

Olsztyn, 04.06.2018

Prof. dr hab. Alicja Boroń
Katedra Zoologii, Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
a-mail: alibo@uwm.edu.pl

Ocena
rozprawy doktorskiej Pani mgr Oliwii Michalik, zatytułowanej
„Wykorzystanie procesu androgenozy do indukcji rozwoju haploidów i podwojonych
haploidów u wybranych gatunków ryb łososiowatych (Salmonidae)”
ang. „Application of androgenesis process to induce haploid and doubled haploid
development in several salmonid fish (Salmonidae) species”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest oparta na czterech oryginalnych współautorskich pracach, które opublikowane zostały jako artykuły naukowe (Michalik O. *et al.* 2014, 2015, 2016, 2017) w czasopismach dobrze dobranych pod względem profilu naukowego i znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) i na liście A MNiSW. Łączna liczba punktów według listy MNiSW w zależności od roku wydania lub roku 2017 wynosi 100 lub 115, a łączny współczynnik wpływu, IF = 5,449. Treść umieszczonych na końcu rozprawy oświadczeń wszystkich współautorów wskazuje, że Doktorantka uczestniczyła zarówno w badaniach, których wyniki zawarto w przedmiotowych pracach, jak i w opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów. O dużym udziale Doktorantki w przygotowaniu tych prac najlepiej świadczy fakt, że w każdej jest autorem pierwszym.

Oceniając pracę w sposób formalny stwierdzić należy, że **tytuł rozprawy** jest zgodny z zawartą w niej treścią, a przedłożone **Streszczenie** dość dobrze oddaje zawartość pracy doktorskiej.

Odnosząc się do Streszczenia pracy doktorskiej to zostało ono napisane w języku polskim i angielskim, bez wydzielenia podrozdziałów i zajmuje łącznie jedynie pięć stron (nie licząc kopii artykułów), co, jak przypuszczam, jest zgodne z wytycznymi w tym zakresie zaakceptowanymi przez Radę Wydziału Biologii UG.

Początek Streszczenia jest bardzo krótkim wprowadzeniem w problem badawczy i zaskakująco nie zawiera przeglądu literatury bezpośrednio związanej z tematyką pracy. Przegląd taki mógłby wskazywać jednoznacznie na uzasadnienie podjętej tematyki badawczej. Doktorantka rozpoczęła od krótkiej charakterystyki klonalnych sposobów rozmnażania się zwierząt, jakimi są gynogeneza i androgeneza, podając przykłady znane w naturze. Wskazała na możliwość indukowania obu tych procesów w warunkach kontrolowanych i podała metody jakie służą do indukowania haploidalnych i podwojonych haploidalnych zarodków gyno- i androgenetycznych. Obiektem zainteresowania Doktorantki stały się warunki w jakich przebiega proces androgenozy, mające bezpośredni wpływ na jego niską skuteczność/efektywność.

W dalszej części Streszczenie zawiera krótkie opisy celów i wyników zawartych w poszczególnych pracach, składających się na rozprawę doktorską. Doktorantka i współpracownicy postawili sobie za cel uzyskanie żywotnego androgenetycznego potomstwa wybranych gatunków ryb łososiowatych, a eksperymenty indukowanej

androgenozy posłużyły do realizacji kilku celów pośrednich, takich jak: a/ ocena skuteczności wykorzystania w procesie androgenozy gamet blisko spokrewnionych gatunków ryb łososiowatych oraz także mieszańców tych ryb, b/ określenie w jakim stopniu warunki przeprowadzania procesu androgenozy, czyli naświetlanie komórek jajowych promieniowaniem jonizującym i stosowany szok ciśnieniowy, wpływają na śmiertelność androgenotów, c/ określenie wpływu chromosomów płci na przeżywalność androgenotów haploidalnych i diploidalnych oraz, d/ ocena procesu dyferencjacji płci i rozwoju gonad osobników androgenetycznych obu płci, które opisano w poszczególnych pracach składających się na rozprawę doktorską.

Do weryfikacji skuteczności i efektywności przeprowadzanych eksperymentów wybrano i zastosowano odpowiednie techniki biologii molekularnej: a/ markery mikrosatelitarnego DNA do weryfikacji genetycznej klonalności i homozygotyczności uzyskanych gynogenotów i androgenotów, b/ analiza cytogenetyczna do oceny ploidii zarodków, c/ amplifikacja sekwencji DNA typowych dla chromosomu Y pstrąga tęczowego w celu identyfikacji płci.

