

Prof. dr hab. Jan Udała
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt
i Higieny Środowiska
Zachodniopomorski Uniwersytet
Technologiczny w Szczecinie

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Izabeli Waclawik pt. „Zastosowanie biotechnik rozrodu w reprodukcji wizona amerykańskiego (*Neogale vison*)” wykonanej w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem dr hab. inż. Wojciecha Kruszyńskiego, prof. UPWr oraz prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego

Niniejsza dysertacja doktorska dotycząca poznania przebiegu procesów rozrodczych u samców norki amerykańskiej jest najlepszym przykładem osiągniętego postępu w zakresie biotechnologii rozrodu zwierząt i możliwości wykorzystania różnych biotechnik zarówno w doskonaleniu cech użytkowych jak również ochronie gatunkowej zwierząt.

W rozrodzie zwierząt gospodarskich, głównie bydła i świń, praktyczne zastosowanie znalazło już wiele biotechnik, a najszerzej wykorzystywana jest inseminacja. Wdrożenie tej biotechniki do praktyki na szeroką skalę nie byłoby możliwe bez opracowania skutecznych metod konserwacji nasienia, co wymagało z kolei dokładnego poznania jego właściwości i określenia funkcji biologicznych plemników w zmiennych warunkach termicznych. W przypadku niektórych jeszcze gatunków zwierząt gospodarskich, domowych i nieudomowionych występują nadal duże ograniczenia, związane głównie z brakiem skutecznych metod pozyskiwania i konserwacji nasienia. Dlatego z uznaniem należy odnieść się do podejmowanych prób rozwiązania problemów w tym zakresie, mając między innymi na uwadze potrzebę zabezpieczenia materiału genetycznego zwierząt zagrożonych wyginięciem. Skutecznym narzędziem dla realizacji celów związanych z ochroną gatunkową zwierząt, pozwalającą zachować żywotność komórek i tkanek przez długi czas jest kriokonserwacja. W przypadku nasienia daje ona możliwość zachowania potencjału genetycznego wybitnych osobników i uzyskania po nich potomstwa długo po ich śmierci. Razem z innymi biotechnikami pozwala rozwiązać szereg problemów związanych z rozrodem zwierząt. Mając na uwadze postępujący spadek płodności w wielu populacjach zwierząt i zagrożenie ich wyginięcia, podejmowane są różne działania mające na celu zapobiec tym niekorzystnym zjawiskom. Jedno z takich działań przedstawione zostało w niniejszej pracy. W przyjętej koncepcji założono wykorzystanie zwierząt hodowlanych jako modelu do

zbadania wybranych cech rozrodczych samców i opracowania skutecznej metody kriokonserwacji uzyskanego od nich nasienia, a następnie zastosowanie jej u zwierząt dzikich tego samego i pokrewnych gatunków. Przyjęta koncepcja jest jak najbardziej słuszna i wpisuje się w nurt podejmowanych prac ukierunkowanych na zachowanie szeroko rozumianej bioróżnorodności.

Zaprezentowane wyżej aspekty z zakresu znaczenia wybranych biotechnik rozrodu dla hodowli i ochrony zasobów genetycznych zwierząt wskazują na ważność podjętej tematyki pracy doktorskiej oraz celowość jej wykonania. Praca ta ma dwojaki wymiar, poznawczy oraz aplikacyjny, wzbogaca naszą wiedzę dotyczącą przebiegu procesów rozrodczych u samców wizona amerykańskiego oraz wskazuje na możliwość kriokonserwacji ich nasienia.

Praca liczy 145 stron maszynopisu i zawiera 128 pozycji piśmiennictwa, z czego 124 pozycje to prace obcojęzyczne, 35 wykresów, 8 fotografii, 54 tabele, z czego 3 tabele to załączniki. Na początku zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w pracy, co znacznie ułatwia jej czytanie. Praca została napisana według klasycznego schematu przyjętego dla tego typu opracowań naukowych, z podziałem na rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, założenia i cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, bibliografia, załączniki.

Odnosząc się do tytułu pracy należy zauważyć, że ma on bardzo ogólny charakter i nie wskazuje bliżej jakich problemów dotyczy. W rzeczywistości praca obejmuje ocenę wielkości gonad i właściwości wybranych cech nasienia samców wizona amerykańskiego z uwzględnieniem kriokonserwacji tego nasienia. Dlatego też temat pracy powinien mieć podobne brzmienie jak wyżej lub obecny tytuł należałoby uściślić poprzez wskazanie jakich zwierząt i biotechnik dotyczy, np. Zastosowanie wybranych biotechnik w rozrodzie samców wizona amerykańskiego.

