

Olsztyn, 31.08.2022 r.

Dr hab. Janusz Strychalski
Katedra Hodowli Zwierząt Futerkowych i Łowiectwa
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Doroty Grabolus pt. „Analiza podłoża fizykochemicznego i molekularnego barwy okrywy włosowej gatunku *Mustela putorius furo*”, wykonanej na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt, w Katedrze Genetyki, pod kierunkiem promotora dr hab. inż. Heliodora Wierzbickiego, prof. uczelni oraz promotor pomocniczej dr hab. inż. Magdaleny Zatoń-Dobrowolskiej, prof. uczelni.

Zootechnika jest nauką o chowie i hodowli nie tylko zwierząt gospodarskich, od których uzyskuje się mięso, mleko, jaja czy skóry. Obiektem jej dociekań są również tak zwane zwierzęta amatorskie, utrzymywane w celach głównie hobbystycznych, a nie produkcyjnych. Należą do nich m. in. różne gatunki zwierząt wodnych, wiele gatunków gryzoni, gadów, a coraz częściej także króliki. Specyficzną grupę zwierząt amatorskich stanowią zwierzęta towarzyszące, pozostające w szczególnej więzi emocjonalnej z człowiekiem, czyli pies domowy i kot domowy. Udomowiana odmiana drapieżnego ssaka - tchórza zwyczajnego (forma dzika: *Mustela putorius*, forma udomowiona: *Mustela putorius furo*), nazywana powszechnie tchórzofretką lub fretką, jest utrzymywana głównie jako zwierzę amatorskie. Szacuje się, że w Wielkiej Brytanii hoduje się amatorsko ponad 100 tys. tych zwierząt, w Niemczech około 115 tys., we Francji około 300 tys., a w Stanach Zjednoczonych około 5 mln. Zwierzęta te są traktowane często na równi z psami i kotami, dlatego można je nawet uznać za zwierzęta towarzyszące. Udomowioną formę tchórza utrzymuje się również w niewielkiej liczbie na fermach futrzarskich w ramach programu ochrony zasobów genetycznych, ponadto jako pomocników myśliwych, a także jako zwierzęta laboratoryjne.

Podobnie jak w komercyjnych hodowlach zwierząt futerkowych, w hodowli amatorskiej ssaków bardzo ważną dla hodowców kwestią jest umaszczenie zwierząt, a u wielu gatunków rzadkie umaszczenia są szczególnie cenione. Autorka pracy, mgr inż. Dominika Dorota Grabolus, podkreśla jednak, że umaszczenie zwierząt odgrywa nie tylko rolę estetyczną

dla człowieka, ale też spełnia kluczowe funkcje ważne dla przetrwania zwierząt: możliwość ukrycia się, komunikację oraz nie mniej istotną regulację procesów fizjologicznych. Doktorantka Dominika Dorota Grabolus zauważa, że gatunki ssaków hodowane przez człowieka charakteryzują się zdecydowanie większą różnorodnością umaszczeń od swoich dzikich (nieudomowionych) przodków i krewnych. Najczęstszym umaszczeniem *Mustela putorius furo* pozostaje do dzisiaj standardowe, dziedziczone po dzikich przodkach. Zwierzęta umaszczone standardowo cechuje ciemne zabarwienie włosów pokrywowych, spośród których jednak prześwitują, zwłaszcza na bokach ciała, jasne włosy puchowe. Bardzo charakterystyczną cechą wyglądu tych zwierząt jest również tzw. maska, tworzona przez obramowanie ciemnego zabarwienia włosów wokół oczu zabarwieniem jasnym (właściwie białym). Bardzo jasne są również końce uszów tych zwierząt. Poza umaszczeniem standardowym, istnieje wiele innych - tak wiele, że współcześnie do oznaczenia umaszczenia u *Mustela putorius furo* używa się specjalnego klucza uwzględniającego 1) barwę podstawową, 2) koncentrację tej barwy oraz 3) występowanie białych plam, znaczeń i wzorów.

