

HR. 15. 06. 2018 l.m

Sopot, 12. 06. 2018

dr hab. inż. Hanna Kalamarz-Kubiak, prof. nadzw. IO PAN
Zakład Genetyki i Biotechnologii Morskiej
Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk
ul. Powstańców Warszawy 55
81-712 Sopot

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Oliwii Michalik

„Wykorzystanie procesu androgenozy do indukcji rozwoju haploidów i podwojonych haploidów u wybranych gatunków ryb łososiowatych (Salmonide)”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w Katedrze Ewolucji Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem prof. nadzw. UG dr hab. inż. Konrada Ocalewicza oraz prof. dr hab. Marka Zientary. Rozprawę stanowią spójnie tematycznie 4 artykuły, opublikowane w latach 2013–2017 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym o sumarycznym IF wynoszącym 5,367 znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Dwie publikacje opublikowano w *Reproduction in Domestic Animals* (IF = 1,4; MNiSzW 30), jedną w *Theriogenology* (IF = 1,986; MNiSzW 35) oraz jedną w *Folia Biologia Kraków* (IF = 0,581; MNiSzW 20). Doktorantka jest zarówno pierwszym autorem, jak i autorem korespondencyjnym we wszystkich przedstawionych publikacjach. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, niemniej jednak z oświadczeń doktorantki oraz współautorów jasno wynika, jaka była jej rola w powstawaniu tych prac. Wkład pracy doktorantki w większości przeprowadzonych doświadczeń polegał na czynnym udziale w przeprowadzeniu procesu indukowanej androgenozy, liczeniu zarodków i larw oraz pobieraniu prób do analiz cytogenetycznych i molekularnych. Ponadto doktorantka wykonała wszystkie analizy

molekularne, część analiz cytogenetycznych oraz analizę statystyczną przeżywalności androgenetycznego potomstwa. Trzeba przyznać, że doktorantka miała nieco utrudnione zadanie, jeśli chodzi o planowanie doświadczeń, wchodząc w nurt badań prowadzonych od ponad 10 lat przez zespół promotora prof. nadzw. UG dr hab. inż. Konrada Ocalewicza. Jednakże dziwi fakt, ograniczonego udziału doktorantki w interpretacji wyników (1 publikacja) oraz pisaniu i przygotowaniu manuskryptów (2 publikacje). Żywię nadzieję, że to jedynie niedopatrzenie w przygotowaniu oświadczeń o współautorstwie. Przedstawione w rozprawie badania były finansowane z dwóch projektów Narodowego Centrum Nauki.

W skład przedstawionej rozprawy doktorskiej mgr Oliwii Michalik wchodzi streszczenie w języku polskim i angielskim towarzyszące publikacjom stanowiącym podstawę tejże rozprawy. Streszczenia te nie wyodrębniają jedynie wkładu pracy doktorantki, ale przedstawiają wyniki badań w świetle wszystkich uzyskanych wyników. Niestety streszczenie w języku polskim jest przygotowane dość niestarannie. Na uwagę zasługuje fakt, że w streszczeniu nie ma wszystkich odnośników literaturowych a doktorantka zarówno wprowadzając w temat jak i dyskutując wyniki, przytacza szereg danych literaturowych niebędących jej autorstwa. W związku z tym w części podsumowującej trudno jest ocenić, które wnioski są autorstwa doktorantki i wynikają bezpośrednio z prowadzonych badań, a które są tylko przypuszczeniami wynikającymi z badań innych naukowców. W streszczeniu w języku polskim, doktorantka używa potocznej terminologii stosowanej w hodowli ryb nie zaś prawidłowego mianownictwa biologicznego dla przykładu; jaja, wylęg pływający. Ponadto doktorantka używa określeń „androgenoty” i „gynogenoty” bez wyjaśnienia na początku streszczenia znaczenia tych określeń. Pewien niedosyt, w przedstawionym streszczeniu, pozostawia brak planów na przyszłość związanych z poprawą skuteczności tej metody.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zastosowanie procesu androgenezy w indukcji rozwoju haploidów i podwojonych haploidów u wybranych gatunków ryb łososiowatych. W celu uzyskania żywotnego androgenetycznego potomstwa wykorzystano gamety pochodzące od blisko spokrewnionych gatunków łososiowatych, pstrąga źródlanego (*Salvelinus fontinalis*) i palii alpejskiej (*Salvelinus alpinus*) oraz ich hybryd. Przeprowadzenie androgenezy międzygatunkowej, gdzie enukleowana ikra jednego gatunku jest zapładniana nasieniem innego gatunku, ciągle przysparza wiele trudności z powodu niskiej wydajności procesu i stanowi nie lada wyzwanie dla badaczy. Aby zwiększyć skuteczność tego procesu zdecydowano się również na wykorzystanie ikry pochodzącej od hybryd gatunków rodzicielskich. Inaktywację genomu jądrowego przeprowadzono naświetlając ikre

