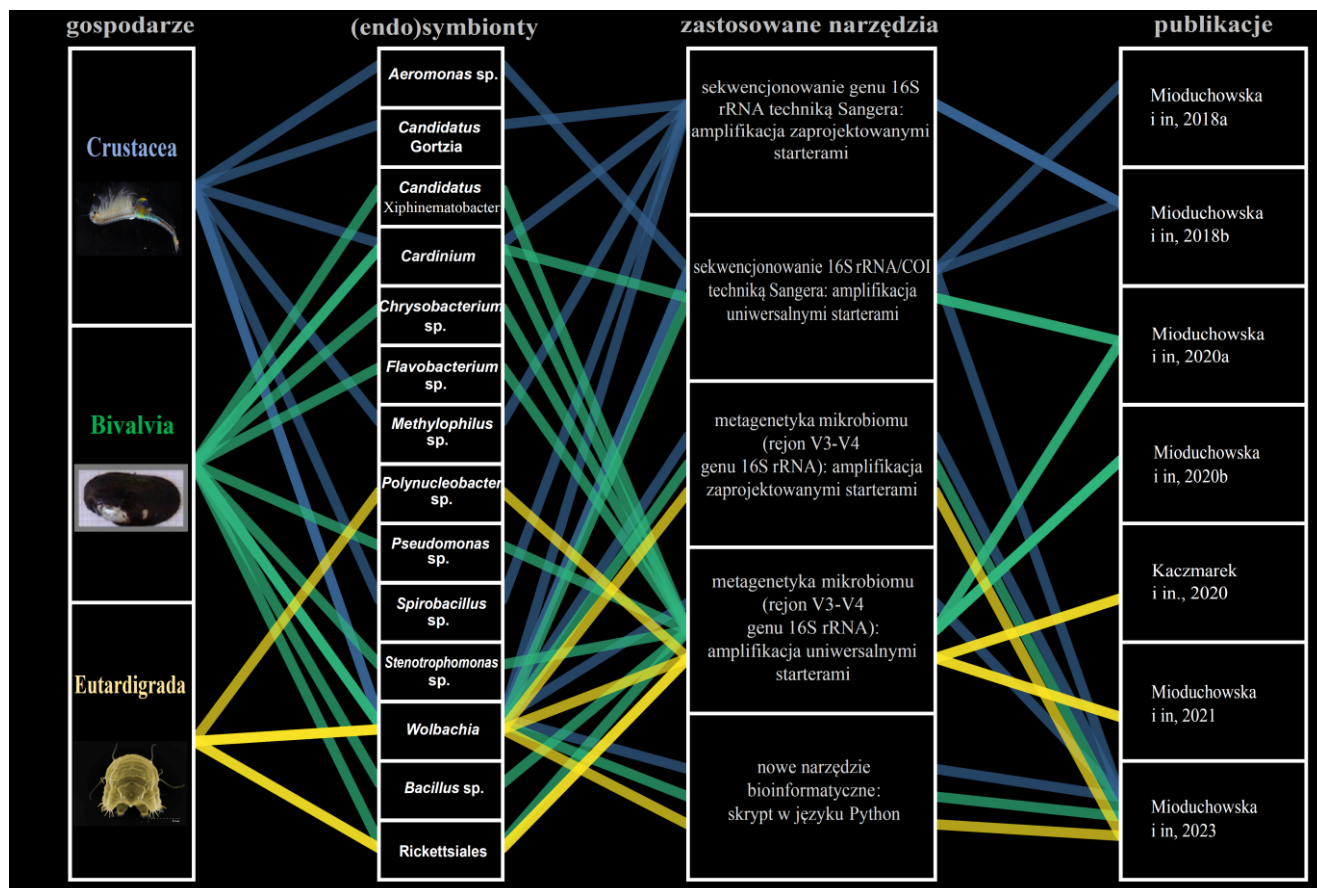
Podsumowanie i wnioski uzyskane z prezentowanego osiągnięcia habilitacyjnego.

Podsumowując, głównym wnioskiem płynącym z moich badań nad identyfikacją bakterii (endo)symbiotycznych związanych z bezkręgowcami słodkowodnymi jest wykazanie, że takie infekcje są bardziej powszechne niż wcześniej sądzono, a trudności w ich wykrywaniu wynikają z braku odpowiednich narzędzi molekularnych i bioinformatycznych. Natomiast najważniejszym osiągnięciem przeprowadzonych przeze mnie badań są liczne odkrycia bakterii z rodzaju *Wolbachia* u nowych dla nauki gospodarzy należących do Crustacea, Bivalvia i Eutardigrada. Przy użyciu różnych narzędzi molekularnych i bioinformatycznych dokonałam również pionierskich identyfikacji infekcji wymienionych grup bezkręgowców słodkowodnych szeregiem innych bakterii (endo)symbiotycznych, a schemat wszystkich odkryć przedstawiłam na Rycinie 1.

Pionierskie odkrycia bakterii (endo)symbiotycznych opisane w kolejnych publikacjach:

- **Publikacje 1 i 2** – identyfikacja (endo)symbiontów u słodkowodnych skorupiaków Crustacea, tj. (endo)symbionty związane z *Branchipus schaefferi* (Branchiopoda) – *Aeromonas* sp., *Candidatus* Gortzia, *Methylophilus* sp., *Spirobacillus* sp., *Wolbachia*; endosymbiont związany ze *Streptocephalus cafer* (Branchiopoda) – *Wolbachia*; (endo)symbiont związany z *Moina macrocopa* (Branchiopoda) – *Methylophilus* sp.; (endo)symbionty związane z *Heterocypris incongruens* (Ostracoda) – *Cardinium*, *Methylophilus* sp.;
- **Publikacje 3 i 4** – identyfikacja (endo)symbiontów związanych ze słodkowodnym małżem *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae) – *Bacillus* sp., *Candidatus* Xiphinematobacter, *Cardinium*, *Chryseobacterium*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Wolbachia*;
- **Publikacje 5 i 6** – identyfikacja symbiontów u słodkowodnych niesporczaków Eutardigrada, tj. endosymbiont *Wolbachia* związany z *Paramacrobiotus* sp. i *Macrobiotus polypiformis* oraz prawdopodobne endosymbionty z rzędu Rickettsiales i rodzaju *Polynucleobacter* sp. związane z *Paramacrobiotus experimentalis*;
- **Publikacja 7** – nowe narzędzie molekularne i bioinformatyczne do identyfikacji endosymbiotycznej bakterii *Wolbachia* w trzech badanych grupach systematycznych, tj. i) Crustacea: *Artemia salina*, *Artemia parthenogenetica*, *Branchipus schaefferi*, *Chydorus* sp.,

Eulimnadia sp., *Streptocephalus cafer*, *Triops cancriformis*; ii) Bivalvia: *Dreissena polymorpha*, *Unio crassus*; iii) Eutardigrada: *Macrobiotus basiatus* i *Pam. experimentalis*.



Rycina 1. Schemat przedstawiający zastosowane narzędzia molekularne i bioinformatyczne, w poszczególnych publikacjach wchodzących w skład cyklu mojego osiągnięcia habilitacyjnego, pozwalające na identyfikację bakterii (endo)symbiotycznych związanych z Crustacea, Bivalvia i Eutardigrada.

Należy podkreślić, że przed przystąpieniem do niniejszych badań, nie było danych literaturowych dotyczących bakterii (endo)symbiotycznych związanych z badanymi gatunkami bezkręgowców wodnych, co stanowi o nowatorskim wymiarze pracy. Niemniej obecnie pojawiły się pojedyncze publikacje innych autorów, które stanowią potwierdzenie prezentowanych odkryć:

- odkrycie *Wolbachia* u Tardigrada zostało potwierdzone przez Tibbs-Cortesa i in. (2022). W dwóch wcześniejszych pracach opublikowanych w latach 2018-2020 (Vecchi i in., 2018; Guidetti i in., 2020) nie wykryto infekcji tym endosymbiontem, ale obecność bakterii

należących do rzędu Rickettsiales w mikrobiomie badanych niesporczaków, skłoniła autorów do postawienia hipotezy, o możliwości infekcji przez bakterii z rodzaju *Wolbachia*.

- pionierska identyfikacja endosymbiontycznej bakterii z rodzaju *Cardinium* u *Heterocypris incongruens* (Ostracoda) – odkrycie zostało potwierdzone w pracy Schön i in. (2018). Badania nad częstością występowania *Cardinium* u różnych odległych filogenetycznie grup słodkowodnych Ostracoda są kontynuowane przy użyciu zaprojektowanych przeze mnie specyficznych dla *Cardinium* starterów, co stanowi obecnie nowy nurt prowadzonych badań przez inny zespół badaczy, do którego należę (wstępne wyniki zostały zaprezentowane w ubiegłym roku na międzynarodowym sympozjum ostrakodologicznym w Lyonie: Prais K., Mioduchowska M., Namiotko T., Kilikowska A. 2022. Further evidence for widespread *Cardinium* infection in non-marine ostracod crustaceans. *International Symposium on Ostracoda*, Lyon, France).

Wyniki badań składające się na powyżej omówione osiągnięcie naukowe prezentowałam na siedmiu konferencjach międzynarodowych [referaty (2), postery (7)] oraz pięciu krajowych [referaty (3), postery (3)]. Szczegółowe dane zostały zamieszczone w Załączniku 4.