We wstępie, będącym jednocześnie przeglądem piśmiennictwa, wyróżniono kilka podrozdziałów. W pierwszym z nich, Autorka wskazuje na niektóre aspekty dotyczące ekspansji człowieka w środowisku, zachwiania w nim równowagi i wynikającymi z tego konsekwencjami dla zwierząt dzikich, przejawiającymi się między innymi ograniczeniami w reprodukcji. Stąd też Jej zdaniem wynika coraz większe zainteresowanie możliwościami zastosowania technik wspomaganego rozrodu u gatunków zagrożonych. Uzasadnia niejako tym samym celowość wykonania własnych badań. Nadmienia jednocześnie, że w przypadku zwierząt dziko żyjących występują dużo większe problemy niż u zwierząt gospodarskich, dla których opracowano już wiele procedur, a wynikają one między innymi z małej liczby dostępnych osobników. Jej zdaniem problem ten można zmniejszyć stosując gatunki

modelowe, spokrewnione z gatunkiem docelowym ale łatwiej dostępnym. Dalej wskazuje wizona amerykańskiego jako jednego z dwóch, obok fretki, udomowionego przedstawiciela łasicowatych, spośród której to rodziny wiele gatunków jest zagrożonych. Podkreśla, że pomimo iż chów fermowy nerek ma już długą historię, to wiedza na temat biologii rozrodu tych zwierząt jest równie niewielka jak w przypadku ich dziko żyjących krewnych, z czym na pewno należy się zgodzić, zwłaszcza jeśli chodzi o biologię rozrodu samców. Słuszna jest również sugestia Autorki o potrzebie przetestowania możliwości stosowania u tych zwierząt wybranych biotechnik rozrodu mając na względzie usprawnienie hodowli z jednej strony, a z drugiej strony adaptację później tych biotechnik u zagrożonych łasicowatych.

Biotechnikom rozrodu Doktorantka poświęca następny podrozdział. Krótko przedstawia niektóre z nich, zwracając szczególną uwagę na inseminację jako najbardziej popularną z technik wspomagającą rozród (ART). Wskazuje na korzyści jakie płyną z zastosowania tej oraz innych biotechnik w hodowli zwierząt gospodarskich oraz nadzieje jakie związane są z ich wykorzystaniem dla ratowania zagrożonych wyginięciem gatunków zwierząt dziko żyjących. Przytacza podejmowane inicjatywy i tworzone projekty mające na celu zapobiec postępującej degradacji środowiska i ochronić jego zasoby genetyczne. Wskazuje na korzyści jakie mogą płynąć z zastosowania wybranych biotechnik rozrodu w ogrodach zoologicznych, borykających się z ogromnymi problemami w reprodukcji utrzymywanych w nich zwierząt. Zaznacza jednak, że główną barierą ograniczającą wykorzystanie dostępnych metod biotechnicznych w rozrodzie zwierząt dzikich jest niedostateczna wiedza na temat ich biologii rozrodu. Dokładna znajomość przebiegu procesów rozrodczych u samców i samic jest niezbędna do opracowania skutecznych metod ich kontroli i sterowania. W przypadku samców zwierząt dzikich dużym problemem jest pozyskanie nasienia, a następnie właściwa ocena jego jakości i zabezpieczenie w jak najdłuższym okresie zdolności zapładniających plemników. Stąd też opracowanie skutecznych metod kriokonserwacji nasienia i tkanek jest dużym wyzwaniem i nadzieją na zachowanie i powiększenie dostępnych zasobów genetycznych zwierząt zagrożonych wyginięciem.

W następnym rozdziale Autorka charakteryzuje wizona amerykańskiego na tle całej rodziny łasicowatych. Stwierdza, że obecnie wizon amerykański jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych łasicowatych na świecie i w większości krajów uznawany jest za gatunek inwazyjny. Podaje dalej, że biologia rozrodu łasicowatych jest słabo poznana, a tylko dla siedmiu z ponad osiemdziesięciu gatunków są dostępne bardziej szczegółowe dane dotyczące ich reprodukcji. W krótkim zarysie przedstawia charakterystyczne cechy

charakteryzujące rozród wizona i zakres badań wykonanych na tych zwierzętach przez niektórych autorów. Istotnym elementem, ze względu na przynależność wizona do zwierząt gospodarskich i w związku z tym ułatwiony dostęp do materiału badawczego, jest możliwość wykorzystania tego gatunku w badaniach nad biologią rozrodu jako modelowego i opracowania skutecznych technik rozrodu wspomaganego dla dziko żyjących łasicowatych zagrożonych wyginięciem.

