

Prof. dr hab. inż. Krzysztof Formicki, prof. zw.
Katedra Hydrobiologii, Ichtiologii i Biotechnologii Rozrodu
Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Recenzja
rozprawy doktorskiej
pani mgr inż. Agnieszki Stabińskiej-Ułas
pod tytułem
„Efektywność triploidyacji u okonia europejskiego *Perca*
***fluviatilis* L. z zastosowaniem szoku ciśnieniowego**

Niniejsza opinia spisana została dla Rady Naukowej Dyscypliny
Zootechnika i Rybactwo
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Promotor: Dr hab. Piotr Hliwa, prof. UWM
Katedra Rybactwa

Okień europejski jest pospolitym gatunkiem ichtiofauny występującym we wszystkich typach akwenów słodkowodnych i słonawych. Jest gatunkiem eurytermicznym o stosunkowo dużej tolerancji na niski poziom tlenu i zmiany pH w wodzie. Mięso okonia w okresie ostatnich kilkunastu lat zostało docenione i jest bardzo chętnie spożywane zwłaszcza w Europie Zachodniej oraz w Skandynawii. Przełożyło się to na duży wzrost zainteresowania akwakultury, która rozwija się niezwykle prędko na świecie. Polska wraz z Estonią i Rosją należy do grupy największych eksporterów tego gatunku ryby zwłaszcza na rynek szwajcarski. Dotychczas jednak, w dalszym ciągu, głównym źródłem mięsa okonia są osobniki pozyskiwane w połowach komercyjnych w wodach otwartych. Hodowla okonia w warunkach akwakultury a zwłaszcza w

systemach recykulacyjnych rozwija się w Europie powoli, napotyka bowiem wiele trudności takich jak między innymi pozyskiwanie produktów płciowych czy problemy związane z podchowem stadiów młodocianych obejmujące zwłaszcza napełnienie pęcherza pławnego, rozmiary i jakość pierwszego pokarmu egzogenego, okres przejścia larw z pokarmu naturalnego na pasze komercyjne i kwestie kanibalizmu.

Z tego powodu trwają poszukiwania innowacyjnych i nowoczesnych rozwiązań, które poprawiły by efektywność i rentowność hodowli tego cennego gatunku. Duże nadzieje wiązane są z zabiegami z zakresu bioinżynierii nakierowanych na hodowlę stad będących efektem zabiegu triploidyzacji - manipulacji genomowej ukierunkowanej na uzyskanie potomstwa o powiększonym o 50% zestawie chromosomów. czyli $3n$ w stosunku do osobników rodzicielskich. Zabieg ten sprowadza się do zatrzymania drugiego ciała kierunkowego w komórce jajowej wkrótce po zapłodnieniu, ale przed pierwszym podziałem mitotycznym zygoty, dzięki temu następuje podwojenie ilości chromosomów matczynych przy zachowaniu haploidalnej ilości chromosomów ojcowskich. Zabieg triploidyzacji można przeprowadzić stosując najczęściej szok termiczny, chemiczny bądź ciśnieniowy przy czym parametry – procedury szoków są precyzyjnie ustalane eksperymentalnie dla każdego gatunku. Właściwa i precyzyjnie przeprowadzona procedura powoduje, że powinny powstać osobniki charakteryzujące się sterylnością, które rosą nieprzerwanie w okresie dojrzewania płciowego. Uzyskanie takich niepłodnych w 100% osobników nie stwarza również zagrożenia dla środowiska naturalnego. Stworzenie takiej precyzyjnej procedury byłoby dużą szansą dla hodowli tego cennego gatunku.

Pani mgr inż. Agnieszka Stabińska-Ułas wraz z Promotorem dostrzegli ten problem i Doktorantka zajęła się opracowaniem tego zagadnienia. Pozwoliło to na sformułowanie i doprecyzowanie tematu, określenie celu rozprawy

doktorskiej, i przeprowadzenie badań. Celem przedłożonej do oceny pracy doktorskiej była optymalizacja i standaryzacja warunków zabiegu triploidyzacji u okonia europejskiego *Perca fluviatilis* L. z zastosowaniem szoku ciśnieniowego oraz ocena efektywności tego zabiegu za pomocą różnych technik diagnostycznych.

