



**INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn,

Zakład Biologii Gamet i Zarodka

dr hab. Joanna Nynca

Olsztyn, 17.08.2021

Tel. (+48 89) 539-31-34

Fax: (+48 89) 535-74-21

e-mail: j.nynca@pan.olsztyn.pl

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR ANNY DYMEK zatytułowanej „Struktura gonad a zróżnicowane mechanizmy biologii rozrodu u ryb kostnojęzykowych (Teleostei: Osteoglossomorpha)”

wykonanej w Zakładzie Anatomii Porównawczej
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod
kierunkiem Promotora dr hab. Anny Pecio, prof. UJ oraz Promotora pomocniczego dr hab.
Rafała Pipreka

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Dymek pt. „Struktura gonad a zróżnicowane mechanizmy biologii rozrodu u ryb kostnojęzykowych (Teleostei: Osteoglossomorpha)” składa się z dwóch części. Pierwsza część obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz czterech prac stanowiących rozprawę doktorską, wstęp, materiał i metody oraz wyniki. Druga część stanowią kopie czterech oryginalnych prac badawczych, dyskusja, podsumowanie, wnioski oraz bibliografię. Rozprawa Pani mgr Anny Dymek to cykl czterech spójnych tematycznie, oryginalnych prac badawczych opublikowanych w latach 2019-2021 w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: Zoologischer Anzeiger (IF- 1,521; MNiSW₂₀₂₀ – 70), Journal of Fish Biology (IF-1,793; MNiSW₂₀₂₀ – 70), Acta Zoologica (IF- 1,261; MNiSW₂₀₂₀ – 70) oraz Journal of Morphology (IF- 2,051; MNiSW₂₀₂₀ – 100). Łączny Impact Factor dla publikacji to 6,626 a liczba punktów MNiSW wynosi 310. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Wskazuje to, iż weryfikacja założonych tez była dokonana na poziomie Edytorów czasopism. Stosowne oświadczenia współautorów potwierdzające wiodący udział Doktorantki w planowaniu i realizacji badań, opracowywaniu wyników oraz przygotowaniu manuskryptu zostały dołączone do rozprawy doktorskiej.

Ryby kostnojęzykowe (Osteoglossomorpha) to jedna z najstarszych ewolucyjnie grup ryb kostnoszkieletowych cechująca się zróżnicowaniem morfologicznym kształtów ciała i wielkości oraz odmiennymi strategiami rozrodczymi (inseminacja vs. zapłodnienie zewnętrzne). Badania wykazały różnorodność w budowie gonad obu płci u przedstawicieli ryb kostnojęzykowych tj. obecność wyspecjalizowanych obszarów jądra, tworzenie pakietów plemników w układzie rozrodczym samców oraz modyfikacje w obrębie jajnika służące przechowywaniu plemników z jednoczesnym zachowaniem ich zdolności zapładniającej. Wynika to z przystosowania do odmiennego sposobu rozrodu, jak również jest skutkiem długiego czasu niezależnej ewolucji poszczególnych taksonów. Spośród ponad dwustu współcześnie żyjących gatunków sklasyfikowanych w tej grupie, jedynie motylowiec (*Pantodon buchholzi*) cechuje się występowaniem inseminacji, a obserwowana różnorodność strukturalna plemników u tego gatunku jest unikatowa wśród kręgowców. Motylowiec jako jedyny wśród ryb kostnojęzykowych posiada plemnik złożony typu *introsperm*, który jest charakterystyczny dla procesu inseminacji. Pozostałe gatunki ryb kostnojęzykowych posiadają plemniki typu *aquasperm*, posiadające okrągłą główkę, co jest typowe u gatunków z zapłodnieniem zewnętrznym. U gatunków z inseminacją przystosowania do tej strategii rozrodu są również widoczne w budowie jajnika. Nabłonek płciowy może tworzyć wgłębienia lub krypty, gdzie plemniki mogą być przechowywane między inseminacją a zapłodnieniem.