W kontekście prowadzonych rozważań w tym podrozdziale szkoda, że Autorka nie rozwinęła niektórych, znanych już w mniejszym lub większym stopniu, zagadnień z zakresu biologii rozrodu nerek zwłaszcza samic, jak np. ciąży i zjawiska diapauzy, zachowania płciowego czy sezonowości rozrodu, co przybliżyłoby czytelnikowi specyfikę rozrodu tych zwierząt i uatrakcyjniło ten rozdział. Praca nie dotyczy bezpośrednio rozrodu samic, stąd też zapewne uznała za zbędne szersze przedstawianie tych zagadnień.

W ostatnim podrozdziale we wstępie Autorka omawia zjawisko plejotropii u wizona amerykańskiego, występujące u wielu zwierząt bytujących w warunkach naturalnych, natomiast w warunkach hodowlanych może być efektem świadomej działalności człowieka w celu otrzymania u niego pożądanых cech. Przedstawia pozytywne i negatywne aspekty występowania tego zjawiska u zwierząt i ludzi, podkreślając jego znaczenie w kontekście zróżnicowanego umaszczenia u nerek.

W podsumowaniu prezentowanego rozdziału wstęp, będącego zarazem przeglądem piśmiennictwa, należy podkreślić jasność, przystępność i przejrzystość formy oraz sposobu przedstawienia informacji z wykorzystaniem starszych i najnowszych materiałów źródłowych. Materiały te poprawnie wyselekcjonowano, a zawarte w nich dane odpowiednio zinterpretowano, co świadczy o dobrej znajomości przez Autorkę omawianej tematyki i dobrym Jej przygotowaniu teoretycznym.

Przed postawieniem celu pracy Autorka przedstawia główne założenia, będące w zasadzie uzasadnieniem podjęcia badań. Nawiązuje do wcześniej już zasygnalizowanej niedostatecznej znajomości zagadnień z zakresu biologii rozrodu łasicowatych i potrzebie wykonania szerszych badań z użyciem najnowszych metod, co pozwoliłoby na opracowanie zaawansowanych technik rozrodu wspomaganego u wizonów fermowych jak również u zagrożonych łasicowatych. Jest to niewątpliwie słuszny punkt widzenia i właściwy kierunek działania, mając na uwadze wcześniejsze rozważania o niekorzystnych skutkach działalności ludzkiej w środowisku i potrzebie zachowania w nim bioróżnorodności.

Biorąc pod uwagę dostęp do materiału i aparatury badawczej, Autorka jasno sformułowała trzy cele badawcze, które konsekwentnie realizowała pod kierunkiem dwóch opiekunów w dwóch jednostkach naukowo-dydaktycznych Uczelni.

W rozdziale materiały i metody zamieszczono informacje na temat zwierząt wykorzystanych w badaniach i warunkach ich utrzymania oraz czynnościach wykonanych w ramach poszczególnych procedur badawczych.

Materiał do badań pobrano od zwierząt po uboju technologicznym, w odpowiednich warunkach i reżimie czasowym, umożliwiającym przeprowadzenie dalszych procedur w laboratorium. Ze względu na zróżnicowanie wiekowe zwierząt od 7 miesięcy do 3 lat wskazana byłaby bliższa ich charakterystyka w tym rozdziale. Co prawda dane te uzupełniono w pewnym zakresie przy omawianiu wyników, ale dobrze byłoby podać je wcześniej.

W przypadku badań morfometrycznych gonad wykonano pomiary długości i szerokości jader, na podstawie których obliczono objętość jąder oraz stworzono i obliczono indeks długości do szerokości jadra. Jadra także zważono, z najądrzami i bez najądrzy. Skoro oddzielono jądra od najądrzy, to dlaczego długość i szerokość jąder podawano łącznie z najądrzami, jakie były tego przesłanki?.