Literatura

- Altiero T., Suzuki A.C., Rebecchi L. 2019. Reproduction, development and life cycles. [In:] *Water Bears: The Biology of Tardigrades*. Springer, pp 211–247.
- Bertolani R., Guidetti R., Jönsson K.I., Altiero T., Boschini D., Rebecchi L. 2004. Experiences with dormancy in tardigrades. *Journal of Limnology*, 63(1): 16–25.
- Bogan A.E. 2008. Global diversity of freshwater bivalves (Mollusca: Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 139–147.
- Bouchon D., Rigaud T., Juchault P. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *The Royal Society of London*, 265: 1081–1090.
- Brendonck L., Pinceel T., Ortells R. 2017. Dormancy and dispersal as mediators of zooplankton population and community dynamics along a hydrological disturbance gradient in inland temporary pools. *Hydrobiologia*, 796(1): 201222.
- Buchner P. 1965. Symbiosis in animals which suck plant juices. [In:] *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. New York: Interscience, pp 210–432.
- Burzyński A., Soroka M., Mioduchowska M., Kaczmarczyk A., Sell J. 2017. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of *Unio crassus*: mitochondrial molecular clock and the over confidence of molecular dating. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107: 605–608.
- Cary S.C., Giovannoni S.J. 1993. Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 5695–5699.
- Charlat S., Hurst G.D.D., Mercot H. 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics*, 19(4): 217223.
- Charrier M., Rouland C. 1992. The digestive osidases of the snail *Helix aspersa*: localizations and variations according to the nutritional status. *Canadian Journal Zoology*, 70: 2234–2241.
- Chaston J.J., Goodrich-Blair H. 2010. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(1): 4158.
- Ciparis S., Henley W.F., Voshell R. 2012. Population sex ratios of pleurocerid snails (*Leptoxis* spp.): variability and relationships with environmental contaminants and conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 287–298.
- Colburn E.A. 2004. Vernal Pools. Natural History and Conservation. McNaughton & Gunn, Inc., Saline, MI.

- Conceição C.C., Nascimento da Silva J., Arcanjo A., Lopes Nogueira C., Araujo de Abreu L., Lagerblad de Oliveira P., et al. 2021. *Aedes fluviatilis* cell lines as new tools to study metabolic and immune interactions in mosquito-*Wolbachia* symbiosis. *Scientific Reports*, 11: 19202.
- Cordaux R., Gilbert C. 2017. Evolutionary significance of *Wolbachia*-to-animal horizontal gene transfer: female sex determination and the f element in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genes*, 8: 186.
- Correa C.C., Ballard J.W.O. 2016. *Wolbachia* associations with Insects: winning or losing against a master manipulator. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3: 153.
- Couillault C., Ewbank J.J. 2002. Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, 70: 4705–4707.
- Dale C., Moran N.A., 2006. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126(3): 453–465.
- Dallai R., Mercati D., Giusti F., Gottardo M., Carapelli A. 2011. A *Cardinium*-like symbiont in the proturan *Acerella muscorum* (Hexapoda). *Tissue and Cell*, 43: 151156.
- Dar M.A., Pawar K.D., Jadhav J.P., Pandit R.S. 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the gastro-intestinal tract of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and their evaluation for cellulose biodegradation. *International Biodeterioration Biodegradation*, 98: 73–80.
- Dattagupta S., Schaperdorth I., Montanari A., Mariani S., Kita N., Valley J.W., et al. 2009. A novel symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a freshwater cave amphipod. *International Society for Microbial Ecology*, 3: 935943.
- Ding J.Y., Shiu J.H., Chen W.M., Chiang Y.R., Tang S.L. 2016. Genomic Insight into the host-endosymbiont relationship of *Endozoicomonas montiporae* CL-33(T) with its coral host. *Frontiers in Microbiology*, 7: 251.
- Distel D.L., Amin M., Burgoyne A., Linton E., Mamangkey G., Morrill W., et al. 2011. Molecular phylogeny of *Pholadoidea* Lamarck, 1809 supports a single origin for xylophagy (wood feeding) and xylophagous bacterial endosymbiosis in Bivalvia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2): 245–254.
- Douglas A. 1994. Symbiotic interactions. Oxford: Oxford University Press, 156 pp.
- Douglas A.E. 2014. Symbiosis as a general principle in eukaryotic evolution. [In:] Origin and evolution of Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6: a016113.
- Duron O., Bouchon D., Boutin S., Bellamy L., Zhou L., Engelstädter J., et al. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology*, 6: 27.
- Erdmann W., Kaczmarek Ł. 2016. Tardigrades in space research - past and future. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 47: 545–553.
- Flatau R., Segoli M., Hawlena H. 2021. *Wolbachia* endosymbionts of fleas occur in all females but rarely in males and do not show evidence of obligatory relationships, fitness effects, or sex-distorting manipulations. *Frontiers in Microbiology*, 12: 649248.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- Ford R.E., Weeks S.C. 2018. Intersexual conflict in androdioecious clam shrimp: do androdioecious hermaphrodites evolve to avoid mating with males? *Ethology*, 124(5): 357364.
- Fredricks D. 2006. Introduction to the rickettsiales and other intracellular prokaryotes. [In:] The prokaryotes. *Springer, New York*, pp 457–466.
- Funkhouser L.J., Bordenstein S.R. 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLOS Biology*, 11(8): e100163.
- Gilbert S.F., Sapp J., Tauber A.I. 2012. A symbiotic view of life: We have never been individuals. *Quarterly Review of Biology*, 87(4): 325–341.
- Graf J. 2000. The symbiosis of *Aeromonas* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech. *ASM news*, 66(3):147–153.
- Gudmundsdottir B.K. 1998. Infections by atypical strains of the bacterium *Aeromonas salmonicida*. *Icelandic Agricultural Sciences*, 12: 61–72.
- Guidetti R., Rizzo A.M., Altiero T., Rebecchi L. 2012. What can we learn from the toughest animals of the Earth? Water bears (tardigrades) as multicellular model organisms in order to perform scientific preparations for lunar exploration. *Planetary and Space Science*, 74(1): 97–102.
- Guidetti R., Vecchi M., Ferrari A., Newton I.L.G., Cesari M., Rebecchi L. 2020. Further insights in the Tardigrada microbiome: phylogenetic position and prevalence of infection of four new Alphaproteobacteria putative endosymbionts. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 188(3): 925–937.
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A., Werren J.H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281: 215220.

- Hoetzinger M., Schmidt J., Pitt A., Koll U., Lang E., Hahn M.W. 2019. *Polynucleobacter paneuropaeus* sp. nov., characterized by six strains isolated from freshwater lakes located along a 3000 km north-south cross-section across Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69: 203–213.
- Hughes G.L., Dodson B.L., Johnson R.M., Murdock C.C., Tsujimoto H., Suzuki Y. 2014. Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 12498–12503.
- Hyun D.W., Shin N.R., Kim M.S., Oh S.J., Kim P.S., Whon T.W., et al. 2014. *Endozoicomonas atrinae* sp. nov., isolated from the intestine of a comb pen shell *Atrina pectinata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(7): 2312–8.
- Ikuta T., Takaki Y., Nagai Y., Shimamura S., Tsuda M., Kawagucci S., et al. 2016. Heterogeneous composition of key metabolic gene clusters in a vent mussel symbiont population. *ISME Journal*, 10: 990–1001.
- Kageyama D., Narita S., Watanabe M. 2012. Insect sex determination manipulated by their endosymbionts: incidences, mechanisms and implications. *Insects*, 3: 161199.
- Kilikowska A., Mioduchowska M., Wysocka A., Kaczmarczyk-Ziemba A., Rychlińska J., Zając K., et al. 2020. The patterns and puzzles of genetic diversity of endangered freshwater mussel *Unio crassus* Philipsson, 1788 populations from Vistula and Neman drainages (eastern central Europe). *LIFE*, 10: 119.
- Krantz S.L., Benoit T.G., Beasley C.W. 1999. Phytopathogenic bacteria associated with Tardigrada. *Zoologischer Anzeiger*, 238: 259–260.
- Kurahashi M., Yokota A. 2007. *Endozoicomonas elysicola* gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from the sea slug *Elysia ornata*. *Systematic and Applied Microbiology*, 30: 202–206.
- Lis A., Maryńska-Nadachowska A., Kajtoch Ł. 2015. Relations of *Wolbachia* infection with phylogeography of *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) populations within and beyond the Carpathian Contact Zone. *Microbial Ecology*, 70: 509–521.
- Lokmer A., Wegner K.M. 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME Journal*, 9: 670–682.
- Lorenzo-Carballa M.O., Torres-Cambas Y., Heaton K., Hurst G.D.D., Charlat S., Sherratt T.N., Van Gossum H., Cordero-Rivera A., Beatty C.D. 2019. Widespread *Wolbachia* infection in an insular radiation of damselflies (Odonata, Coenagrionidae). *Scientific Reports*, 9: 11933.
- Mains J.W., Brelsfoard C.L., Rose R.I., Dobson S.L. 2016. Female adult *Aedes albopictus* suppression by *Wolbachia* infected male mosquitoes. *Scientific Reports*, 6: 33846.
- Maniatsi S., Bourtzis K., Abatzopoulos T.J. 2010. May parthenogenesis in *Artemia* be attributed to *Wolbachia*? *Hydrobiologia*, 651: 317–322.
- Marubayashi J.M., Kliot A., Yuki V.A., Rezende J.A.M., Krause-Sakate R., et al. 2014. Diversity and localization of bacterial endosymbionts from whitefly species collected in Brazil. *PLoS ONE*, 9(9): e108363.
- Mee P.T., Weeks A.R., Walker P.J., Hoffmann A.A., Duchemin J.B. 2015. Detection of low-level *Cardinium* and *Wolbachia* infections in culicoides. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 6177–6188.
- Mioduchowska M., Kaczmarczyk A., Zając K., Zając T., Sell J. 2016. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in somatic tissues of the endangered freshwater mussel *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae): implications for sex identification and phylogeographical studies. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 325(9): 610–625.
- Mioduchowska M., Bartoszek K., Roszkowska M., Kaczmarek Ł. 2019b. A new tool to identify the target 16S rRNA sequence from next generation sequencing data. *Genome*, 62(6): 410.
- Mioduchowska M., Kačarević U., Roszkowska M., Kaczmarek Ł. 2019a. Molecular evidence for *Wolbachia pipientis* Hertig, 1936 endosymbiosis in tardigrades opens new research opportunities for DNA barcoding. *Genome*, 62(6): 411.
- Muyzer G., Hottentrager S., Teske A., Wawer C. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16s rDNA: a new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. [In:] *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, pp. 1–23.
- Nakano T., Ozawa T. 2005. Systematic revision of *Patelloida pygmaea* (Dunker, 1860) (Gastropoda: Lottiidae), with a description of a new species. *Journal of Molluscan Studies*, 71: 357–370.
- Nikoh N., Hosokawa T., Moriyama M., Oshima K., Hattori M., Fukatsu T. 2014. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28): 1025710262.
- Oliver K.M., Russell J.A. 2016. Symbiosis, Introduction to. [In:] *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. Oxford: Academic Press, pp. 282–290.
- Perkins S.L., Budinoff R.B., Siddall M.E. 2005. New Gammaproteobacteria associated with blood-feeding leeches and a broad phylogenetic analysis of leech endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 52195224.