Wiodącym tematem publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej jest (1) poznanie struktury gonad obu płci wybranych gatunków z inseminacją oraz z zapłodnieniem zewnętrznym wraz z analizą adaptacji do danego typu rozrodu; (2) opisanie przebiegu spermatogenezy prowadzącej do powstania plemnika złożonego u motylowca (*Pantodon buchholzi*); (3) porównawcza analiza zmian w strukturze i ultrastrukturze oocytów na etapie prewitelogenezy ze szczególnym uwzględnieniem rozwoju ciała Balbianiego u gatunków z inseminacją oraz zapłodnieniem zewnętrznym.

We wstępie Doktorantka w bardzo przejrzysty sposób przedstawiła zagadnienia związane z wybranymi aspektami biologii rozrodu ryb kostnoszkieletowych (w tym ryb kostnojęzykowych), ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska inseminacji, które w konsekwencji prowadzi do zapłodnienia wewnętrznego lub wewnętrznej asocjacji gamet. Doktorantka uzasadniła konieczność pogłębienia wiedzy na temat analizy porównawczej struktury gonad obu płci wybranych gatunków ryb kostnojęzykowych charakteryzujących się inseminacją oraz z zapłodnieniem zewnętrznym. Dodatkowo Doktorantka zbadała skomplikowane procesy różnicowania się złożonej struktury plemnika podczas spermatogenezy i spermogenezy u motylowca oraz zróżnicowaną organizację ooplazmy

oocytów na etapie formowania się ciała Balbianiego podczas prewitelogenezy pomiędzy gatunkami charakteryzującymi się odmiennymi sposobami zapłodnienia. Przekonuje to o zasadności sformułowanych hipotez badawczych oraz celów przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

Materiał badawczy stanowiły gonady pozyskane od przedstawicieli wybranych gatunków ryb kostnojęzykowych. Zwierzęta pochodziły z hurtowni oraz ze zbiorów (kolekcja formalinowa) Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Dodatkowo, do analizy w mikroskopie świetlnym wykorzystano preparaty histologiczne gonad udostępnione przez Uniwersytet Humboldta w Berlinie. Do prawidłowego wykonania analiz Doktorantka opanowała biegle techniki mikroskopii świetlnej, skaningowej mikroskopii elektronowej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej, co potwierdza perfekcyjnie wykonana dokumentacja fotograficzna badanych tkanek, zaprezentowana w wynikach publikacji. Autorka stosując opisane techniki wykazała się zarówno ich znajomością jak i prawidłowym zastosowaniem. Moim zdaniem, zastosowane metody badawcze zostały adekwatnie dobrane do realizacji postawionych celów, zostały także zaakceptowane przez recenzentów czasopism, w których opublikowano wyniki badań.

W oparciu o zdefiniowane cele uzyskano wyniki, które dostarczyły nowych informacji dotyczących struktury jąder i jajników oraz procesu spermatogenezy i oogenezy u omawianych gatunków ryb kostnojęzykowych charakteryzujących się zapłodnieniem zewnętrznym oraz inseminacją. Wykazano, że struktura gonad obu płci u motylowca wykazuje liczne przystosowania do inseminacji, takie jak podział jądra na część spermatogeniczną i aspermatogeniczną (funkcjonująca jako gruczoł dodatkowy, w którym zachodzi proces steroidogenezy), tworzenie pakietów plemników (każdy pakiet zawiera ok 300-500 dojrzałych plemników) oraz obecność krypt nabłonkowych w jajnikach. Tym samym struktura gonad tego gatunku różni się od struktury obserwowanej u pozostałych ryb kostnojęzykowych, które charakteryzują się zapłodnieniem zewnętrznym. Ponadto, podczas spermatogenezy oraz spermogenezy u motylowca zachodzą procesy prowadzące do powstania wyjątkowo złożonego plemnika, obejmujące m.in. degradację aparatów Golgiego i formowanie ciał wrzecionowatych co jest unikatową cechą opisaną dotychczas tylko u *Pantodon buchholzi*, niezależne usuwanie nukleoplazmy w formie pakietów nukleoplazmatycznych i cytoplazmy w formie ciał reszkowych ze spermatyd. U motylowca zachodzi spermogeneza typu I, strefowy typ kondensacji chromatyny oraz występuje błona okienkowa (odcinek witki zawierający liczne pęcherzyki).