Nasienie pozyskano metodą fragmentacji tkanki jądrowej umieszczonej na szalce z rozrzedzalnikiem trisowym, po czym po przefiltrowaniu poddawano je ocenie wykorzystując najnowsze metody z zakresu diagnostyki andrologicznej. Ocenę ruchliwości nasienia wykonano metodą tradycyjną na szkiełku mikroskopowym pod mikroskopem świetlnym oraz za pomocą systemu CASA, według przyjętych parametrów dla tego systemu stosowanego z powodzeniem od lat w Katedrze Rozrodu Zwierząt z Kliniką Zwierząt Gospodarskich. Podano pełną charakterystykę ruchliwości plemników z poszczególnymi parametrami obrazującymi prędkość oraz specyfikę ich ruchu. Zmierzono również koncentrację plemników.

Badania morfologiczne plemników wykonano na preparatach barwionych metodą Watsona i Martina stosując klasyfikację Bloma z podziałem na plemniki z wadami głównymi i podrzędnymi. Ocenę plemników żywy/martwy w metodzie tradycyjnej przeprowadzono natomiast na preparatach barwionych roztworem eozynowo-nigrozynowym. Przy tej metodzie należałoby podać ilu procentowa była eozyna i nigrozyna oraz jaki był stosunek barwników, względnie podać autora metody.

Dalszą szczegółową ocenę nasienia wykonano za pomocą cytometru przepływowego wykorzystywanego rutynowo w podanej wyżej Katedrze, stosując standardowe procedury barwienia dla różnych gatunków zwierząt. Ocenie poddano ciągłość błon komórkowych

i akrosomu, potencjał błon mitochondrialnych, stopień peroksydacji lipidów, uszkodzeń struktury chromatyny i wielkość zmian apoptotycznych w plemnikach.

Dla wszystkich wskaźników opisano szczegółowo sposób przeprowadzenia pomiarów podając materiały źródłowe jakie wykorzystano przy opracowywaniu metodyki.

Przy ciągłości akrosomu należałoby podać jaką fluorescencję wykazywały plemniki PNA pozytywne.

Ostatnim metodycznym etapem badań było poddanie plemników kriokonserwacji, a następnie sprawdzenie jakości nasienia po rozmrożeniu plemników. Zastosowano standardowe procedury postępowania stosowane przy mrożeniu nasienia wybierając rozrzedzalnik na bazie Tris dostosowując metodykę do posiadanego materiału i warunków.

Autorka wybierając daną metodę opierała się zapewne na pracach innych autorów i doświadczeniu Zespołu, z którym współpracowała, ale co ostatecznie skłoniło Ją do wyboru tej a nie innej metody mrożenia nasienia?

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, dobierając właściwe metody pozwalające na dogłębną weryfikację materiału, dokonanie uogólnień i wyciągnięcie odpowiednich spostrzeżeń i wniosków. Zastosowanie wszechstronnych metod odpowiednio do danej analizy, a następnie interpretacja otrzymanych wyników, świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu w tym zakresie Doktorantki.

W następnym rozdziale pracy scharakteryzowano uzyskane wyniki, prezentując je w formie tabelarycznej i graficznej. Wyniki te są interesujące i dostarczają nowych danych na temat kształtowania się u samców wizona amerykańskiego wybranych wskaźników wielkości jader i jakości nasienia oraz jego przydatności do kriokonserwacji. Wykonane prace świadczą o trafności wyboru problematyki badawczej i znaczeniu realizowanych prac w kontekście zachodzących zmian w środowisku i występujących problemów z płodnością ludzi i zwierząt. Przyczyniając się do poszerzenia wiedzy na temat biologii rozrodu samców wizona amerykańskiego będącego przedstawicielem ogromnej rodziny łasicowatych, niniejsze badania mogą być impulsem do dalszych prac i przyczynić się do opracowania i zastosowania wybranych biotechnik w rozrodzie tych zwierząt. Stąd też badania te należy rozpatrywać w aspekcie poznawczym i praktycznym.

Dobór odpowiednich metod pozwolił Autorce dokonać szerokiej charakterystyki zgromadzonego materiału. Autorka uzyskała konkretne dane dotyczące kształtowania się wybranych cech rozrodczych u samców wizona, poszerzając naszą wiedzę w tym zakresie. Dostarczyła danych na temat kształtowania się wielkości jader u samców w i poza sezonem rozrodczym, potwierdzając sezonowy przebieg procesów rozrodczych u tych zwierząt.