Tematyka poruszana w pracy przed Doktorantką, mgr inż. Dominikę Dorotę Grabolus jest bardzo aktualna i z pewnością przyczynia się do lepszego zrozumienia trudnej i skomplikowanej kwestii fizykochemicznego i molekularnego podłoża występowania barw okrywy włosowej u gatunku *Mustela putorius furo*. Autorka pracy obrała ambitny cel zidentyfikowania przyczyn zróżnicowania umaszczenia u tego gatunku. Tematyka pracy jest z pewnością uniwersalna i wykracza poza gatunek *Mustela putorius furo*, gdyż, jak podkreśla sama autorka, „istnieje wiele przykładów zbieżnej ewolucji barwy ssaków”. Należy też podkreślić, że nadal brak jest podstawowej wiedzy na temat genetyki umaszczeń u *Mustela putorius furo*. Co prawda, w ostatnich latach przeprowadzono analizy dziedziczenia umaszczenia u tego gatunku na podstawie dostępnych rodowódów, jednak nie przyniosły one jednoznacznych odpowiedzi. Tak więc, wybór tematu rozprawy doktorskiej mgr inż. Dominiki Grabolus uważam za trafny i celowy.

Rozprawę doktorską przygotowano według zasad przyjętych dla tego typu prac. Obejmuje ona łącznie 138 stron i podzielona jest na następujące zasadnicze rozdziały: 1) Wstęp i przegląd literatury, 2) Cel pracy i hipotezy badawcze, 3) Materiał i metody, 4) Wyniki i dyskusja, 5) Podsumowanie i wnioski, 6) Literatura. W tym ostatnim rozdziale przedstawiono wykaz 166 pozycji piśmiennictwa, w tym 154 obcojęzycznych. W rozprawie zamieszczono 25 tabel, 67 fotografii oraz 9 rysunków.

W mojej opinii, tytuł pracy dobrze oddaje jej zawartość, bowiem podjęta tematyka obejmowała, u różnych odmian barwnych gatunku *Mustela putorius furo* 1) identyfikację i

charakterystykę pigmentu zawartego we włosach przy użyciu metod chemicznych, 2) określenie rozłożenia pigmentu we włosach, układu ziaren melaniny i zmienności w budowie łusek oskórka – z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego, oraz 3) analizę polimorfizmu genów *Asip*, *Mc1r* i *Tyrp1*.

W pierwszym rozdziale pracy wydzielono podrozdziały „Wstęp” oraz „Przegląd literatury”. We „Wstępie” autorka krótko opisała historię i współczesne „wykorzystanie” przez człowieka gatunku *Mustela putorius furo*, a także wprowadziła tematykę umaszczenia ssaków w kontekście jego uniwersalności. „Przegląd literatury” podzielono na podrozdziały obejmujące takie zagadnienia jak budowę włosów i okrywy włosowej, podanie klucza oznaczania umaszczeń u gatunku *Mustela putorius furo*, opisanie procesu pigmentacji włosów, oraz biochemiczne i molekularne podstawy powstawania umaszczeń u ssaków wraz z omówieniem roli antagonistycznych w oddziaływaniu białek *Asip* i *Mc1r*, a także białka *Tyrp1*, które w dużym stopniu regulują procesami biosyntezy melaniny.

W rozdziale „Cel pracy i hipotezy badawcze” postawiono cztery hipotezy oparte o trzy główne cele pracy. Rozdział napisany został zwięźle i właściwie sprecyzował przyjęty cel badań.

Rozdział „Materiał i metody” jest objętościowo dość obszerny, liczy 18 stron komputeropisu. Składa się z opisu materiału badawczego, będącego włosami (wraz z cebulkami) pobranymi w okresie wymiany okrywy włosowej z trzech partii ciała 104 osobników gatunku *Mustela putorius furo*. Następnie opisano metodykę badań fizykochemicznych włosów oraz polimorfizmu DNA z odciętych od włosów cebulek włosowych. Należy docenić, zwłaszcza w kontekście badań genetycznych, duży nakład pracy wniesiony przez Doktorantkę.