Rozprawa doktorska pani mgr inż. Agnieszki Stabińskiej-Ułas spisana została łącznie na 81 stronach, z czego 41 to tekst rozprawy (wraz ze stroną tytułową, podziękowaniami i spisem treści - razem 5 stron), a dodatkowe 10 stron to piśmiennictwo – 115 pozycji oraz 2 strony zawierające streszczenie w języku polskim i angielskim a także 13 rycin i 8 tabel zamieszczonych na końcu rozprawy. W pracy wyróżniono zgodnie z klasycznymi normami 11 rozdziałów obejmujących wstęp, cel pracy, materiał i metody badań, wyniki, dyskusję, wnioski, literaturę, streszczenie, spis tabel, spis rycin oraz załączniki. W pierwszych czterech rozdziałach dodano podrozdziały porządkujące treść. Powoduje to że praca jest przejrzysta i łatwa w odbiorze. Szkoda, że Autorka nie zdecydowała się umieścić rycin i tabel w tekście pracy tylko na końcu, bo ułatwiło by to w znakomity sposób zapoznanie się z treścią rozprawy.

Zamierzeniem Autorki, jak wspominałem, była optymalizacja i standaryzacja warunków zabiegu triploidyzacji u okonia europejskiego z zastosowaniem szoku ciśnieniowego.

W tym celu pani mgr inż. Agnieszka Stabińska-Ułas pobierała produkty płciowe od dzikich osobników okonia europejskiego w latach 2015 – 2018, dokonywała zapłodnienia i przeprowadzała szoki ciśnieniowe w specjalnej komorze (z atestem Okręgowego Urzędu Miar w Gdańsku) do indukowania ciśnienia hydrostatycznego z możliwością regulowania jego wartości. Przed przystąpieniem do zapłodnienia badano jakość plemników z wykorzystaniem komputerowej analizy ruchu (CASA). Po przeprowadzeniu szoków Doktorantka zapłodnioną ikrę inkubowała określając procent zapłodnienia i odsetek

zaoczkowanych zarodków w piątej dobie po zapłodnieniu. Po wykluciu larwy podchowevano przez 4 miesiące, zmieniając pokarm i dostosowując rodzaj pokarmu do wielkości karmionych osobników.

Gdy ryby osiągnęły średnią masę około 5 gramów Doktorantka oceniała skuteczność zabiegu triploidyacji stosując analizę hematologiczną - oceniając wielkość jąder erytrocytów poszczególnych ryb, analizę histologiczną – oceniając gonady pod kątem kształtu, wielkości, unaczynienia oraz rodzaju komórek jajowych aby ustalić stosunek płci w poszczególnych grupach doświadczalnych oraz analizę cytometryczną.

Przy opracowywaniu wyników Autorka testowała jednorodność wariancji testem Levena'a, zgodność rozkładu danych z rozkładem normalnym za pomocą testu Shapiro-Wilka. Parametry ruchu plemników analizowała za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z testem post-hoc Tuckey'a oraz przeżywalność embrionów i larw oraz jądra erytrocytów za pomocą testu t-Studenta zawarte w programie Statistica.

Pokłosiem tych badań osadzonych w szerokim tle teoretycznym i metodycznym jest rozdział „Wyniki”, w którym Autorka prezentuje swoje dokonania.

Co zatem Autorka ustaliła analizując ten bogaty materiał. Otóż m.in., że:

- efektywność zabiegu triploidyacji z zastosowaniem szoku ciśnieniowego u okonia europejskiego jest zróżnicowana i zależna od przyjętych parametrów szoku,
- najwyższy odsetek triploidów (50,3%) uzyskano przy ciśnieniu 9000 PSI trwającym 12 minut inicjowanym 4 minuty po zapłodnieniu, wartości ciśnienia rzędu 7000 i 8000 PSI nie powodowały powstawania dużej ilości triploidów, bo odpowiednio 9,8% i 6,4%, natomiast inne testowane warianty przez doktorantkę okazały się nieskuteczne (łącznie w latach 2015 – 2018 przetestowano 36 wariantów wraz z 4 kontrolami).

- w trakcie embriogenezy i w okresie klucia się larw obserwowano wysoką śmiertelność osobników uzyskanych w wyniku zabiegu triploidyzacji, ale wyniki były porównywalne z grupami kontrolnymi (diploidalnymi),
- stwierdzono rozbieżności w ilości gonad sterylnych i krwinek czerwonych z widocznymi podziałami jąder komórkowych badanych metodami histologicznymi i hematologicznymi, co świadczy o małej wiarygodności oznaczeń przy użyciu tych technik,
- jedynie metoda cytometrii przepływownej okazała się najbardziej precyzyjna, obiektywna i szybka diagnostycznie do oceny efektywności zabiegu triploidyzacji.