Streszczenie kończy zwięzłe podsumowanie i interpretacja uzyskanych wyników, w tym ważne omówienie przyczyn niskiej przeżywalności androgenotów.

Oceniam, że Doktorantka trafnie wybrała podjęty w rozprawie oryginalny problem badawczy, a tematyka pracy wpisuje się w nurt światowych badań w zakresie biologii, genetyki i biotechnologii ryb i także obiekty badań zostały dobrze dobrane. Wybrano bowiem gatunki ryb łososiowatych, takie jak: pstrąg źródłany *Salvelinus fontinalis*, palia alpejska *S. alpinus*, pstrąg potokowy *Salmo trutta m. fario* i pstrąg tęczowy *Oncorhynchus mykiss*, które mają bardzo duże znaczenie gospodarcze i podlegają silnej antropopresji, co wraz z ich autopolioidalnym pochodzeniem sprawia, że są stosunkowo częstym obiektem, m.in. badań z zakresu biologii rozrodu ryb.

Odnosząc się do publikacji składających się na rozprawę doktorską, pokrótce je omówię. Każda z prac dotyczy procesu androgenozy, a jedna także gynogenozy (praca 2). Praca 1. zawiera opis wyników badania możliwości wykorzystania komórek jajowych mieszańców pstrąga źródłanego i palii alpejskiej do indukowania w nich rozwoju androgenetycznego pierwszego z wymienionych gatunków. Podstawą podjętych badań był brak możliwości uzyskania takich androgenetycznych osobników przy użyciu jaj pstrąga źródłanego, pomimo że oba te gatunki tworzą płodne mieszańce. Doktorantka uzyskała androgenetyczne homozygotyczne, diploidalne ($2n=84$ chromosomy) potomstwo, w stadium larwy, które rozwinęło się z jaj pstrąga źródłanego i jaj mieszańców wzajemnych tego gatunku i palii alpejskiej, precyzując warunki inaktywacji DNA w jądrach komórek jajowych oraz warunki duplikacji genomu haploidalnych androgenetycznych zygot. Wskazała, strategię „najpierw hybrydyzacja potem indukowanie androgenozy”. Niestety, androgenetyczne osobniki potomne zawierające DNA plemników pstrąga źródłanego, rozwijające się w jajach palii alpejskiej osiągnęły jedynie wczesne stadia zarodkowe. Zdaniem Autorki pracy, mogło to być spowodowane niską jakością jaj, ekspresją homozygotycznych letalnych alleli oraz także manipulacjami, którym poddano jaja i zygoty. Uzyskano natomiast androgenetyczne pstrągi, prawidłowo rozwijające się w jajach tego samego gatunku i w jajach mieszańców.

Praca 2. zawiera opis wyników indukcji gynogenetycznych (ta część nie została w pracy doktorskiej zawarta) i androgenetycznych haploidów (Hs) i podwójnych haploidów (DHs) pstrąga potokowego. Przeżywalność Hs gynogenetycznych zarodków była większa niż

androgenetycznych ale większość z nich rozwijała się tylko do zakończenia odżywiania się zawartością woreczka żółtkowego. Z kolei gynogenetyczne DHs uzyskane w efekcie indukowania rozwoju jaj pstrąga potokowego spermą tego samego gatunku lub pstrąga tęczowego charakteryzujące się $2n$ liczbą chromosomów, rozwijały się podobnie osiągając podobny sukces wylęgania, jak i stadium pierwsze odżywiania się. Podczas gdy, przeżywalność androgenetycznego DHs była znacznie niższa i wśród tych zarodków wykazano wiele haploidów. Doktorantka wywnioskowała, że promieniowanie użyte do inaktywacji DNA jaj zaburza mechanizm odpowiedzialny za podziały komórkowe, co ma wpływ na bruzdkowanie androgenowych zygot. Nie dość skuteczna okazała się także inaktywacji DNA jaj i plemników, ponieważ niektóre z cytogenetycznie analizowanych zarodków gyno- i androgenetycznych zawierały dodatkowe fragmenty chromosomów.