W kolejnym rozdziale „Wyniki i dyskusja”, będącym objętościowo najobszerniejszym (liczy 79 stron), autorka pracy bardzo szczegółowo przedstawiła wyniki swojej pracy i umiejętnie je omówiła, z wykorzystaniem literatury przedmiotu. Wyniki zaprezentowano sukcesywnie, zgodnie z układem poprzedniego rozdziału i podparto je bardzo dobrej jakości, czytelnymi fotografiami. Fotografie te przedstawiają obrazy z mikroskopu i ze skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) melanosomów, obrazy SEM łusek oskórka włosów, a także elektroforegramy z optymalizacji reakcji PCR fragmentów analizowanych genów. W rozdziale zamieszczono także rysunki obrazujące podobieństwa i różnice wybranych fragmentów genu *Tyrp1* między różnie umaszczonymi osobnikami gatunku *Mustela putorius furo* oraz standardowo umaszczonym osobnikiem gatunku *Neogale vison*, a także rysunki przedstawiające schematy drzew filogenetycznych. Należy podkreślić, że pomimo dużej

obszerności całego rozdziału, autorce udało się zachować przejrzystość ujęcia zagadnień cząstkowych w logiczną całość.

W rozdziale „Podsumowanie i wnioski” autorka krótko przypomniała, jaki był cel podjętej tematyki badań, następnie przeszła do podsumowania uzyskanych przez siebie wyników (w 4 punktach), a finalnie sformułowała wypływające z pracy wnioski (w 6 punktach).

Korzystając z przywileju recenzenta ocenianej rozprawy doktorskiej oraz w trosce o jakość przyszłych publikacji naukowych i być może opracowania w formie na przykład monografii naukowej, przedstawiam poniżej swoje uwagi. Pragnę jednak zaznaczyć, że większość z nich ma charakter polemiczny, chociaż w niektórych wskazuję na dostrzeżone drobne uchybienia.

Wstęp

- W tytule pracy użyto łacińskiej nazwy gatunku, czyli *Mustela putorius furo*, jednak już w pierwszym zdaniu rozprawy doktorskiej autorka napisała: „Fretka (*Mustela putorius furo* L. 1758) nazywana również fretką domową, tchórzofretką lub tchórzem hodowlanym, jest niewielkim ssakiem drapieżnym z rodziny łasicowatych (*Mustelidae*), będącym podgatunkiem tchórza europejskiego (*Mustela putorius*) oraz jego udomowioną formą”. Chciałbym jednak zauważyć, że nazywanie omawianego gatunku fretką czy tchórzofretką budzi wątpliwości. Uważam, że ponieważ cała praca dotyczy tego gatunku, autorka powinna nieco szerzej, chociaż w kilku zdaniach omówić problematykę polskiego nazewnictwa *Mustela putorius furo*, istnieje bowiem wiele nieporozumień językowych związanych z tym gatunkiem. Polskie źródła zootechniczne określają fretkę jako albinotyczną odmianę tchórza (np. Bednarz 1976 w opracowaniu „Hodowla tchórzofretek”, Gorazdowski 2008 w opracowaniu „Małe ssaki terraryjne”, Jeżewska i Socha 2013 w kompendium-podręczniku akademickim „Chów i hodowla zwierząt”, Kowalska i Bielański 2013 w publikacji przeglądowej „Udomowienie mięsożernych zwierząt futerkowych - tchórz wczoraj i dziś”). Maciejowski (1987 w artykule popularno-naukowym pt. „Tchórz hodowlany czy tchórzofretka”, Hodowca Drobного Inwentarza 3: 10-11) wyraził pogląd, że nazwa tchórzofretka nie jest prawidłowa, gdyż sugeruje, iż jest to równorzędny mieszaniec dwóch gatunków (fretki i tchórza), a przecież fretka jest również tchórzem. Maciejowski zaproponował więc powrót do nazwy „tchórz”, a żeby odróżnić formy dziką i udomowioną zaproponował dodawanie do formy udomowionej drugiego członu: „hodowlany”. Powyższe nie znaczy, że nie zgadzam się z zastosowaną w ocenianej rozprawie doktorskiej nomenklaturą, czyli nazywaniem osobników hodowanych amatorsko fretkami, a hodowanych na fermach tchórzami hodowlanymi, zwłaszcza że „fretka”