Oszacowane wartości współczynników korelacji Pearsona wykazały, że wszystkie pomiary morfometryczne były ze sobą pozytywnie i istotnie statystycznie skorelowane, co może być ewentualną wskazówką w przyszłych pracach nad wyborem najbardziej odpowiedniej metody oceny wielkości jader. Powiązania między cechami morfometrycznymi potwierdziła także przeprowadzona analiza składowych głównych. Analiza ta wykazała wyraźny rozdział pomiędzy grupami w i poza sezonem rozrodczym, co świadczy o dużych różnicach w uzyskanych pomiarach morfometrycznych.

Interesującym, a jednocześnie zastanawiającym jest brak jednoznacznych powiązań między parametrami charakteryzującymi wielkość gonad a koncentracją plemników. Znanym jest, że wielkość produkcji plemników zależy od wielkości gonad i aktywności nabłonka kanalika nasieniotwórczego danego gatunku. Jakie jest zdanie Doktorantki na ten temat?

Analiza jakości nasienia przeprowadzona została dla samców wizona amerykańskiego tylko w sezonie rozrodczym, natomiast poza sezonem nie udało się pozyskać plemników z najądrzy. Zastosowanie najnowszych metod polegających na komputerowej analizie danych i fluorescencji pozwoliło na określenie wybranych właściwości plemników trzech odmian barwnych tych zwierząt. Autorka stwierdziła, że po zastosowaniu danej metody pozyskania nasienia znajdowało się w nim średnio 38,84% plemników żywych, 43,34% martwych i 17,82% zamierających, przy czym odmiana silverblue charakteryzowała się najwyższą, a odmiana palomino najniższą wartością średnią. U odmiany tej odnotowano także istotnie więcej plemników martwych z uszkodzonym akrosomem (18,08%) w porównaniu do pozostałych dwóch odmian (ok. 8,6%). W przypadku stopnia uszkodzenia chromatyny wykazano, że średnio w badanej grupie 5,14% plemników było ze zdefragmentowanym DNA, a 10,48% było niedojrzałych. Nie stwierdzono istotnego zróżnicowania tej cechy w zależności od odmiany barwnej. W nasieniu największy udział miały plemniki nieapoptyczne, stanowiąc 51,83% w plemnikach żywych i 35,08% w plemnikach martwych, przy czym najbardziej korzystnie parametr ten kształtował się w odmianie silverblue a najmniej korzystnie w odmianie palomino. Większość plemników (80,77%) odznaczała się niskim potencjałem błony mitochondrialnej, przy czym podobnie jak w przypadku poprzednich cech, występowała duża zmienność. Nie wykazano istotnych różnic w tym względzie między odmianami barwnymi. W przeprowadzonej analizie peroksydacji lipidów stwierdzono wyraźnie większy odsetek plemników z niskim wskaźnikiem charakteryzującym cechę (96,3%) przy czym większość z nich stanowiły plemniki martwe (62,06%). Średnio natomiast plemniki żywe z niskim stopniem peroksydacji stanowiły

34,24%. W nasieniu samców palomino takich plemników było istotnie mniej niż w nasieniu samców pozostałych dwóch odmian.

W diagnostyce andrologicznej duże znaczenie ma ocena morfologiczna plemników, ze względu na potwierdzone przez Bloma i innych badaczy wyraźne związki między nieprawidłowościami w budowie plemnika a jego zdolnością zapładniającą. Nie mniej istotna jest również ocena ruchliwości plemników, mając na względzie znaczenie tej specyficznej ich właściwości dla zapewnienia pełnej zdolności do zapłodnienia komórki jajowej. Dlatego przeprowadzenie oceny ruchu plemników z wykorzystaniem systemu CASA podnosi wartość przeprowadzonych badań i dostarcza cennych informacji o kształtowaniu się wskaźników charakteryzujących ruch tych gamet u wizona amerykańskiego.