Praca nr 3. zawiera weryfikację hipotezy mówiącej o tym, że niska skuteczność androgenezy może być determinowana płcią zarodków, w przypadku pstrągów związana z efektem wyższej śmiertelności Hs i DHs osobników z chromosomami płci typu Y. Indukowano androgenezę pstrąga tęczowego, którego komórki jajowe z inaktywowanym DNA zapładniano nasieniem samców (XY) i homogametycznych neosamców (XX) o podobnej ruchliwości. Okazało się, że przeżywalność tak uzyskanych haploidów była podobna podczas embriogenezy i zaraz po wylęgu. Podobnie w pracy nr 4. Doktorantka we współpracy dokonała indukowania androgenezy pstrąga tęczowego przy użyciu plemników neo-samców, co nie miało wpływu na przeżycie potomstwa, a co więcej u większości androgenetycznych XX i XY pstrągów obserwowano prawidłowy rozwój gonad. Zaproponowany eksperyment może mieć zdaniem Autorki potencjalne znaczenie w hodowli tego gatunku, m.in. w produkcji homozygotycznych samic do programów hodowlanych lub wyprowadzenia linii klonalnych.

Zarówno w poszczególnych publikacjach, jak i w Streszczeniu Doktorantka zawarła cenne informacje o możliwościach wykorzystania procesu androgenezy oraz androgenetycznych zarodków i wylęgu, m.in. do badań recesywnych alleli, roli genomu ojcowskiego w rozwoju zarodkowym i zależności pomiędzy cytoplazmą oocyta i jądrem plemnika.

Warto podkreślić, że badania do pracy doktorskiej były finansowane w ramach grantu NCN i Grantu Młodego Naukowca.

Analiza treści publikacji składających się na pracę doktorską mgr Oliwii Michalik wskazuje, że cele prowadzonych badań zostały bardzo dobrze i kompletnie sprecyzowane, przyjęto poprawnie sformułowane hipotezy badawcze. Te ostatnie zostały następnie poddane weryfikacji w dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych eksperymentach z użyciem dobrze dobranych narzędzi biologii i biologii molekularnej, które Doktorantka dobrze poznała i umiejętnie zastosowała.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Analiza treści prac wchodzących w skład rozprawy daje podstawy do oceny, że Oliwia Michalik posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie biologia, szczególnie w zakresie genetyki i biotechnologii ryb oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wysoko oceniam jakość merytoryczną prac składających się na pracę doktorską mgr Oliwii Michalik, która została już oceniona przez niezależnych recenzentów kolegium redakcyjnego trzech następujących czasopism: *Reproduction in Domestic Animals*, *Theriogenology* oraz *Folia Biologica* o stosunkowo wysokim współczynniku wpływu (IF) i wymiarze punktowym (wg. MNiSW), wynoszącym odpowiednio, 1,515 i 25/30 pktów, 1,838 i 30/35 pktów oraz 0,581 i 20 pktów.

W tym miejscu, wobec pewnego niedosytu informacji, chciałabym prosić Doktorantkę aby w trakcie obrony pracy: a/ podała przykłady androgenozy występującej naturalnie w przyrodzie i wskazała rolę tego procesu w ewolucji(?) i funkcjonowaniu organizmów, b/ wyjaśniła czy przewożenie komórek jajowych (wiem, że było konieczne!) w celu ich inaktywacji z Zakładu Produkcji Ryb Łososiowatych w Rutkach do Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i następnie z powrotem, mogło mieć wpływ na uzyskane wyniki, c/ omówiła przykłady praktycznego wykorzystania androgenetycznego potomstwa ryb w hodowli, badaniach lub w inny sposób, np. ochronie gatunkowej.

Mam także uwagę porządkową bo bardzo razi mnie stosowanie nazewnictwa będącego nieuprawnionym przeniesieniem z j. angielskiego, które stosuje Autorka wielokrotnie, np. str 10; „...jaj pochodzących od hybryd...”. Nie „hybryd” ale „mieszkańców”.

Podkreślam, że ani niedosyt informacji, ani uwaga porządkowa nie mają wpływu na moją bardzo dobrą ocenę pracy.

W mojej opinii przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania wobec rozpraw doktorskich w obowiązujących przepisach. Stawiam zatem wniosek do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Oliwii Michalik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na złożoność podjętej przez Doktorantkę tematyki badawczej, czyli procesu androgenozy i trudności metodyczne jakie musiała pokonać, a także opublikowanie wyników badań w znanych i cenionych, tematycznie dobranych czasopismach **uwazam, że rozprawa doktorska mgr Oliwii Michalik zasługuje na wyróżnienie.**

Alicja Boroń