- Pinheiro G.L., Correa R.F., Cunha R.S., Cardoso A.M., Chaia C. 2015. Isolation of aerobic cultivable cellulolytic bacteria from different regions of the gastrointestinal tract of giant land snail *Achatina fulica*. *Frontiers in Microbiology*, 6: 860.
- Roger A.J., Munoz-Gómez S.A., Kamikawa R. 2017. The origin and diversification of mitochondria. *Current Biology*, 27: R1177–R1192.
- Sazama E.J., Bosch M.J., Shouldis C.S., Ouellette S.P., Wesner J.S. 2017. Incidence of *Wolbachia* in aquatic insects. *Ecology and Evolution*, 7: 1165–1169.
- Schilthuizen M., Gittenberger E. 1998. Screening mollusks for *Wolbachia* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 268–270.
- Schön I., Kamiya T., Van den Berghe T., Van den Broecke L., Martens K. 2018. Novel *Cardinium* strains in non-marine ostracod (Crustacea) hosts from natural populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 130: 406–415.
- Shapoval N.A., Nokkala S., Nokkala C., Kuftina G.N., Kuznetsova V.G. 2021. The incidence of *Wolbachia* bacterial endosymbiont in bisexual and parthenogenetic populations of the psyllid genus *Cacopsylla* (Hemiptera, Psylloidea). *Insects*, 12: 853.
- Simões P.M., Mialdea G., Reiss D., Sagot M.-F., Charlat S. 2011. *Wolbachia* detection: an assessment of standard PCR protocols. *Molecular Ecology Resources*, 11: 567–572.
- Singh S.T., Kumar J., Thomas A., Ramamurthy V.V., Rajagopal R. 2013. Detection and localization of *Rickettsia* sp. in mealybug. *Environmental Entomology*, 42: 711–716.
- Staats M., Arulandhu A.J., Gravendeel B., Holst-Jensen A., Scholtens I., Peelen T., et al. 2016. Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1–16.
- Taylor J.D., Glover E.A. 2010. Chemosymbiotic bivalves. [In:] *The Vent and Seep Biota*, Springer, pp 107–135.
- Tibbs-Cortes L.E., Tibbs-Cortes B.W., Schmitz-Esser S. 2022. Tardigrade community microbiomes in North American Orchards include putative endosymbionts and plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13: 866930.
- Todaro M.A., Kanneby T., Dal Zotto M., Jondelius U. 2011. Phylogeny of *Thaumastodermatidae* (Gastrotricha: Macrotrichida) inferred from nuclear and mitochondrial sequence data. *PLoS ONE*, 6: e17892.
- Toft C., Andersson S.G. 2010. Evolutionary microbial genomics: Insights into bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 11: 465–475.
- Van Horn D.J., Garcia J.R., Loker E.S., Mitchell K.R., Mkoji G.M., Adema C.M., et al. 2011. Complex intestinal bacterial communities in three species of planorbid snails. *Journal of Molluscan Studies*, 78: 74–80.
- Vandekerckhove T.T.M., Willems A., Gillis M., Coomans A. 2000. Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in *Xiphinema americanum* group species (Nematoda, Longidoridae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2197–2205.
- Vecchi M., Vicente F., Guidetti R., Bertolani R., Rebecchi L., Cesari M. 2016. Interspecific relationships of tardigrades with bacteria, fungi and protozoans, with a focus on the phylogenetic position of *Pyxidium tardigradum* (Ciliophora). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(4): 846–855.
- Vecchi M., Newton I.L.G., Cesar M., Rebecchi L., Guidetti R., 2018. The microbial community of tardigrades: environmental influence and species specificity of microbiome structure and composition. *Microbial Ecology*, 76(2): 467–481.
- Wächtler K., Dreher-Mansur M.C., Richter T. 2001. Larval types and early postlarval biology in naiads (Unionoida). [In:] *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida*, Ecological Studies, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 145: 93–125.
- Watkins B., Simkiss K. 1990. Interactions between soil bacteria and the molluscan alimentary tract. *Journal of Molluscan Studies*, 56: 267–274.
- Werren J.H., Baldo L., Clark M.E. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 741751.
- Whelan N.V., Strong E.E. 2016. Morphology, molecules and taxonomy: extreme incongruence in pleurocerids (Gastropoda, Cerithioidea, Pleuroceridae). *Zoologica Scripta*, 45: 62–87.
- Williams D.D. 2006. The biology of temporary waters. *New York: Oxford University Press Inc.*
- Wiwatanaratnabutr I. 2013. Distribution, diversity and density of *Wolbachia* infections in cladocerans and copepods from Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114: 341–345.
- Yang C.Y., Xiao J.H., Niu L.M., Ma G.C., Cook J.M., Bian S.N. 2012. Chaos of *Wolbachia* sequences inside the compact fig syconia of *Ficus benjamina* (Ficus: Moraceae). *PLoS ONE*, 7: e48882.
- Zhang X.F., Zhao D.X., Hong X.Y. 2012. *Cardinium* the leading factor of cytoplasmic incompatibility in the planthopper *Sogatella furcifera* doubly infected with *Wolbachia* and *Cardinium*. *Environmental Entomology*, 41(4): 833840.

Zhao Z., Zhu J., Hoffmann A.A., Cao L., Shen L., Fang J. 2021. Horizontal transmission and recombination of *Wolbachia* in the butterfly tribe *Aeromachini* Tutt, 1906 (Lepidoptera: Hesperiidae). *G3 – Genes Genome Genetics*, 11: jkab221.

Zug R., Hammerstein P. 2018. Evolution of reproductive parasites with direct fitness benefits. *Heredity*, 120(3): 266281.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Poniżej została przedstawiona moja pozostała aktywność naukowa. Wszystkie cytowane publikacje stanowiące rezultat prowadzonych przeze mnie badań, zostały oznaczone pogrubioną czcionką. Spis literatury znajduje się na końcu niniejszego rozdziału. Natomiast dane dotyczące innych osiągnięć, m.in. staże, szkolenia, projekty, konferencje, znajdują się Załączniku 4 „Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny”.

W 2004 roku rozpoczęłam studia na kierunku Biologia na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Moja aktywność naukowa zaczęła się już w trakcie studiów. W latach 2006-2009 byłam Przewodniczącą Studenckiego Koła Naukowego Hydrobiologii i Ochrony Wód Uniwersytetu Gdańskiego. W latach 2007-2009 prezentowałam wyniki z przeprowadzonych badań podczas czterech krajowych konferencji naukowych. Wyniki badań z zakresu analizy morfologicznej i identyfikacji Copepoda oraz zróżnicowania organizmów mejobentonicznych z rejonu Pomorza ukazały się w publikacjach: **Stolarskiej i Wojtasik (2008)**; **Wojtasik i in. (2009)**; **Mioduchowskiej i Wojtasik (2009)** oraz **Wojtasik i Mioduchowskiej (2010)**.