promieniowaniem X przy użyciu akceleratora liniowego. Następnie, ikrę naświetloną oraz ikrę kontrolną (niepoddaną naświetlaniu) inseminowano, aby uzyskać haploidalne androgenetyczne potomstwo oraz normalne, diploidalne osobniki potomne. Po inseminacji część naświetlonej ikry poddawano szokowi ciśnieniowemu w celu odtworzenia diploidalnego stanu zarodków. Analizę przeżywalności potomstwa przeprowadzano w czterech etapach; 24 godziny po inseminacji, aby oszacować współczynnik zapłodnienia a potem na etapie pojawienia się pigmentu w oczach zarodków ryb, na etapie wylęgu larw oraz po całkowitej resorpcji woreczka żółtkowego. Analiza odpowiednich markerów mikrosatelitarnego DNA pozwoliła na potwierdzenie dziedziczenia ojcowskiego jądrowego DNA oraz homozygotyczności osobników androgenetycznych. Natomiast skuteczność inaktywacji matczynego jądrowego DNA oraz ploidalność komórek badano za pomocą diagnostyki cytogenetycznej. Wyniki tych badań doktorantka przedstawiła w publikacji „Use of eggs derived from the interspecific charr hybrids to induce androgenetic development of the Brook charr (*Salvelinus fontinalis* Mitchill 1814)”. Okazało się, że prawie wszystkie zarodki powstałe w wyniku androgenozy międzygatunkowej obumarły na wczesnym etapie embriogenezy. Odnotowano jeden przypadek pstrąga źródlanego rozwijającego się w enukleowanej ikrze palii alpejskiej, który przeżył stadium pojawienia się pigmentu w oczach zarodków ryb. Prawidłowy rozwój osiągnęły natomiast androgenetyczne pstrągi źródlane w enukleowanej ikrze tego samego gatunku oraz hybryd gatunków rodzicielskich, które nie tylko wykluły się, ale dożyły do stadium resorpcji woreczka żółtkowego i samodzielnego pobierania pokarmu. W dyskusji, doktorantka wskazała na to, że rozwój androgenicznych hybryd międzygatunkowych został zahamowany na etapie pojawienia się pigmentu w oczach zarodków ryb, co może dowodzić, że matczyne materiały cytoplazmatyczny jednego gatunku może aktywować genom zygoty innego gatunku. Jednakże, istnieje prawdopodobieństwo, że inne elementy cytoplazmatyczne działające podczas kolejnych etapów morfogenezy prowadzą do zamierania międzygatunkowych androgenetycznych zarodków przed wykluciem. Doktorantka sugeruje także, że dużą śmiertelność można częściowo wytłumaczyć ujawnieniem się recesywnych alleli. Ponadto według doktorantki odpowiedzialne za taki stan rzeczy mogą być także zbyt niskie dawki promieniowania jonizującego użyte do całkowitej inaktywacji matczynego genomu, na co może wskazywać pojawianie się fragmentów chromosomów. Obecność takich fragmentów chromosomów może być źródłem wysoce zmutowanej informacji genetycznej, może opóźnić lub nawet zablokować podziały mitotyczne, zdestabilizować genom androgenetyczny poprzez niekontrolowane włączenie ich do chromosomów ojcowskich, wywołać ich rearanżacje i w konsekwencji wpływać na rozwój

ontogenetyczny nosiciele takich fragmentów. Z drugiej jednak strony doktorantka wskazuje, że niższa dawka promieniowania zapewniłaby wyższą przeżywalność zarodków, podczas gdy wyższa dawka może być szkodliwa dla matczynych czynników cytoplazmatycznych niezbędnych do wczesnego rozwoju zarodka.