W kolejnym kroku wykazano zróżnicowanie struktury oocytów będących na różnych etapach oogenezy pomiędzy gatunkami o odmiennym sposobie zapłodnienia, ale także pomiędzy gatunkami o zapłodnieniu zewnętrznym oraz pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami należącymi do tej samej rodziny. Zróżnicowanie w organizacji oocytów pomiędzy analizowanymi gatunkami ryb kostnojęzycznych staje się widoczne po zakończeniu folikulogenezy i obejmuje m.in. tworzenie ciała Balbianiego, podział (lub brak podziału) ooplazmy na odrębne strefy centralną – homogeną i peryferyjną – granularną, kolejność pojawiania się kropli tłuszczu i pęcherzyków korowych oraz różną zawartość pęcherzyków korowych (u motylowca zidentyfikowano kwaśne mukopolisacharydy i glikozoaminoglikany, zaś u gatunków z zapłodnieniem zewnętrznym obojętne glikoproteiny). U motylowca występują pokryte jednowarstwowym nabłonkiem płaskim parzyste jajniki, w przeciwieństwie do pojedynczej gonady wybranych gatunków ryb kostnojęzycznych (*Osteoglossum bicirrhosum*, *Marcusenius cyprinoides*, *Brevimyrus niger*, *Gnathonemus petersii*, *Mormyrus rume*) o zapłodnieniu zewnętrznym, zbudowanej z nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Nabłonek płciowy u motylowca jest cylindryczny, w przeciwieństwie do jednowarstwowego nabłonka płciowego u gatunków o zapłodnieniu zewnętrznym, tworzy krypty w głąb stromy gdzie plemniki mogą być przechowywane między inseminacją a zapłodnieniem oraz posiada liczne apikalne specjalizacje w postaci rzęsek i mikrokosmków, odpowiedzialne prawdopodobnie za transport oocytów oraz wydzielanie składników płynu jajnikowego. Ponadto wykazano aktywność wydzielniczą komórek nabłonkowych, która może sprzyjać utrzymaniu żywotności i zdolności zapładniającej plemników.

W czwartej publikacji wykazano, że ciało Balbianiego u każdego z gatunków charakteryzujących się inseminacją (*P.buchholzi*) oraz zapłodnieniem zewnętrznym (*Osteoglossum bicirrhosum*, *Arapaima gigas*) składa się z plazmy płciowej, mitochondriów, które ulegają fuzji oraz rozszczepianiu się, aparatów Golgiego a także siateczki śródplazmatycznej. Jednakże u każdego z powyższych gatunków proces formowania się ciała Balbianiego jest odmienny i wykazuje cechy specyficzne gatunkowo. Również forma plazmy płciowej związanej z siecią mitochondrialną jest odmienna u badanych gatunków. W trakcie prewitelogenezy oocyty gatunków o zapłodnieniu zewnętrznym są wypełnione elektronowo jasną ooplazmą, podczas gdy u *P. buchholzi* zaobserwowano zmiany i wyróżniono trzy rodzaje ooplazmy (elektronowo gęsta, elektronowo jasna oraz pośrednia). Wykazana w niniejszej rozprawie doktorskiej różnorodność w budowie gonad męskich i żeńskich przedstawicieli ryb kostnojęzycznych jest związana z przystosowaniami do odmiennego sposobu zapłodnienia i jest wynikiem niezależnej ewolucji poszczególnych taksonów, który wpłynął także na

zróznicowanie widoczne w strukturze gamet oraz procesach zachodzących podczas gametogenezy. Uzyskane wyniki i ich dyskusja zostały szczegółowo przedstawione w czterech załączonych do rozprawy doktorskiej pracach. Uważam, iż interpretacja jak i dyskusja wyników jest wszechstronna i prawidłowa.

Podczas wnikliwej analizy pracy nasunęły mi się uwagi i pytania. Najistotniejsze z nich przedstawiam poniżej z prośbą o wyjaśnienie lub komentarz.