W 2009 roku obroniłam pracę magisterską pod tytułem: „Zróżnicowanie genetyczne halibuta grenlandzkiego (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum, 1792)) z zachodniego rejonu Morza Barentsa” (specjalność – Biologia Molekularna, zakres seminarium dyplomowego – Genetyka). Pracę magisterską zrealizowałam pod kierunkiem dr Barbary Wojtasik w Katedrze Genetyki i Cytologii Uniwersytetu Gdańskiego. Badaniami objęte były cztery populacje halibuta grenlandzkiego pobrane z rejonu Morza Barentsa podczas komercyjnego rejsu M/Tr Polaris we współpracy z Departamentem Rybołówstwa pod dowództwem Ministerstwa Rolnictwa Republiki Litewskiej wraz z Dyrekcją ds. Rybołówstwa (Norwegia). Wsparcie finansowe uzyskano od UAB „Seivalas” (Private Limited Liability Company (Uždaroji Akcinė Bendrovė); Kłajpeda, Litwa). Analiza struktury genetycznej halibuta grenlandzkiego została przeprowadzona w oparciu o siedem polimorficznych loci

genowych kodujących białka enzymatyczne. Dane literaturowe wskazywały na panmiksję halibuta grenlandzkiego w objętym badaniem rejonie, jednak uzyskane wyniki, w ramach realizowanej pracy magisterskiej, jednoznacznie wskazały na istnienie dwóch izolowanych populacji. Tym samym eksploatacja komercyjna halibuta grenlandzkiego powinna zostać odpowiednio uregulowana w celu dobrego zarządzania rybołówstwem. Pracę zrealizowałam w ramach współpracy z Instytutem Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie oraz z Katedrą Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracy **Wojtasik i in. (2021)** oraz zaprezentowane podczas I Konferencji Naukowej Polskich Badaczy Morza.

Tematyka badawcza obejmująca *Bivalvia*

W 2009 roku, bezpośrednio po ukończeniu studiów magisterskich, w wyniku rekrutacji na I rok studiów III stopnia na Studia Doktoranckie z Biologii, Ekologii i Mikrobiologii na Wydziale Biologii (w Katedrze Genetyki i Biosystematyki) Uniwersytetu Gdańskiego, otrzymałam pierwszą lokatę i rozpoczęłam kontynuację studiów. Pracę doktorską pod tytułem: „Struktura genetyczna ginącego gatunku, skójki gruboskorupowej *Unio crassus* (Philipson, 1788), w rzekach Polski” wykonałam pod kierunkiem dr hab. Jerzego Sella, prof. UG. Badania finansowane były w ramach trzech projektów naukowych (MNiSW, nr **3636/B/P01/2010/38N**, wykonawca projektu (2009-2014); Badania Własne UG, nr **BW/1410-5-0376-8**, udział w pracach laboratoryjnych (2009); konkurs Młodzi Naukowcy UG, nr **538-L155-0803-12**; kierownik projektu (2012-2013)). Celem badań była ocena zmienności oraz zróżnicowania genetycznego polskich populacji zagrożonego wyginięciem i objętego ochroną, słodkowodnego gatunku małża *U. crassus*, wgląd w strukturę genetyczną gatunku oraz poznanie czynników wpływających na jej ukształtowanie, testowanie użyteczności genomu mtDNA typu M (fragment *Mcox1*) w analizach filogeograficznych oraz identyfikacja jednostek ochrony tego gatunku w Polsce.

W pracy doktorskiej wykorzystano markery zarówno jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA, dla osiągnięcia przedstawionych powyżej celów badań. Z uwagi na brak danych literaturowych dotyczących mikrosatelitarnego DNA skójki gruboskorupowej, przeprowadzono skanowanie genomu, na drodze sekwencjonowania NGS, przy zastosowaniu metody pirosekwencjonowania 454. Skanowanie genomu umożliwiło zaprojektowanie starterów komplementarnych do rejonów flankujących odcinki mikrosatelitarnego DNA. Szczegóły procedur związanych z identyfikacją i charakterystyką polimorficznych loci mikrosatelitarnego DNA *U. crassus* zostały przedstawione w pracy **Sella i in. (2013)**. W sumie

wytypowano 154 najbardziej optymalnych starterów do amplifikacji 77 loci o doskonałym motywie powtórzeń, a do dalszych badań wybrano 13 polimorficznych loci mikrosatelitarnego DNA.

Do badań mitochondrialnego DNA zostały zaprojektowane specyficzne startery pozwalające na amplifikację rejonu ND3-ND2 oraz fragment genu kodującego podjednostkę I oksydazy cytochromowej z genomu dziedziczonego w linii matczynej (*Fcox1*) i ojcowskiej (*Mcox1*). Związane jest to z odkryciem dwóch rodzajów mtDNA w tkankach somatycznych samców *U. crassus*, określanych jako: typ F- (mtDNA pochodzenia matczynego) oraz typ M- (mtDNA pochodzenia ojcowskiego). Taki model dziedziczenia mtDNA określany jest jako podwójnie jednorodzicielskie dziedziczenie mtDNA (ang. *Doubly Uniparental Inheritance*, DUI) i był obserwowany do tej pory u Unionidae tylko u samców w tkankach gonadalnych (Zouros, 2013). Dystrybucję DUI w tkankach somatycznych samców opisałam w publikacji **Mioduchowskiej i in. (2016)**. Co ciekawe, odkrycie zjawiska DUI w tkankach somatycznych samców pozwoliło również na opracowanie nieinwazyjnej molekularnej identyfikacji płci tego ginącego gatunku małży (**Mioduchowska i in., 2016**).

Analizy przeprowadzone z wykorzystaniem markerów molekularnych mitochondrialnego i jądrowego DNA, umożliwiły wgląd w procesy kształtujące obserwowaną zmienność genetyczną badanych populacji. Stwierdzono głęboki podział badanych populacji na dwa klady, linie ewolucyjne, wywodzące się najprawdopodobniej z różnych refugium glacialnych. Badane populacje *U. crassus* były izolowane a zmienność genetyczna gatunku była zgodna z modelem izolacji przez odległość (**Douda i in., 2014; Mioduchowska i in., 2016; Kilikowska i in., 2020**). Z uwagi na wyznaczenie dwóch głównych jednostek ochrony (jednostek istotnych ewolucyjnie, ESU), otrzymane wyniki mogą ostatecznie wspomóc prawidłowe planowanie ochrony tego ginącego gatunku.

Wyniki zostały zaprezentowane na sześciu krajowych i pięciu międzynarodowych konferencjach naukowych (szczegóły w Załączniku nr 4) oraz opublikowane we wspomnianych powyżej publikacjach. Podczas realizacji pracy doktorskiej, brałam też udział w trzech innych projektach dotyczących *U. crassus*: i) POIS, nr **POIS-05.02.00-00-084/08**, udział w projekcie badawczym (2011-2012); ii) konkurs Młodzi Naukowcy UG, nr **538-L155-0793-12**, wykonawca projektu (2012-2013); iii) MNiSW, nr **N304 328836**, udział w projekcie badawczym (2013-2014)). Ponadto przeprowadziłam również badania dotyczące identyfikacji jednostek ochrony bułgarskich populacji głowacza białopłetwego *Cottus gobio* (gospodarz pasożytniczego stadium larwalnego (glochidium) skójkki gruboskorupowej): Badania Własne UG, nr **L155-5-0416-0**, wykonawca projektu (2009-2010).

Do tej pory prowadzę badania związane z genetyką małży słodkowodnych. Część uzyskanych wyników, z zakresu identyfikacji bakterii (endo)symbiotycznych związanych z Bivalvia, opisałam w ramach mojego osiągnięcia habilitacyjnego (**Mioduchowska i in., 2020a,b; Mioduchowska i in., 2023**). Poza tym brałam udział w pionierskim sekwencjonowaniu genomu typu F oraz typu M *U. crassus*. Zsekwencjonowane genomy zostały opublikowane w pracy **Burzyńskiego i in. (2017)**. Od 2019 jestem członkinią Management Committee (MC) międzynarodowej Akcji COST European Cooperation in Science and Technology, tytuł projektu: „Conservation of freshwater mussels: a pan-European approach” (nr **CA18239**). Obecnie przygotowywane są wspólne publikacje naukowe z przeprowadzonego projektu w ramach Akcji COST, m.in. monografia dotycząca wybranych gatunków małży słodkowodnych. W 2020 roku brałam udział w aplikacyjnym projekcie „Renaturalisation of inland delta of Nida River” (EU/NFOŚiGW/IOP (projekt aplikacyjny LIFE4DELTA), nr **NAT/PL/000018**, udział w projekcie badawczym). Moim zadaniem było przeprowadzenie analiz filogenetycznych osobników do hodowli kontenerowej małży. W 2022 roku brałam udział w molekularnej identyfikacji symbiotycznych orzęsków Ciliophora związanych z *U. crassus* (badania zrealizowane w ramach grantu NCN, nr **2021/05/X/NZ2/01839**, udział w pracach laboratoryjnych). Opracowana metodyka do przeprowadzenia sekwencjonowania wysokoprzepustowego Ciliophora umożliwiła identyfikację 98 taksonów. Wykazano, że skład taksonomiczny różni się pomiędzy rzekami i zmienia się w ciągu roku (publikacja jest w recenzji).