jest spolszczeniem angielskiego słowa „ferret”, a „tchórzofretka” nie ma swojego odpowiednika w języku angielskim. Jak wspomniałem jednak wyżej, uważam że autorka mogła - chociażby krótko – omówić problematykę polskiego nazewnictwa tego gatunku i wyjaśnić, dlaczego zdecydowała się na takie wersje. W kolejnym zdaniu autorka napisała, że „Fretki zostały poddane domestykacji...”. Sądzę, że został tu użyty skrót myślowy, ponieważ, jak napisano zdanie wcześniej, fretka jest już udomowioną formą tchórza.

- W pracy stosowana jest najnowsza łacińska nomenklatura dla gatunku *Neogale vison*, natomiast najnowszą wersją polską nie jest norka amerykańska, lecz wizon amerykański. Stosowanie starej polskiej nazwy gatunku uważam za dopuszczalne, zwłaszcza że nadal szeroko ona funkcjonuje, jednak sugeruję, aby przy pierwszym użyciu dodać w nawiasie jej nazwę najbardziej aktualną.

- Na stronie 11 autorka wyraziła zdanie, że „zmienności fenotypu umaszczeń były jednymi z pierwszych odziedziczalnych cech badanych przez genetyków zwierząt”. Dlaczego użyto określenia „odziedziczalnych” zamiast „dziedziczonych”?

Przegląd literatury

- Na stronie 13 autorka napisała, że włosy puchowe mają największy udział w okrywie włosowej, nie doprecyzowała jednak o jaki udział chodzi. Ilościowy?

- Na stronie 14 w jednym miejscu napisano, że w podstawowym wzorze umaszczenia fretek i tchórzy hodowlanych występuje „ciemna maska wokół oczu, która otoczona jest jasnym futrem...”, a w drugim miejscu napisano, że „futro wokół oczu i na końcach uszu jest białe”. Rozumiem, że w drugim przypadku autorka dokonała skrótu myślowego?

- Na stronie 15 zawarto informacje o klasyfikacji umaszczeń według dwóch zagranicznych stowarzyszeń zrzeszających amatorskich hodowców fretek. Gdyby mgr inż. Dominika Dorota Grabolus pokusiła się w przyszłości o napisanie monografii o hodowli gatunku *Mustela putorius furo*, proponowałbym rozszerzyć pewne informacje. Uważam, że można by rozróżnić białe znaczenia od łat i wzorów. Ponadto, celowe byłoby scharakteryzowanie umaszczeń i nadanie im nazw w języku polskim. Na przykład, wobec barw podstawowych, można zaproponować następujące polskie określenia: szampańska (ewentualnie: pastelowa), cytrynowa, czekoladowa, sobolowa (ewentualnie: śniada), czarna sobolowa, czarna. Do określenia zasięgu białych znaczeń, łat i wzorów można by stosować takie określenia jak: umaszczenie standardowe (z maską), łaciate, syjamskie, arlekin, białe paznokcie czy skarpeta itp.

- Na stronie 20 autorka stwierdza, powołując się na piśmiennictwo, że całkowicie eumelanistyczne umaszczenie może wynikać nie tylko z mutacji genu *Mc1r* (czyli w *locus* E),

ale również w *locus* Agouti. Według mnie, brak feomelaniny we włosach ssaków zawsze jest efektem mutacji w *locus* Agouti determinującej upośledzenie funkcji białka Asip, natomiast odpowiednie allele w *locus* E (nie wszystkie) umożliwiają produkcję eumelaniny. Tak więc, należałoby, wedłu mnie, uznać, że wystąpienie całkowicie eumelanistycznego umaszczenia nie tylko „może” ale „musi” wynikać ze współdziałania obu genów.