Z powodu niskiej wydajności zastosowanej metody spróbowano określić, w jakim stopniu zastosowane promieniowanie jonizujące oraz szok ciśnieniowy wpływają na śmiertelność osobników androgenetycznych na przykładzie pstrąga potokowego (*Salmo trutta m. fario*). Porównano wyniki indukowanej androgenezy i gynogenezy pstrąga potokowego, aby określić, w jakim stopniu naświetlanie promieniowaniem jonizującym wpływa na skuteczność androgenezy. Inaktywację matczynego genomu jądrowego w przebiegu procesu androgenezy uzyskano naświetlając ikrę promieniowaniem X, natomiast inaktywację ojcowskiego genomu jądrowego w procesie gynogenezy osiągnięto poddając nasienie promieniowaniu UV. Z kolei, porównując przeżywalność uzyskanych haploidów i diploidów oceniono wpływ szoku ciśnieniowego. Po inseminacji ikrę z „grupy androgenetycznej i gynogenetycznej” poddawano szokowi ciśnieniowemu. Wyniki tych badań doktorantka przedstawiła w kolejnej publikacji pt. „Induction of gynogenetic and androgenetic haploid and doubled haploid development in the Brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus 1758)”. Wykazano wyższą śmiertelność haploidalnych zygot androgenetycznych w porównaniu do gynogenetycznych. Ponadto niższy wskaźnik przeżycia zaobserwowano wśród androgenetycznego potomstwa z diploidalnych grup poza kilkoma tylko osobnikami, które przeżyły do etapu samodzielnego pobierania pokarmu. Zaobserwowano również większą żywotność larw haploidalnych w porównaniu do diploidalnych na etapie pojawienia się pigmentu w oczach zarodków ryb. Analiza ploidalności osobników androgenetycznych z diploidalnych wariantów badań eksponowanych na działanie szoku ciśnieniowego, wykazała obecność wielu haploidalnych zarodków. Doktorantka upatruje przyczyn uzyskanych wyników w indukowanych promieniowaniem jonizującym modyfikacjach matczynego mRNA w cytoplazmie enukleowanej ikry, które mogą upośledzać wczesny rozwój i obniżać przeżywalność zarodków androgenetycznych. W związku z tym pojawienie się haploidów wśród zarodków z diploidalnych wariantów androgenetycznych wskazuje, że promieniowanie jonizujące oprócz inaktywacji matczynego genomu jądrowego rozregulowuje mechanizm kontrolujący podział komórkowy, prowadząc do opóźnienia I podziału mitotycznego zarodków. Z kolei opóźnienie mitotyczne wywołane promieniowaniem, jak wnioskuje doktorantka, może spowodować, że szok ciśnieniowy będzie mało skuteczny. Ponadto

doktorantka wnioskuje, że wysoka śmiertelność podwojonych haploidów może być spowodowana szokiem ciśnieniowym, który wywołuje zmiany w strukturze mikrotubul wrzeczona upośledzając wczesny rozwój osobników gynogenetycznych i androgenetycznych. Doktorantka przytacza również wnioski opisane w poprzedniej publikacji.

W dalszym ciągu badań nad niską skutecznością androgenezy sprawdzono, jaki jest wpływ chromosomów płci na przeżywalność haploidalnych i diploidalnych osobników androgenetycznych pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) oraz przeprowadzono ocenę procesu dyferencjacji płci i rozwoju gonad u androgenetycznych samic (XX) i samców (YY) pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Ikrę enukleowano z użyciem promieniowania X, a następnie zapłodniono nasieniem pochodzącym od zwykłych, heterogametycznych samców (XY) oraz od homogametycznych „neosamców”, czyli zmaskulinizowanych samic (XX) w celu uzyskania osobników haploidalnych. Z kolei, aby uzyskać diploidalne osobniki androgenetyczne zastosowano szok ciśnieniowy. Uzyskane w ten sposób androgenetyczne linie pstrąga tęczowego składały się z samców (YY) i samic (XX) oraz samych samic (XX). Wyniki badań doktorantka przedstawiła w publikacjach „Androgenetic development of X- and Y-chromosome bearing haploid rainbow trout embryos” oraz „Application of spermatozoa from neo-males (XX) to induce androgenetic development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”. Doktorantka wykazała, że wskaźniki przeżywalności androgenetycznego potomstwa normalnych samców i tzw. „neosamców” badanych podczas embriogenezy i wylęgu nie różniły się istotnie. Jednak wszystkie haploidy zginęły w ciągu kilku dni po wykluciu. Podobnie, rzecz się miała u osobników diploidalnych, gdzie śmiertelność w tym okresie też była wysoka. Analiza molekularna ojcowskiego DNA potwierdziła brak chromosomu typu Y u androgenetycznego potomstwa tzw. „neosamców”. Podobnie jak w poprzednich badaniach cytogenetycznych zaobserwowano pofragmentowane chromosomy. Doktorantka podobnie jak w pozostałych publikacjach upatruje przyczyny w dawce promieniowania jonizującego. Jednakże tym razem, wskazuje przypuszczalne rozwiązanie w postaci metody Morishimy i wsp. (2011) wykorzystującej szok termiczny w celu uzyskania androgenetycznych haploidów u piskorza amurskiego (*Misgurnus anguillicaudatus*). W podsumowaniu, doktorantka zaznacza, że różnice między chromosomami typu X i Y pstrąga tęczowego nie wpływają na przeżycie potomstwa androgenetycznego, a procesy dyferencjacji płci i formowania gonad przebiegają u tych ryb prawidłowo, bez względu na ich płć genetyczną. Ponadto, doktorantka widzi w zastosowaniu plemników tzw. „neosamców” do indukowania rozwoju androgenicznego pewien potencjał