W sumie wyniki z zakresu analiz genetycznych *U. crassus* zostały zaprezentowane na sześciu międzynarodowych i dziesięciu krajowych konferencjach naukowych (szczegółowe dane zostały zamieszczone w Załączniku 4) oraz opublikowane w następujących artykułach: **Sell i in., 2013; Douda i in., 2014; Mioduchowska i in., 2016; Burzyński i in., 2017; Kilikowska i in., 2020**. Część uzyskanych wyników, z zakresu identyfikacji bakterii (endo)symbiotycznych związanych z Bivalvia, opisałam w ramach mojego głównego osiągnięcia: **Mioduchowska i in., 2020a,b; Mioduchowska i in., 2023**.

Tematyka badawcza obejmująca Crustacea

Od 2015 roku, czyli jeszcze w trakcie realizacji pracy doktorskiej, moje badania z zakresu genetyki, zaczęły obejmować inne grupy systematyczne niż Bivalvia. W kręgu moich zainteresowań znalazły się słodkowodne skorupiaki Crustacea, a szczególnie zadychra pospolita *Branchipus schaefferi*. W latach 2015-2018 przeprowadziłam analizę metapopulacji tego gatunku i zbadałam mechanizmy ewolucji populacji wyspowych, na poziomie

mitochondrialnego i jądrowego DNA. Zaprojektowałam specyficzne startery pozwalające na amplifikację sekwencji barcodowych (*cox1*) *B. schaefferi* oraz zidentyfikowałam polimorficzne markery mikrosatelitarnego DNA. Na realizację badań uzyskałam trzy projekty w których pełniłam funkcję kierownika (konkurs Młodzi Naukowcy UG, nr **538-L155-B934-15**, **538-L155-B249-16**, **538-L260-B518-17-1M**). Część wyników została opublikowana w pracy **Mioduchowskiej i in. (2018a,b,c)** oraz **Lukić i in. (2019)** (pozostałe prace są w przygotowaniu).

W 2019 roku odbyłam **staż w Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation, KU Leuven, Belgium**. Staż został zrealizowany **pod kierunkiem prof. dr Luca Brendoncka**. Przeprowadziłam tam badania w ramach projektu „Coevolution of the endangered fairy shrimp *Branchipus schaefferi* (Branchiopoda, Anostraca) and intracellular endosymbiont *Wolbachia* bacteria” finansowanego przez European Molecular Biology Organization (EMBO) (nr projektu **7862**). W trakcie stażu wzbogaciłam swój warsztat laboratoryjny z zakresu amplifikacji i analiz markerów molekularnych. Poznałam również nowe techniki biologii molekularnej i nauczyłam się prowadzić hodowlę laboratoryjną *B. schaefferi*. Zwieńczeniem zrealizowanych badań jest publikacja wchodząca w skład mojego głównego osiągnięcia, tj. **Mioduchowskiej i in. (2023)** (pozostałe otrzymane wyniki zostaną niebawem również opublikowane). Ponadto w trakcie stażu brałam również udział w badaniu zróżnicowania genetycznego *Branchinecta ferox* (Milne-Edwards, 1840) i *B. orientalis* (Sars, 1901). Wyniki zostały opublikowane w pracy **Lukić i in. (2021)**.

Brałam również udział w badaniu procesu kolonizacji Jaskini Szmaragdowej (Wyżyna Krakowsko-Częstochowska) przez organizmy bezkręgowce (**Kur i in., 2016a**) oraz w analizie dystrybucji widłonogów Copepoda w różnych podziemnych siedliskach w południowych rejonach Polski, m.in. w jaskiniach i studniach (**Kur i in., 2020**).

W sumie wyniki z zakresu analiz genetycznych Crustacea zostały zaprezentowane na siedmiu krajowych i pięciu międzynarodowych konferencjach naukowych (szczegółowe dane zostały zamieszczone w Załączniku 4) oraz opublikowane w następujących artykułach: **Kur i in., 2016a,b**; **Mioduchowska i in., 2018a,b**; **Lukić i in., 2019**; **Kur i in., 2020**; **Lukić i in., 2021**; **Mioduchowska i in., 2023**. Część uzyskanych wyników, z zakresu identyfikacji bakterii (endo)symbiotycznych związanych z Crustacea, opisałam w ramach mojego głównego osiągnięcia: **Mioduchowska i in., 2018a,b**; **Mioduchowska i in., 2023**.

Tematyka badawcza obejmująca Tardigrada

W 2018 roku rozpoczęłam prace z zakresu taksonomii integratywnej niesporczaków Tardigrada. Zajmuję się częścią molekularną taksonomii integratywnej, tzn. uzyskiwaniem odpowiednich sekwencji mitochondrialnego (COI) i jądrowego DNA (ITS2, 18S rRNA, 28S rRNA), w celu kompleksowego, połączonego z analizami morfologicznymi, opisu badanych gatunków. Przeprowadzam również odpowiednie analizy bioinformatyczne uzyskanych sekwencji nukleotydowych, w tym analizy filogenetyczne badanych gatunków, w celu potwierdzenia lub wykluczenia odpowiedniej klasteryzacji w kładach generowanego drzewa filogenetycznego.

Do tej pory byłam współautorką opisanych 7 nowych gatunków Tardigrada:

- *Macrobotus wandae* Kayastha, Berdi, Mioduchowska, Gawlak, Łukasiewicz, Gołdyn & Kaczmarek, 2020 z Nepalu (**Kayastha i in., 2020a**),
- *Richtersius ziemowiti* Kayastha, Berdi, Mioduchowska, Gawlak, Łukasiewicz, Gołdyn, Jędrzejewski & Kaczmarek, 2020 z Nepalu (**Kayastha i in., 2020b**),
- *Macrobotus porifini* Kuzdrowska, Mioduchowska, Gawlak, Bartylak, A. Kepel, M. Kepel & Kaczmarek, 2021 z Madagaskaru (**Kuzdrowska i in., 2021**),
- *Echiniscoides ritavargasae* Bartels, Fontoura, Mioduchowska & Kaczmarek, 2021 z Kostaryki (**Bartels i in., 2021**),
- *Macrobotus birendrai* Kayastha, Roszkowska, Mioduchowska, Gawlak & Kaczmarek, 2021 i *Bryodelphax mareki* Kayastha, Roszkowska, Mioduchowska, Gawlak & Kaczmarek, 2021 z Kanady (**Kayastha i in., 2021**),
- *Macrobotus kosmali* Kayastha, Mioduchowska, Gawlak, Sługocki, Araújo, Gonçalves & Kaczmarek, 2023 z Madery (Portugalia) (**Kayastha i in., 2023a**).

Ponadto szereg nowych gatunków, opisanych już przeze mnie na poziomie genetycznych, niebawem zostanie również opublikowanych.

Poza opisywaniem nowych gatunków, mam również swój udział w redeskrypcji opisanych już gatunków:

- *Dastychius improvisus* (Dastych, 1984) z Antarktydy (**Mioduchowska i in., 2021a**);
- *Diploechiniscus oihonnae* (Richters, 1903) z Norwegii (**Kaczmarek i in., 2021**);
- *Minibiotus intermedius* (Plate, 1888) z Niemiec (**Kaczmarek i in., 2022a**);

- *Echiniscus quadrispinosus quadrispinosus* Richters, 1902 z Niemiec (Kaczmarek i in., 2022b).

Prowadziłam również badania dotyczące poziomu zróżnicowania genetycznego gatunku kosmopolitycznego jakim jest *Paramacrobiotus fairbanksi* Schill, Förster, Dandekar & Wolf, 2010 (Kaczmarek i in., 2020a) oraz innych gatunków z rodzaju *Paramacrobiotus* (Eutardigrada: Macrobiotidae) (Kayastha i in., 2023b). Pozostałe publikacje z zakresu identyfikacji bakterii (endo)symbiotycznych związanych z Tardigrada, opisałam w ramach mojego głównego osiągnięcia (Kaczmarek i in., 2020b; Mioduchowska i in., 2021b; Mioduchowska i in., 2023). W sumie wyniki z zakresu analiz genetycznych Tardigrada zostały opublikowane we wspomnianych powyżej 15 artykułach naukowych i zaprezentowane na czterech międzynarodowych i jednej krajowej konferencji naukowej (szczegółowe dane zostały zamieszczone w Załączniku 4).

Nurt badań związany z organizmami morskimi

Moje zainteresowania naukowe obecnie są również skoncentrowane na organizmach morskich. W latach 2019–2021 zrealizowałam staż podoktorski na stanowisku adiunkta naukowego (*post-doc*, etat badawczy) w Zakładzie Badań Planktonu Morskiego Instytutu Oceanografii na Wydziale Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego w ramach projektu OPUS (finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki) kierowanego przez dr hab. Agatę Weydmann-Zwolicką, prof. UG; tytuł projektu: „HIDEA – Hidden diversity of plankton in the European Arctic”; numer projektu: UMO-2017/27/B/NZ8/01056. Głównym celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu zmian klimatu i tzw. atlantyfikacji Arktyki na bioróżnorodność bakterioplanktonu, zooplanktonu i fitoplanktonu, a także na funkcjonowanie pelagicznej sieci troficznej na obszarze oddziaływania Prądu Zachodniospitsbergeńskiego. Próby zostały pobrane z rejonów Morza Norweskiego, Grenlandzkiego oraz Oceanu Arktycznego podczas trzech rejsów naukowych (2019–2021) statkiem badawczym *Oceania* (IOPAN). Wyniki badań zostały zaprezentowane na dwóch międzynarodowych konferencjach naukowych. Wstępne wyniki dotyczące procedur laboratoryjnych i bioinformatycznych badanego morskiego mikrobiomu zostały opublikowane w pracy Mioduchowskiej i in. (2022). Pozostałe publikacje są w recenzji i w trakcie przygotowania.