Wykazano, że najczęściej występującymi wadami morfologicznymi były wady akrosomu, główki oddzielone od wstawki i kropla potoplazmatyczna w położeniu dalszym. Najrzadszymi zaś wady główki, pętla na wicie oraz kropla protoplazmatyczna w położeniu bliższym. Dla większości występujących wad nie wykazano statystycznie istotnych różnic między odmianami barwnymi. Wyjątkiem był odsetek plemników żywych i martwych, dla których to cech wykazano różnice między odmianą silverblue a standard brown. W tradycyjnej ocenie morfologicznej wykazano, że odsetek plemników żywych wynosił około 79% a martwych około 21%. Przy ocenie za pomocą cytometru przepływowego uzyskano odwrotne proporcje, plemniki żywe stanowiły około 39%, martwe około 43%, a zamierające około 18%. Słusznym wydaje się wytłumaczenie tych różnic przez Autorkę czułością metody pomiarowej. Cytometria przepływowa jest bowiem metodą bardziej obiektywną, wybarwione plemniki są zliczane przez komputer a nie badającego. Analiza nasienia przy pomocy systemu CASA wykazała natomiast, że średnio 62,13% plemników było ruchliwych, ale tylko 7% wykazywało ruch progresywny. Wyróżniono trzy grupy prędkości oraz inne parametry szybkości ruchu plemników, stwierdzając różnice między odmianami dla większości pomiarów ruchliwości.

Dla badanych cech nasienia przeprowadzono szczegółową analizę zależności, przedstawiono poszczególne macierze korelacji Pearsona oraz współczynniki korelacji pomiędzy zmiennymi pierwotnymi a daną główną składową dla każdej z 6 wyróżnionych grup danych. Grupy te wytypowano na podstawie analizy poszczególnych zmiennych oraz ich możliwego wpływu na jakość nasienia. Miały one na celu sprawdzenie zależności występujących pomiędzy różnymi badaniami opisującymi podobne cechy lub skupiającymi się wokół jednej cechy, ale opisujące je w różnych aspektach.

Przeprowadzone obszerne analizy zależności między cechami dostarczyły szereg interesujących danych. W większości przypadków wykazane zależności testem korelacji Pearsona potwierdzone zostały analizą składowych głównych. Dlatego wydaje się, że bez szkody dla właściwej interpretacji danych i wyciągania wniosków, można było zrezygnować z części analiz i w obliczeniach szczegółowych uwzględnić tylko najważniejsze parametry charakteryzujące jakość nasienia. Przedstawione zależności w różnych układach metodycznych świadczą niewątpliwie o dążeniu Autorki do jak najgłębszego zbadania problemu, niemniej jednak przy dużej liczbie danych i czasami niejednoznacznych wynikach, jakie z reguły występują przy licznych analizach, utrudnione jest wyciągnięcie prawidłowych wniosków. Rozdział wyniki zawiera aż 82 strony i jest mocno rozbudowany, zwłaszcza o analizy zależności między cechami nasienia.

Interesujące wyniki, o dużym znaczeniu poznawczym i praktycznym, zaprezentowano w podrozdziale dotyczącym kriokonserwacji nasienia. Generalnie, przy zastosowanej metodzie ich pozyskania, potwierdziły one możliwość zachowania podstawowych właściwości plemników po ich zamrożeniu-rozmrożeniu. Pomimo około dwukrotnego spadku po mrożeniu liczby plemników żywych i pozostałych wskaźników, skuteczność całego procesu technologicznego kriokonserwacji nasienia należy uznać za zadawalającą, zachęcającą do dalszych prac nad doskonaleniem metod konserwacji nasienia samców tego gatunku zwierząt. Potwierdzenia wymagałyby zapewne niektóre dane dotyczące kształtowania się wybranych wskaźników ocenianych w cytometrze przepływowym, między innymi wpływu zamrażania na defragmentację chromatyny. W nasieniu mrożonym wykazano bowiem wyraźnie mniejszy odsetek plemników z defragmentacją DNA niż w nasieniu świeżym, przy znacznej zmienności dla tej cechy.

W dalszej części tego rozdziału Autorka szeroko przedstawia zależności między badanymi cechami nasienia świeżego i mrożonego, potwierdzając wcześniejsze już spostrzeżenia dotyczące negatywnego wpływu procesu mrożenia na jakość nasienia. Ta część jest mocno rozbudowana, prezentuje macierze korelacji Pearsona dla analizy CASA w układzie zbiorczym i osobnym dla nasienia świeżego i mrożonego, dostarczając dużą liczbę danych wskazujących na występowanie w niektórych przypadkach złożonych i nie zawsze spójnych zależności. Z niektórych z nich można było zrezygnować, m. in. z szerszego analizowania zmian morfologicznych po mrożeniu, z wyjątkiem stopnia uszkodzenia akrosomu, gdyż w głównej mierze są one wynikiem działalności operatora w czasie obróbki i trudno o wyciągnięcie w takich przypadkach jednoznacznych wniosków. W niniejszych badaniach wady morfologiczne w tym nasieniu nie wykazały żadnych powiązań między sobą.