Rozdział „Wyniki” jest napisany przejrzyście, zgodnie z kolejnością przyjętą w rozdziale „Materiał i Metody Badawcze”, ilustrowany fotografiami, krwinek i przekrojów histologicznych gonad. Rozdział „Dyskusja” wraz z „Wnioskami” spina klamrą całą rozprawę. Autorka na 8 stronach i fragmencie 9 strony omawia uzyskane wyniki i konfrontuje swoje ustalenia ze światowym piśmiennictwem traktującym o przedmiocie. Rozdział ten, dobrze napisany, omawia precyzję przyjętych metod badawczych, dotychczas opracowane procedury i próby opracowania procedur skutecznego przeprowadzania zabiegu triploidyzacji. Rozprawę doktorską zamyka 6 wniosków.

Nie znaczy to wcale, że Doktorantka ustrzegła się przed pewnymi nieścisłościami, jakie przedłożona rozprawa zawiera, co nie powinno dziwić, a wskazanie tych nieścisłości wiąże się z obowiązkiem recenzenta.

Oto one :

1. Autorka używa terminów zaplemnienie i zapłodnienie opisując proces triploidyzacji, a przecież nie oznaczają one tego samego procesu (np.: strony 13, 14 czy 53).
2. W rozdziale „Materiał i Metody Badawcze” Autorka pisze na stronie 17, że „produkty płciowe ... pozyskiwano poprzez delikatny masaż powłok

brzusznych”. W naturalnych warunkach uwolniony początek taśmy jest zaczepiany o roślinność i rozciągany, zatem jak dokładnie pobierano i przygotowywano ikrę okonia?

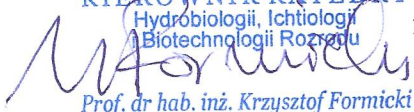
3. W tym samym rozdziale, na stronie 18, jest informacja, że jaja zapładniano nasieniem w ilości proporcjonalnej do wielkości fragmentu taśmy. Jakiej ilości nasienia używano?
4. W pracy parametry ruchu plemników VCL i VSL są różnie nazywane np.: strony 18 i 26).
5. Wydaje mi się, że umieszczenie rycin i tabel w tekście pracy a nie na końcu rozprawy, ułatwiło by w znakomity sposób zapoznanie się z jej treścią.
6. W podrozdziale „Inkubacja ikry i ocena przeżywalności embrionów” Autorka zapłodnioną ikrę inkubowała w temperaturze 15 stopni Celsjusza, a następnie do momentu wyklucia w temperaturze 21 stopni Celsjusza. W jakim tempie zwiększała się temperatura wody w której inkubowano jaja?

Owe nieścisłości są natury dyskusyjnej i nie wpływają wcale na moją ogólną wysoką ocenę rozprawy doktorskiej pani mgr Agnieszki Stabińskiej - Ułas, a biorąc pod uwagę:

- dobrze zaplanowane i poprawnie przeprowadzone, a nade wszystko oryginalne badania wnoszące nowe dane do nauki, ale przede wszystkim do praktyki (co skromnie pominęła Autorka), bowiem opracowanie precyzyjnej procedury uzyskiwania triploidalnych osobników okonia będzie miało bardzo duże znaczenie w akwakulturze,
- prawidłowo dobrane i ocenione pod kątem wiarygodności oznaczeń nowoczesne i pracochłonne metody badawcze,
- dużą ilość zbadanych wariantów,
- obfite piśmiennictwo należycie spożytkowane w dobrze napisanej i logicznej dyskusji,

można stwierdzić, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska pani mgr Agnieszki Stabińskiej-Ułas w pełni odpowiada wymogom określonym przez przepisy dotychczasowe tj. art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669) stawianym rozprawom doktorskim i wnoszę wobec Wysokiej Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie i dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 25.02.2020 rok.

KIEROWNIK KATEDRY
Hydrobiologii, Ichtiologii
i Biotechnologii Rozrodu

Prof. dr hab. inż. Krzysztof Formicki