W 2020 roku, w trakcie realizacji stażu podoktorskiego, odbyłam szkolenie zorganizowane przez Physalia pt. „16S/ITS metabarcoding of microbial communities”. Natomiast w latach 2020-2021 brałam udział w trzech rejsach naukowo-badawczych, które

odbyły się specjalistycznym statkiem *Oceanograf* w rejonie Zatoki Gdańskiej. Celem odbytych rejsów było pobranie próbek planktonowych do analizy ich zróżnicowania genetycznego.

Dzięki realizacji stażu podoktorskiego znacząco poszerzyłam swój warsztat laboratoryjny oraz zdobyłam nowe umiejętności z zakresu analiz bioinformatycznych metadanych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania NGS. Nauczyłam się również technik poboru prób przy użyciu specjalistycznego sprzętu znajdującego się na statku badawczym *Oceanograf*. Ponadto nowe umiejętności umożliwiły mi zostanie członkinią „*MetaZooGene-ICE research group*”, w ramach nawiązanej współpracy z prof. Ann Bucklin z Department of Marine Sciences, University of Connecticut, USA. W ramach współpracy zostały przeprowadzone badania and optymalizacją procedur laboratoryjnych dotyczących metabarkodingu zooplanktonu morskiego (publikacja w przygotowaniu).

Opublikowałam następujące publikacje z afiliacją Zakładu Badań Planktonu Morskiego, Instytutu Oceanografii, Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego: **Kaczmarek i in., 2020a; Kayastha i in., 2020a,b; Kilikowska i in., 2020; Kur i in., 2020; Kur i in., 2021; Bartels i in., 2021; Kaczmarek i in., 2021; Kayastha i in., 2021; Kuzdrowska i in., 2021; Lukić i in., 2021; Mioduchowska i in., 2021a,b; Wojtasik i in., 2021; Kaczmarek i in., 2022a; Mioduchowska i in., 2022; Mioduchowska i in., 2023.**

W latach 2021–2022 zrealizowałam kolejny **staż podoktorski** na stanowisku adiunkta naukowego (*post-doc*, etat badawczy) w **Katedrze Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego** w ramach projektu OPUS (finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki) kierowanego przez prof. dr hab. Magdalenę Błazewicz; tytuł projektu: „Biodiversity Patterns and Scale: the case of Peracarids Crustacea from south-eastern Australia BIOPASS”; numer projektu: **UMO-2018/31/B/NZ8/03198**. W ramach stażu badałam różnorodność genetyczną skorupiaków morskich Tanaidacea pobranych u wybrzeży Australii. Ponadto przeprowadziłam analizy mikrobiomu wybranych gatunków Tanaidacea i zidentyfikowałam nieopisany do tej pory pasożytniczy gatunek orzęska Ciliophora związany z jednym z gatunków Tanaidacea (w tym celu zaprojektowałam specyficzne startery). Dzięki zrealizowanym badaniom poszerzyłam swoją wiedzę i warsztat laboratoryjny, wzbogacając go o zastosowane nowe markery molekularne. Poznałam również bardzo rzadką i trudną w badaniach grupę taksonomiczną jaką są Tanaidacea i zoptymalizowałam niektóre z procedur laboratoryjnych. Obecnie publikacje z uzyskanych wyników są w trakcie przygotowywania.

Opublikowałam następujące publikacje z afiliacją Katedry Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego: **Kur i in., 2021; Lukić i in., 2021; Mioduchowska i in., 2021b; Kaczmarek i in., 2022a; Mioduchowska i in., 2023.**

Podsumowanie dotychczasowych osiągnięć naukowych

- Badania prowadziłam w ramach dziewięciu projektów finansowanych w wyniku konkursów ze źródeł zewnętrznych oraz dziesięć projektów finansowanych w wyniku konkursów Uniwersytetu Gdańskiego. Obecnie realizuję dwa projekty finansowane w wyniku konkursów ze źródeł zewnętrznych.
- Zrealizowałam trzy staże podoktorskie w trzech instytucjach, w tym w jednej zagranicznej.
- Byłam współautorem 24 wystąpień (prezentacja lub poster) na konferencjach międzynarodowych i 38 krajowych (prezentacja lub poster).
- Wyniki badań zostały opublikowane w 38 publikacjach naukowych.
- Sumaryczny Impact Factor (IF) wszystkich opublikowanych prac wynosi: 73,594 (biorąc pod uwagę rok opublikowania publikacji).
- Całkowita liczba punktów MNiSW/MEiN wynosi: 2472 (wg punktacji przyznanej w roku opublikowania publikacji) / 3110 (wg najnowszej punktacji MEiN, 17 lipca 2023).
- Całkowita liczba cytacji wszystkich publikacji wynosi: wg Google Scholar: 418, wg Scopus: 258, wg Web of Science Core Collection: 241.
- Mój indeks Hirsha wynosi: wg Google Scholar: 11, wg Scopus: 9, wg Web of Science Core Collection: 8.

Szczegółowe informacje zawarte są w Załączniku 4.

Plany na przyszłość

W 2022 roku otrzymałam finansowanie z Narodowego Centrum Nauki (konkurs SONATA 17) na realizację projektu „Let’s dry up and survive together”: is anhydrobiosis in water bears (Tardigrades) modulated by a specific microbiome community and does it depend on bacteria that survive desiccation together with them?” (nr **2021/43/D/NZ8/00344**, kierownik projektu). Rok wcześniej otrzymałam finansowanie w ramach programu UGrants-first na Uniwersytecie Gdańskim (nr **1220/146/2021**), które stanowiło wsparcie w przygotowaniu powyższego grantu. Mechanizmy umożliwiające niesporczakom przetrwanie w stanie

anhydrobiozy (stan odwodnienia, w którym Tardigrada tracą ponad 90% wody i potrafią przetrwać do kilkanastu lat) nie są wystarczająco poznane. Do tej pory nikt nie zbadał, czy tę zdolność mogą zawdzięczać specyficznemu mikrobiomowi zasiedlającemu ich organizm i które bakterie mogą potencjalnie odgrywać w tym procesie istotną rolę. Celem niniejszego projektu jest kompleksowa analiza mikrobiomu na różnych etapach rozwoju Tardigrada, tj. jaja oraz osobniki dorosłe przed, w trakcie i po anhydrobiozie. Wgląd w profil mikrobiomu zostanie zrealizowany na drodze sekwencjonowania NGS. Aby potwierdzić rolę bakterii w anhydrobiozie niesporczaków, zostanie przeprowadzony również eksperyment, w którym zostaną wymienione mikrobiomy między gatunkami niesporczaków mającymi zdolności anhydrobiotyczne, a takimi, u których nie stwierdza się tego zjawiska. Tym samym, zgodnie z postawioną hipotezą, na skutek wymiany mikrobiomu, niesporczaki mogłyby utracić lub zyskać zdolność do anhydrobiozy. Eksperyment zostanie zbadany na drodze metagenomiki shotgun mikrobiomu. Jeśli hipoteza o istotnej roli specyficznych bakterii w anhydrobiozie Tardigrada zostanie potwierdzona, badania będą miały charakter przełomowy w zrozumieniu tego zjawiska.

Literatura

- Bartels P.J., Fontoura P., Nelson D.R., Orozco-Cubero S., Mioduchowska M., Gawlak M., et al. 2021. A trans-isthmus survey of marine tardigrades from Costa Rica, Central America with descriptions of seven new species. *Marine Biology Research*, 17(2): 120–166.
- Burzyński A., Soroka M., Mioduchowska M., Kaczmarczyk A., Sell J. 2017. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of *Unio crassus*: mitochondrial molecular clock and the over confidence of molecular dating. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107: 605–608.
- Douda K., Sell J., Kubíková-Peláková L., Horký P., Kaczmarczyk A., Mioduchowska M. 2014. Host compatibility as a critical factor in management unit recognition: population level differences in a mussel-fish relationship. *Journal of Applied Ecology*, 51: 1085–1095.
- Kaczmarek Ł., Mioduchowska M., Kačarević U., Kubska K., Parnikoza I., Gołdyn B., et al. 2020a. New records of Antarctic Tardigrada with comments of the *Paramacrobiotus fairbanksi* Schill, Förster, Dandekar & Wolf, 2010. *Diversity*, 12: 108.
- Kaczmarek Ł., Roszkowska M., Poprawa I., Janelt K., Kmita H., Gawlak M., et al. 2020b. Integrative description of bisexual *Paramacrobiotus experimentalis* sp. nov. (Macrobiotidae) from republic of Madagascar (Africa) with microbiome analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 145: 106730.
- Kaczmarek Ł., Kayastha P., Gawlak M., Mioduchowska M., Roszkowska R. 2021. An integrative description of the *Diploechiniscus oihonnae* (Richters, 1903) population from the type locality in Merok (Norway). *Zootaxa*, 4964 (1): 083–102.
- Kaczmarek Ł., Kayastha P., Roszkowska M., Gawlak M., Mioduchowska M. 2022a. Integrative redescription of the *Minibiotus intermedius* (Plate, 1888) – the type species of the genus *Minibiotus* R.O. Schuster, 1980. *Diversity*, 14(5): 356.
- Kaczmarek Ł., Kayastha P., Gawlak M., Mioduchowska M., Roszkowska M. 2022b. An integrative redescription of *Echiniscus quadrispinosus quadrispinosus* Richters, 1902 (Heterotardigrada; Echiniscidae) from the terra typica in Taunus Mountain Range (Europe; Germany). *European Journal of Taxonomy*, 823: 102–124.
- Kayastha P., Berdi D., Mioduchowska M., Gawlak M., Łukasiewicz A., Gołdyn B., et al. 2020a. Some tardigrades from Nepal (Asia) with integrative description of *Macrobiotus wandae* sp. nov. (Macrobiotidae; *hufelandi* group). *Annales Zoologici*, 70(1): 121–142.