Material i metody

- na stronie 25 nie dodano symboli literowych do zdjęć.
- strona 51: uważam, że mogłyby zostać opisane w języku angielskim skróty DHI oraz DHICA.

Wyniki i dyskusja

- na stronie 77: warto byłoby podać łacińskie nazwy gronostaja europejskiego, sobola tajgowego i norki amerykańskiej.

- strona 89: autorka, powołując się na pozycje literatury, formułuje następujące zdanie: „Wyżej wymienione koncentracje barwy można porównać do mutacji w obrębie *locus* Agouti, które zostały odnotowane u psów (solid, sable i sadle)”. Moim zdaniem, należałoby rozwinąć tę myśl. U gatunku pies domowy w *locus* A zidentyfikowano serię alleli $a^y > a^w > a^l > a$, z których każdy poprzedni dominuje nad następnym. Efektem działania tych alleli są (w uproszczeniu) następujące barwy: śniada (lub ruda lub sobolowa), wilcza, podpalana oraz recesywna czarna. Należałoby następnie odnieść te barwy do określeń użytych powyżej przez autorkę.

Podsumowanie i wnioski

- Podczas prowadzenia badań może okazać się że, z różnych przyczyn, nie wszystkie postawione wcześniej cele udało się zrealizować. Mimo podjętych prób i starań, wystąpiły problemy z niezgodnością otrzymanych sekwencji genu Asip z sekwencjami zapisanymi w GenBanku, autorka zawiesiła więc dalsze analizy tego genu. Tego jednego celu nie udało się więc zrealizować. Uważam wobec tego, że sentencję „Przeprowadzone badania umożliwiły realizację celów badawczych i pozwoliły na weryfikację postawionych w pracy hipotez” należałoby nieco „złagodzić” lub też powinna znaleźć się w niej informacja o niemożliwości uzyskania wyników badań genu Asip.

- W punkcie 1 wniosków szeroko nawiązano do różnych gatunków ssaków i ptaków, dlatego warto byłoby rozszerzyć punkt 1. hipotez badawczych.

W całej pracy dostrzegłem kilka niewielkich błędów językowych, głównie tzw. literówek. Zazaczyłem ich obecność bezpośrednio w manuskrypcie, który udostępnię Doktorantce.

Powyższe uwagi, jak napisałem wcześniej, mają charakter głównie polemiczny. Pragnę oświadczyć, że nie wpływają one na moją pozytywną ocenę pracy. Ogólnie dysertację oceniam bardzo wysoko. Uważam, że Doktorantka podczas przygotowywania rozprawy wykazała się znaczną wiedzą oraz umiejętnością prowadzenia złożonych badań i analiz naukowych. Uzyskane przez Doktorantkę mgr inż. Dominikę Grabolus wyniki mają nie tylko wysoką wartość naukową, ale też aplikacyjną. Wyniki podnoszą stan wiedzy na temat fizykochemicznego i molekularnego podłoża występowania umaszczeń okrywy włosowej gatunku *Mustela putorius furo* oraz – poprzez analogie – u innych gatunków zwierząt. Ponadto, warto byłoby zaprezentować wyniki dysertacji szerokiej grupie hodowców-amatorów tego gatunku. Pomogłoby im to podejmować trafniejsze wybory hodowlane dotyczące uzyskiwania pożądaných wariantów umaszczeń.

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa doktorska pt. „**Analiza podłoża fizykochemicznego i molekularnego barwy okrywy włosowej gatunku *Mustela putorius furo***” przygotowana przez mgr inż. Dominikę Dorotę Grabolus spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017 poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 2, ust. 3 pkt 2b Ustawy z dnia 3.07.2018 r., przepisami wprowadzającymi ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 ze zm.) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika.

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr inż. Dominiki Doroty Grabolus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Janusz Strycharzki