Wykonanie badań na reprezentatywnej liczbie zwierząt i zastosowanie nowoczesnych metod z zakresu diagnostyki andrologicznej pozwoliło Autorce na dokonanie szczegółowej charakterystyki badanego materiału i uzyskanie interesujących wyników, aczkolwiek nie zawsze jednoznacznych i łatwych do interpretacji. Wzbogacają one naszą wiedzę o biologii rozrodu samców wizona amerykańskiego utrzymywanych w warunkach fermowych, wskazują na możliwości wykorzystania wybranych biotechnik rozrodu i inspirują do dalszych badań.

Uzyskane wyniki udokumentowano i w przekonujący sposób przedstawiono w formie tabelarycznej i graficznej, a czasami jak wyżej wspomniano, poddano bardzo szczegółowej analizie. Autorka interpretuje je w następnym rozdziale, dyskusja. W rozdziale tym wyniki własne porównuje z pracami innych autorów. Ze względu na stosunkowo skromną bazę źródłową w obszarze rozrodu samców wizona, posiłkuje się pracami wykonanymi na innych gatunkach łasicowatych. Utrudnia to w znacznym stopniu dogłębną analizę otrzymanych wyników, skłaniając jednocześnie do podjęcia dalszych prac w tym kierunku. Poszczególne problemy stara się rozwiązać i przybliżyć czytelnikowi w możliwie prosty i zrozumiały sposób. Jak nadmieniono wcześniej przy prezentacji osiągniętych wyników, niektóre zagadnienia dotyczące zależności między cechami nasienia świeżego i mrożonego, przy dużej liczbie danych, często są trudne do interpretacji. Dokonane jednak uogólnienia i próby własne wyjaśnienia niektórych złożonych zależności świadczą o dobrej znajomości tematu przez Autorkę. Wszechstronne natomiast spojrzenie na występujące problemy i wskazanie na potrzebę jak najszerszego wykorzystania najnowszych osiągnięć z zakresu biotechnologii rozrodu dla zachowania bioróżnorodności i ochrony zasobów genetycznych zwierząt oraz widoczna ostrożność i obiektywizm przy formułowanych tezach, to na pewno pozytywne cechy u młodego badacza, świadczące o dojrzałości naukowej Doktorantki.

Po omówieniu wyników Autorka dokonuje podsumowania oraz wyciąga 5 wniosków. W obecnej formie wniosek 2 i 3 podsumowują osiągnięte wyniki dotyczące różnic w jakości nasienia między odmianami barwnymi oraz wskazują na występowanie korelacji między niektórymi cechami. Dobrze byłoby przedstawić co z tych zależności wynika. Mając na uwadze pierwszy cel pracy, pierwszy wniosek należałoby rozwinąć i wskazać na powiązania między wielkością jąder a liczbą plemników.

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano szereg cennych danych o charakterze poznawczym, poszerzającym naszą wiedzę o biologii rozrodu samców wizona amerykańskiego oraz dowiedziono możliwości wykorzystania kriokonserwacji nasienia

w praktyce hodowlanej tego gatunku zwierząt, co nadaje pracy oryginalności. Na podkreślenie zasługuje:

1. Wykonanie wszechstronnych badań z zastosowaniem najnowszych metod diagnostyki andrologicznej nad kształtowaniem się jakości nasienia w sezonie rozrodczym u wizona amerykańskiego w warunkach fermowych, a tym samym wniesienie istotnego wkładu do wspólnego dorobku naukowego w obszarze biologii rozrodu zwierząt.
2. Wykonanie badań morfometrycznych jąder i wskazanie na występowanie różnic sezonowych w wielkości jąder, co może być w przyszłości wykorzystane w kontroli i regulacji przebiegu procesów rozrodczych u samców badanego i pokrewnych gatunków zwierząt.
3. Zastosowanie wybranej metody do mrożenia nasienia wizona amerykańskiego i osiągnięcie zadawalających wyników, co inspirowało i zachęca do dalszych prac w tym kierunku.