- Kayastha P., Berdi D., Mioduchowska M., Gawlak M., Łukasiewicz A., Gołdyn B., et al. 2020b. Description and molecular characterization of *Richtersius ziemowiti* sp. nov. (Richtersiidae) from Nepal (Asia) with evidence of heterozygous point mutation events in the 28S rRNA. *Annales Zoologici*, 70(3): 381–396.
- Kayastha P., Roszkowska M., Mioduchowska M., Gawlak M., Kaczmarek Ł. 2021. Integrative descriptions of two new tardigrade species along with the new record of *Mesobiotus skorackii* Kaczmarek et al., 2018 from Canada. *Diversity*, 13(8): 394.
- Kayastha P., Mioduchowska M., Gawlak M., Sługocki Ł., Araújo R., Gonçalves Silva J.J., et al. 2023a. Integrative description of *Macrobotus kosmali* sp. nov. (*hufelandi* group) from the Island of Madeira (Portugal). *The European Zoological Journal*, 90(1): 126–138.
- Kayastha P., Stec D., Sługocki Ł., Gawlak M., Mioduchowska M., Kaczmarek Ł. 2023b. Integrative taxonomy reveals new, widely distributed tardigrade species of the genus *Paramacrobotus* (Eutardigrada: Macrobiotidae). *Scientific Reports*, 13: 2196.
- Kilikowska A., Mioduchowska M., Wysocka A., Kaczmarczyk-Ziemia A., Rychlińska J., Zając K., et al. 2020. The patterns and puzzles of genetic diversity of endangered freshwater mussel *Unio crassus* Philipsson, 1788 populations from Vistula and Neman drainages (eastern central Europe). *LIFE*, 10: 119.
- Kur J., Radwański J.M., Mioduchowska M. 2016a. Investigation of the fauna in the Szmaragdowa/Szeptunów Cave in Poland: an example of short time colonization process. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 59(2): 153–162.
- Kur J., Mioduchowska M., Petković M. 2016b. Trying to solve current issues with invertebrate taxonomy – the conceptual web-based application. *World Scientific News*, 57: 664–673.
- Kur J., Mioduchowska M., Kilikowska A. 2020. Distribution of cyclopoid copepods in different subterranean habitats (southern Poland). *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 49(3): 255–266.
- Kur J., Igliński P., Galant G., Mioduchowska M. 2021. Biofouling on an offshore rig in the Baltic Sea. *Polish Hyperbaric Research, Journal of Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society*, 75(2): 41–56.
- Kuzdrowska K., Mioduchowska M., Gawlak M., Bartylak T., Kepel A., Kepel M., et al. 2021. Integrative description of *Macrobotus porifini* sp. nov. (Macrobiotidae) from Madagascar and its phylogenetic position within the *hufelandi* group. *European Zoological Journal*, 88(1): 375–389.
- Lukić D., Waterkeyn A., Rabet N., Mioduchowska M., Geudens B., Vanschoenwinkel B., et al. 2019. High genetic variation and phylogeographic relations among Palearctic fairy shrimp populations reflect persistence in multiple Southern refugia during Pleistocene ice ages and postglacial colonization. *Freshwater Biology*, 64(11): 1896–1907.
- Lukić D., Pinceel T., Marrone F., Mioduchowska M., Vad C.F., Brendonck L., et al. 2021. Pleistocene allopatric differentiation followed by recent range expansion explains the distribution and molecular diversity of two congeneric crustacean species in the Palaearctic. *Scientific Reports*, 11: 22866.
- Mioduchowska M., Wojtasik B. 2009. Copepoda – Cyclopoida of water bodies of the Coast of Gdańsk. *Teka Komisja of Protection and Formation of Natural Environment – OL PAN*, 6: 189–199.
- Mioduchowska M., Kaczmarczyk A., Zając K., Zając T., Sell J. 2016. Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in somatic tissues of the endangered freshwater mussel *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae): implications for sex identification and phylogeographical studies. *Journal of Experimental Zoology Part A*, 325: 610–625.
- Mioduchowska M., Czyż M.J., Gołdyn B., Kilikowska A., Namiotko T., Pinceel T., et al. 2018a. Detection of bacterial endosymbionts in freshwater crustaceans: the applicability of non-degenerate primers to amplify the bacterial 16S rRNA gene. *PeerJ*, 6: e6039.
- Mioduchowska M., Czyż M.J., Gołdyn B., Kur J., Sell J. 2018b. Instances of erroneous DNA barcoding of metazoan invertebrates: are universal *cox1* gene primers too “universal”? *PLoS ONE*, 13(6): e0199609.
- Mioduchowska M., Gołdyn B., Czyż J.M., Namiotko T., Namiotko L., Kur J., et al. 2018c. Notes on genetic uniformity in the fairy shrimp *Branchipus schaefferi* Fischer, 1834 (Branchiopoda, Anostraca) from Poland. *North-Western Journal of Zoology*, 14(1): 127–129.
- Mioduchowska M., Zając K., Bartoszek K., Madanecki P., Kur J., Zając T. 2020a. 16S rRNA-based metagenomic analysis of the gut microbial community associated with the DUI species *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(2): 615–623.
- Mioduchowska M., Zając K., Zając T., Sell J. 2020b. *Wolbachia* and *Cardinium* infection found in threatened unionid species: a new concern for conservation of freshwater mussels? *Conservation Genetics*, 21: 381–386.
- Mioduchowska M., Kačarević U., Miamin V., Giginiak Y., Parnikoza I., Roszkowska M., et al. 2021a. Redescription of Antarctic eutardigrade *Dastychius improvisus* (Dastych, 1984) and some remarks on phylogenetic relationships within Isohypsibioidea. *The European Zoological Journal*, 88(1): 117–131.
- Mioduchowska M., Nitkiewicz B., Roszkowska M., Kačarević U., Madanecki P., Pinceel T., Namiotko T., Gołdyn B., et al. 2021b. Taxonomic classification of the bacterial endosymbiont *Wolbachia* based on next-

- generation sequencing: is there molecular evidence for its presence in tardigrades? *Genome*, 64(10): 951–958.
- Mioduchowska M., Iglíkowska A., Jastrzębski J.P., Kaczorowska A.-K., Kotlarska E., Trzebny A., et al. 2022. Challenges of Comparing Marine Microbiome Community Composition Data Provided by Different Commercial Laboratories and Classification Databases. *Water*, 14, 3855.
- Mioduchowska M., Konecka E., Gołdyn B., Pinceel T., Brendonck L., Lukić D., et al. 2023. Playing peekaboo with a master manipulator: metagenetic detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* supergroups in freshwater invertebrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 9400.
- Sell J., Mioduchowska M., Kaczmarczyk A., Szymańczak R. 2013. Identification and characterization of the first microsatellite loci for the thick-shelled river mussel *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Experimental Zoology*, 319A: 113–116.
- Stolarska M., Wojtasik B. 2008. The impact of phosphogips heap on meiobenthos assemblages (Pomerania, Poland). *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, sec. C*, LXIII(2): 87–95.
- Wojtasik B., Rodzik J., Stachyra P., Mioduchowska M. 2009. Variety of meiobenthic assemblages against the background of environment in selected freshwater reservoirs of Central Roztocze region (SE Poland). *Teka Komisji Protection and Formation of Natural Environment – OL PAN*, 6: 424–431.
- Wojtasik B., Mioduchowska M. 2010. Meiobenthic assemblages inhabiting small freshwater reservoirs (Pomerania, Poland). *Environmental Protection and Natural Resources*, 45: 46–62.
- Wojtasik B., Kijewska A., Mioduchowska M., Miłkuła B., Sell J. 2021. Temporal isolation between two strongly differentiated stocks of the Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides* Walbaum 1792) from the Western Barents Sea region. *Polish Polar Research*, 43 (2): 115–136.
- Zouros E. 2013. Biparental inheritance through uniparental transmission: the doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *International Journal of Evolutionary Biology*, 40:1–31.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Prowadzenie zajęć dydaktycznych w Katedrze Genetyki Ewolucyjnej i Biosystematyki, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (z uwagi na staże podoktorskie, które realizowałam w latach 04.2019-07.2022, w tym okresie nie prowadziłam zajęć dydaktycznych):

1) Przedmioty prowadzone na kierunku Biologia:

- Genetyka (ćwiczenia laboratoryjne);
- Zawiłości procesów determinacji płci (cykl autorskich fakultatywnych wykładów);
- Współczesne metody badawcze w taksonomii zwierząt (zajęcia bioinformatyczne);
- Biologia molekularna (wykład, udział);
- Genetyka (wykład, udział);
- Pracownia specjalnościowa;
- Pracownia dyplomowa.