do wykorzystania w akwakulturze pstrąga tęczowego do produkcji homozygotycznych samic, które mogą być stosowane w programach hodowlanych oraz do uzyskania linii klonalnych.

W świetle tak niskiej skuteczności indukowanej androgenezy u ryb łososiowatych pozostaje otwartym pytanie, co jeszcze możemy zrobić dla zwiększenia wydajności tej metody? Wyniki badań nie są na tyle jednoznaczne a wnioski rozmywa się w sferze przypuszczeń, aby z całą pewnością stwierdzić, że zastosowane dawki promieniowania jonizującego w tym wypadku promieniowania X są zbyt wysokie lub zbyt niskie. W związku z tym wybranie skutecznej dawki promieniowania do enukleacji ikry przy zachowaniu matczyne materiału cytoplazmatycznego wydaje się być kluczowe. Z danych literaturowych wynika, że w pierwszych (np. Purdon, 1968) jak i większości dalszych badań nad indukowaną androgenozą u ryb, stosowano promieniowanie gamma pochodzące ze źródła kobaltowego. Należy zaznaczyć, że promieniowanie X generowane przez akceleratory liniowe w porównaniu do promieniowania gamma nie jest jednorodne. Zastosowanie promieniowania X do badań z użyciem akceleratora liniowego, powinno być związane z obliczeniem skutecznej dawki całkowitej tego promieniowania i wyznaczeniem czasu, w którym dawka jest dostarczana do organizmu, czyli mocy dawki promieniowania. Istotne jest również wyznaczenie nie tylko dawki całkowitej, ale także dawki pochłoniętej oraz ocena stopnia jednorodności dawki poprzez monitorowane pomiary dozymetryczne w trakcie napromieniania materiału. W celu wyznaczenia rozkładu dawki należy określić wartość spadku procentowych dawek zależnych od głębokości w napromienionym środowisku (warstwie ziaren ikry) tzw. PDD (*ang.* Percentage Dose Depth), wydajność akceleratora liniowego oraz profil wiązki promieniowania. Oczywiście zawsze pozostaje powrót do stosowania promieniowania gamma lub wybranie innej metody enukleacji ikry tak jak to przytoczyła doktorantka w ostatniej z omawianych publikacji. Ponadto, przyczyny niskiego wskaźnika przeżywalności zarodków androgenetycznych międzygatunkowych upatruje się w samej aktywacji genomu zygoty, różnicach międzygatunkowych w zakresie cyklu rozwojowego i interakcji między genomem jądrowym a elementami cytoplazmatycznymi (specyficzne gatunkowo białka, matczyne mRNA i mitochondrialne DNA). W związku z tym wydaje się, że analiza mitochondrialnego DNA wyniosłaby nowe światło do całości badań nad indukowaną androgenozą u ryb.

Podsumowując, uważam spektrum zastosowanych w rozprawie doktorskiej mgr Oliwii Michalik metod i analiz jak również przedstawione wnioski za prawidłowe, w istotny sposób pogłębiające naszą wiedzę o indukowanej androgenozie oraz problemach

związanych z jej zastosowaniem u ryb łososiowatych. Opublikowanie wyników badań w czasopismach z listy filadelfijskiej wskazuje, że weszły one na stałe do literatury przedmiotu i mogą stanowić podstawę do dalszych badań. Rozprawa doktorska mgr Oliwii Michalik spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U. z 2017 poz. 1789 z zmianami Dz.U z 2017 poz. 1530) . W zawiązku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Oliwii Michalik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halama - Lubna