Czytając pracę zauważyłem pewne niedociągnięcia natury redakcyjnej i interpunkcyjnej oraz interpretacyjnej, np. w streszczeniu wiersz 9 – miesiącu, powinno być miesięcy; str. 20 (11g) – stosowanie; str. 54 (6d) - brak spacji; str. 84 (5d) – przedstawiona; str. 94 (1g) – badani; str. 97 (8d) – rozrzedzalnika; str. 5 (d) 2x pomiędzy; str. 129 (10d) - jednym; str. 131 (6g) – kontynuowanie.

- w bibliografii w niektórych pozycjach (np. poz. 86, 87) niewłaściwa pisownia czasopism, brak Persson i in., 2011 (str. 124) w wykazie bibliografii;
- w przyjętej formie cytowania autorów, w jednym zdaniu wymieniani są oni dwukrotnie, raz nazwisko bez roku ukazania się artykułu (np. Soule i in.), a drugi raz z rokiem (Soule i in. 1986). Proponowałbym podawać rok przy pierwszym razie wymieniania autora.
- przy powtórnym cytowaniu głównego współautora jest on czasami podawany jak samodzielny autor (np. str. 127, 128 - Ahmad i in. 1975 oraz Ahmad).
- w przyjętych sformułowaniach przez Autorkę czasami liczby wyrażone są procentowo – np. str. 50 – Średnia liczba plemników ze zdefragmentowanym DNA w badanej grupie wyniosła 5,14%..... . Poprawniej byłoby podać np. W badanej grupie plemniki ze zdefragmentowanym DNA stanowiły 5,14%..... , lub użyć innej formy.
- na str. 123 (15g) w drugiej części zdania zamiast „...średnia koncentracja plemników (SC) wynosiła 5,4-7,4 x 10⁶ na ejakulat, należałoby podać „...średnia liczba plemników.....”.
- w spisie treści proponowałbym ponumerować rozdziały i podrozdziały.

Powyższe nieliczne jak na objętość dysertacji pomyłki literowe i inne niedociągnięcia nie mają większego wpływu na wartość merytoryczną pracy, która została napisana jasno i przejrzysto, poprawnie pod względem stylistycznym i gramatycznym. Podjęta problematyka badawcza i uzyskane interesujące, aczkolwiek czasami niejednoznaczne i trudne do interpretacji wyniki, skłaniają do refleksji i inspirują do dalszych prac w omawianym temacie, co jest niewątpliwie pozytywnym aspektem pracy.

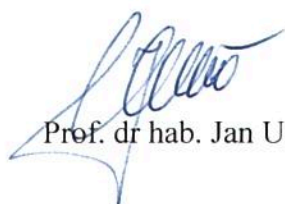
Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma walory poznawcze i użytkowe, poszerza wiedzę z zakresu biologii rozrodu samców wizona amerykańskiego mogących służyć jako zwierzęta modelowe i być przydatne w badaniach na innych gatunkach łasicowatych, zwłaszcza zagrożonych wyginięciem. Praca ta ze względu na podjętą aktualną tematykę badawczą, przyjęte rozwiązania metodyczne, osiągnięte interesujące wyniki i sposób ich interpretacji, wnosi nowe wartości do wspólnego dorobku myśli naukowej i przyczynia się do rozwoju badań w uprawianej dyscyplinie naukowej.

Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych z zakresu diagnostyki andrologicznej w realizacji badań, które pozwoliły Autorce wykonać postawione zadania i osiągnąć zamierzony cel. Na gruncie dociekań naukowych uzyskała interesujące wyniki, zachęcające do dalszych prac nad poznaniem przebiegu procesów rozrodczych u wizona amerykańskiego, co może przyczynić się do opracowania i szerszego wykorzystania biotechnik w rozrodzie tego oraz pokrewnych mu gatunków zwierząt. Praca napisana została jasno i przejrzysto, a Autorka potrafiła przedstawić trudne zagadnienia w przystępnej formie. Świadczy to o Jej dojrzałości naukowej i posiadanej wiedzy w podjętym temacie.

*Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Patrycji Izabeli Waclawik pt. „Zastosowanie biotechnik rozrodu w reprodukcji wizona amerykańskiego (*Neogale vison*)” odpowiada wymogom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2017r., poz. 1789 t.j.) w związku z art. 179 ust. 2 oraz ust. 3 pkt. 2b Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 ze zm.)*

Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Dyscypliny Zootechniki i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr inż. Patrycji Izabeli Waclawik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. Jan Udała

Szczecin, 24 sierpnia 2022 roku