2) Przedmioty prowadzone na kierunku Biologia Medyczna:

- Podstawy genetyki (ćwiczenia laboratoryjne);
- Zawiłości procesów determinacji płci (cykl autorskich fakultatywnych wykładów);

- Pracownia specjalnościowa;
 - Pracownia dyplomowa.
- 3) Przedmioty prowadzone na kierunku Genetyka i Biologia Eksperymentalna:
 - Pracownia specjalnościowa;
 - Pracownia dyplomowa.
 - 4) Przedmioty prowadzone na kierunku Ochrona Zasobów Przyrody:
 - Ekologia Molekularna (cykl autorskich obligatoryjnych wykładów).
 - 5) Przedmioty prowadzone na kierunku Bioinformatyka:
 - Geny i populacje w czasie i przestrzeni (zajęcia bioinformatyczne).
 - 6) W latach 2009-2016 byłam zaangażowana w pomoc w opiece laboratoryjnej i merytorycznej nad przygotowaniem magisterskich prac dyplomowych (w sumie 12 prac magisterskich) w ramach studenckiej Pracowni Półdiennej.
 - 7) Od 2016 roku: promotor czterech prac licencjackich i czterech prac magisterskich.
 - 8) Od 2023 roku: promotor pomocniczy pracy doktorskiej Pani magister Pushpalaty Kayasthy realizowanej w Zakładzie Taksonomii i Ekologii Zwierząt, Wydziału Biologii na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł pracy doktorskiej: „The genus *Paramacrobotus* (Tardigrada): integrative taxonomy, biogeography and effects of stress factors on the selected species”. Część obejmująca zagadnienia związane z genetyką niesporczaków z rodzaju *Paramacrobotus*, realizowana jest pod moją opieką.

Inna praktyka dydaktyczna:

- 1) Opiekun Studenckiego Koła Genetycznego, Uniwersytet Gdański (2014 – 2015);
- 2) Opiekun Studenckiego Koła Naukowego Hydrobiologii i Ochrony Wód, Uniwersytet Gdański (2015 – 2019);
- 3) Przeprowadzenie warsztatów dla członków Koła Naukowego OIKOS z Olsztyna w ramach badań hydrobiologicznych realizowanych przez Studenckie Koło Naukowe Hydrobiologii i Ochrony Wód UG, którego byłam Opiekunem Naukowym (16-17.08.2015);
- 4) Koordynowanie badań laboratoryjnych przeprowadzonych w ramach Olimpiady Biologicznej przez uczennicę z Akademickiego Liceum Ogólnokształcącego „Lingwista” w Gdańsku (rok akademicki 2015/2016);
- 5) Wykład wygłoszony w Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation, KU Leuven, Belgium; tytuł: „Coevolution of the endangered fairy shrimp *Branchipus schaefferi*

(Brianthropoda, Anostraca) and intracellular endosymbiont *Wolbachia* bacteria” (10.05.2019).

Działalność organizacyjna:

- 1) Przewodnicząca Studenckiego Koła Naukowego Hydrobiologii i Ochrony Wód Uniwersytetu Gdańskiego (2006 – 2009);
- 2) Przedstawicielka Samorządu Doktorantów w Odwoławczej Komisji Dyscyplinarnej do spraw Doktorantów (2010 – 2012);
- 3) Członkini Wydziałowej Komisji Stypendialnej Uniwersytetu Gdańskiego (2011 – 2014);
- 4) Skarbnik Rady Wydziału Doktorantów Uniwersytetu Gdańskiego (2012 – 2014).

Popularyzacja nauki:

- 1) Udział w organizowaniu studenckiego obozu naukowego w Niedzicy (14-20.07.2007). Współpraca z Katedrą Genetyki i Cytologii UG oraz z Zakładem Geografii Pojezierzy UG;
 - 2) Udział w dziewięciu edycjach Bałtyckiego Festiwalu Naukowego (lata: 2007-2017) oraz IX, XII Pikniku Naukowym (lata: 2008 i 2011);
 - 3) Przygotowanie prezentacji dotyczącej działalności Studenckiego Koła Naukowego Hydrobiologii i Ochrony Wód UG (którego byłam przewodniczącą) do Gazety Uniwersyteckiej Uniwersytetu Gdańskiego (04.2009);
 - 4) Warsztaty w ramach Uniwersalnej Strefy Nauki w Galerii Bałtyckiej (lata: 2010; 2015; 2016);
 - 5) Prowadzenie warsztatów edukacyjnych dla szkół ponadgimnazjalnych pt. „Poznaj pracę biologa”. Temat przeprowadzonych warsztatów: „Dzielisz się z nami swoimi owocami – genetyczna modelka” (lata: 2010-2019);
 - 6) Przygotowanie i prowadzenie warsztatów w ramach Nocy Biologów (lata: 2012; 2014-2018-2019, 2021);
 - 7) X Piknik „Bioróżnorodność – poznaj, by zachować” w parku im. R. Reagana w Gdańsku (19.05.2018) oraz V Pikniku „Wyspa Przyrodników” w Stacji Biologicznej UG na Wyspie Sobieszewskiej (07.07.2018).
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Stypendia naukowe:

- 1) Stypendium Naukowe przyznawane przez Uniwersytet Gdański dla najlepszych studentów w roku akademickim: 2005-2009;
- 2) Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w roku akademickim 2008/2009;
- 3) Stypendium Naukowe przyznawane przez Uniwersytet Gdański dla najlepszych doktorantów w roku akademickim: 2009-2015;
- 4) Stypendium Doktoranckie z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w roku akademickim: 2011-2015;
- 5) Stypendium przyznane w roku akademickim 2014 w ramach projektu: „Kształcimy najlepszych – kompleksowy program rozwoju doktorantów, młodych doktorów i akademickiej kadry dydaktycznej Uniwersytetu Gdańskiego” Komponentu „Stypendia i szkolenia dla doktorantów i młodych doktorów”. Projekt realizowany jest w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki Priorytetu IV, Działania 4.1, Poddziałania 4.1.1. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego;
- 6) Stypendium otrzymane w 2019 roku od EMBO (European Molecular Biology Organization), w ramach Short-Term Fellowship na przeprowadzenie badań w Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation, KU Leuven, Belgium.

Nagrody, wyróżnienia:

- 1) Nominacja Rektora Uniwersytetu Gdańskiego w konkursie o Nagrodę „Czerwonej Róży” dla Najlepszego Koła Naukowego (Gdańsk, 18.05.2009);
- 2) Wyróżnienie w Konkursie na Najlepszego Studenta RP - Studencki Nobel 2009;
- 3) W uznaniu za wyróżniające osiągnięcia w nauce, podczas studiowania na kierunku Biologia otrzymałam Dyplom dla Absolwenta przyznany w imieniu Władz Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego (10.2010);
- 4) Nagroda II stopnia za poster prezentowany podczas IV Polskiego Kongresu Genetyki (Poznań, 13.09.2013);
- 5) Nagroda za najlepsze wystąpienie podczas XXXII Seminarium Malakologicznego (Spała, 13-15.10.2016);
- 6) Publikacja 1 (Mioduchowska i in., 2018a) , wchodząca w skład cyklu siedmiu publikacji stanowiących moje osiągnięcie naukowe, znalazła się w 10% najczęściej cytowanych publikacji opublikowanych w czasopiśmie PlosOne w 2018 roku;

- 7) W 2020 roku otrzymałam nominację od światowej sławy malakologów – dr Manuela Lopes-Limy i dr hab. Tadeusza Zająca, prof. IOP PAN – do nagrody „Diversity Young Investigator Award”;
- 8) Indywidualna Nagroda Rektora II stopnia 2021 za cykl publikacji: „Zastosowanie taksonomii integratywnej i molekularnej w identyfikacji bakterii symbiotycznych wodnych bezkręgowców”.

Recenzje manuskryptów w czasopismach naukowych:

Animals; Biologia, Section Zoology; Current Microbiology; Diversity; Hydrobiologia; International Journal of Molecular Science; Journal of Invertebrate Pathology; Limnology; Marine Biodiversity; Marine Biology; Molecular Ecology; Molecular Ecology Resources; PeerJ; PlosOne; Science of the Total Environment; Scientific Reports; Systematic Entomology.

Redakcje, komitety organizacyjne i towarzystwa naukowe:

- 1) Od 09.2019: jestem członkinią Management Committee (MC) międzynarodowej akcji COST – European Cooperation in Science & Technology w ramach projektu: „Conservation of freshwater mussels: a pan-European approach”. Nominacja MC została przyznana w 2019 roku przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego;
- 2) W dniach 19-22.07.2019: współorganizowałam międzynarodową konferencję 9th European Ostracodologists Meeting (Gdańsk);
- 3) Od 01.2021 do 07.2023: pełniłam funkcję Guest Editor w czasopiśmie Diversity wydania specjalnego pt. „Bacterial Symbionts of Invertebrates: Diversity, Transmission and Impacts”
(https://www.mdpi.com/journal/diversity/special_issues/bacterial_symbionts_invertebrates).

Szczegółowe informacje dotyczące pozostałych osiągnięć naukowych, w tym wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych został zamieszczony w Załączniku 4.

Monika Mioduchowska
(podpis wnioskodawcy)