- 1) W Tabeli 1 Doktorantka zestawiała dane dotyczące materiału badawczego wykorzystanego w badaniach. Moje zastrzeżenia budzi liczebność i „reprezentatywność” materiału do badań. Niektóre gatunki ryb reprezentowane są tylko przez pojedyncze osobniki, np. *Notopterus notopterus*, *Xenomystus nigri*, *Marcusenius cyprinoides*, *Brevimyrus niger*, *Gnathonemus petersii*, *Campylomormyrus alces*. Część z tych gatunków (*M. cyprinoides*, *B. niger*, *G. petersii*) jest wykorzystana w badaniach porównawczych budowy morfologicznej i histologicznej jajników oraz wczesnych etapów oogenezy (Publikacja nr 3). Czy badanie preparatów uzyskanych z jednego osobnika jest reprezentatywne?
- 2) W Publikacji nr 3 porównywano budowę morfologiczną oraz histologiczną jajników oraz wczesne etapy oogenezy u *P. buchholzi* oraz gatunków o zapłodnieniu zewnętrznym (*O. bicirrhosum*, *M. cyprinoides*, *B. niger*, *G. petersii*, *M. rume*). Badane osobniki znajdowały się w różnych fazach rozwoju jajnika, np. we wczesnej fazie (*M. cyprinoides*, *G. petersii*) oraz w zaawansowanej fazie rozwoju (*P. buchholzi*, *O. bicirrhosum* i *M. rume*). Czy w badaniach porównawczych nie powinno badać się jajników w tej samej fazie rozwoju?
- 3) Czy istnieją badania porównawcze nasienia ryb kostnojęzykowych charakteryzujących się zapłodnieniem zewnętrznym oraz zapłodnieniem wewnętrznym? Porównawcza charakterystyka wyspecjalizowanych plemników typu *aquasperm* oraz *introsperm*, obejmująca parametry ruchu plemników (odsetek ruchliwych plemników, prędkość ruchu prostoliniowego, prędkość ruchu krzywoliniowego, liniowość), koncentrację plemników w nasieniu, żywotność plemników, potencjał mitochondrialny oraz charakterystyka plazmy nasienia dostarczyłaby cennych informacji dotyczących specyfiki rozrodu ryb kostnojęzykowych, charakteryzujących się odmiennym sposobem zapłodnienia. Również porównanie składu białkowego (proteomu) oraz transkryptomu plemników ryb kostnojęzykowych przy zastosowaniu wysokoprzepustowych metod

znacząco przyczyniłoby się do poszerzenia wiedzy na temat zależności między charakterystyką plemników a różnymi strategiami rozrodczymi.

- 4) U motylowca wykazano tworzenie się wydzieliny komórek nabłonkowych w jajniku. Nabłonek płciowy może tworzyć wgłębienia lub krypty, gdzie plemniki mogą być przechowywane w czasie między inseminacją a zapłodnieniem. Wydzielina komórek nabłonkowych sprzyja utrzymaniu żywotności i zdolności do zapłodnienia plemników. Czy istnieją badania dotyczące poznania składu biochemicznego wydzieliny komórek nabłonkowych? Identyfikacja składników wydzieliny odpowiedzialnych za zabezpieczenie zdolności zapładniającej plemników mogłaby stanowić bazę do opracowania specyficznych gatunkowo metodyki krótko i długookresowego przechowywania nasienia ryb kostnojęzycznych.

WNIOSEK KOŃCOWY


Podsumowując, przedstawioną do oceny rozprawę oceniam bardzo wysoko. Jest ona obszernym opracowaniem zawierającym oryginalne wyniki, co potwierdza ich opublikowanie w czasopismach z wysokim IF. Doktorantka wykazała duże predyspozycje i umiejętności wykorzystania technik badawczych, znajomość przedmiotowego piśmiennictwa, opracowania i prezentacji wyników, poprawnego wnioskowania i przygotowania publikacji co predysponuje ją do dalszej pracy naukowej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Dymek odpowiada warunkom określonym w art.13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn.zm.).

W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Anny Dymek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na znaczącą wartość naukową pracy wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Dymek.

Z poważaniem


Joanna Nynca