

Olsztyn, 17.09.2026 r.

dr hab. inż. Lech Kirtiklis, prof. UWM
Katedra Zoologii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Rafała Rożyńskiego pt.

Zastosowanie inżynierii genomowej i hormonalnego odwracania płci w rozrodzie

lipienia europejskiego (*Thymallus thymallus*)

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. inż. Konrada Ocalewicza w Katedrze Biologii Morza i Biotechnologii Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego. Problematyka przedstawionej pracy doktorskiej koncentruje się na możliwości wsparcia rozrodu lipienia europejskiego (*Thymallus thymallus*) przy pomocy hormonalnego odwracania płci oraz narzędzi z zakresu inżynierii genomowej w obliczu spadku liczebności populacji tego gatunku w miejscach jego naturalnego występowania jak i utraty jego integralności genetycznej. Wart podkreślenia jest także fakt, że autor dysertacji, oprócz niewątpliwie istotnej roli biologicznej lipienia europejskiego, zwrócił także uwagę na wysoką wartość badanego gatunku z punktu widzenia działalności wędkarskiej. Umiejętne połączenie badań w obu wyżej wymienionych obszarach uważam za interesujące i oryginalne podejście.

Na ocenianą rozprawę doktorską składają się cztery publikacje naukowe, zaś przedstawione opracowanie zostało podzielone na dwie części. Pierwsza z nich, napisana w języku polskim, zawiera 48 stron i obejmuje spis publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, Streszczenia (w językach polskim i angielskim), Wstęp, Cel i zadania badawcze, Materiały i metody, Wyniki realizacji zadań badawczych, Podsumowanie, Wnioski, Bibliografię. Druga zaś część manuskryptu dysertacji to kopie czterech publikacji stanowiących rozprawę doktorską wraz z oświadczeniami współautorów dotyczącymi udziału. Przedstawione publikacje posiadają łączny współczynnik wpływu IF=14,1 oraz 440 pkt na podstawie danych MNiSW i MEiN (obie wartości uwzględniają rok publikacji). Pan mgr Rafał Rożyński był pierwszym autorem w każdej z wymienionych publikacji i, zgodnie z załączonymi

oświadczeniami, jego udział w każdej z nich był wiodący, i został oszacowany na 60% a obejmował pełnienie roli głównego wykonawcy kluczowych etapów prac badawczych, w tym przygotowanie założeń naukowych oraz opracowanie metodologii, prowadzenie prac eksperymentalnych, gromadzenie i walidację danych, ich analizę statystyczną jak i merytoryczną interpretację wyników.

W pierwszej z powyższych publikacji z roku 2023 (czasopismo Aquaculture), porównano możliwość wykorzystania naświetlanego przy pomocy promieniowania UV heterologicznego nasienia pstrąga tęczowego (*O. mykiss*) oraz homologicznego nasienia lipienia (*T. thymallus*) w procesie indukcji gynogenezy lipienia. Po zastosowaniu nasienia homologicznego znajdowano materiał ojcowski u osobników gynogenetycznych, zaś w przypadku użycia nasienia heterologicznego identyfikowano tylko obecność materiału matczynego. Na podstawie otrzymanych wyników, stwierdzono, że wykorzystanie nasienia pstrąga tęczowego w procesie gynogenezy lipienia połączonej z użyciem szoku ciśnieniowego jest wiarygodną i szybką metodą produkcji osobników wyłącznie samiczych.

W drugiej z wymienionych prac, opublikowanej w roku 2025 w czasopiśmie Animals, analizowano rozwój gonad oraz parametry hematologiczne i biochemiczne triploidalnych osobników lipienia uzyskanych z użyciem szoku ciśnieniowego w zestawieniu z diploidalnymi osobnikami tego gatunku. Stwierdzono, że osobniki triploidalne wykazywały podwyższoną liczbę krwinek białych (WBC), większą masę hemoglobiny w erytrocycie (MCH) i wyższą średnią zawartość hemoglobiny w erytrocycie (MCHC), natomiast niższe wartości parametrów w odniesieniu do liczby krwinek czerwonych (RBC), stężenia hemoglobiny (Hb), hematokrytu oraz średniej objętości erytrocytu (MCV). Ponadto, stwierdzono, że jajniki osobników triploidalnych były zredukowane i pozbawione oocytów, zaś jądra triploidów miały zwartą strukturę i nie wytwarzały plemników.

W trzeciej z przedstawionych publikacji z roku 2025 (czasopismo Aquaculture Reports), poddano analizie porównawczej tempo wzrostu, przeżywalność, konkurencję pokarmową oraz łowność osobników diploidalnych i triploidalnych lipienia. Stwierdzono, że dwa pierwsze parametry przyjmują zbliżone wartości u osobników diploidalnych jak i triploidalnych, natomiast osobniki diploidalne wykazywały się większą efektywnością pod kątem zdobywania pokarmu. Jeśli zaś chodzi o łowność, to nie zanotowano istotnych różnic pomiędzy osobnikami o odmiennej ploidii.

Natomiast w ramach ostatniej publikacji z roku 2025 (czasopismo Animals), badano efektywność maskulinizacji hormonalnej lipienia przy użyciu 11β -hydroksyandrostendionu (OHA) i 17α -metylotestosteronu (MT). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że pierwszy z wymienionych czynników efektywnie wpływa na maskulinizację cech zewnętrznych, zaś dużo słabsze działanie wykazuje w obrębie gonad. Natomiast 17α -metylotestosteronu okazał się być bardziej efektywny w obrębie gonad niż OHA, jednakże nie uzyskano w pełni funkcjonalnych neosamców, co

może wskazywać na potrzebę dalszych badań w kierunku optymalizacji dawek wspomnianego czynnika.

Zważywszy na fakt, że wymienione wyżej cztery prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach i tym samym zostały poddane wnikliwej ocenie merytorycznej, moją recenzję odniosę głównie do polskojęzycznej części przedłożonego opracowania.

We Wstępie Doktorant klarownie i systematycznie przedstawia kwestie związane z degradacją ekosystemów na skutek zanieczyszczeń, z zanieczyszczeniami genetycznymi włącznie, popierając je stosownymi przykładami dotyczącymi wielu gatunków ryb. Następnie charakteryzuje lipienia europejskiego w kontekście gatunku zagrożonego wraz z uwypukleniem zanieczyszczenia genetycznego jego populacji i konsekwencji tego stanu. Po czym Autor wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z triploidyzacją spontaniczną i indukowaną oraz wykorzystaniem tej ostatniej w akwakulturze oraz znaczeniem triploidów w wędkarstwie. Kończącym zaś etapem tego rozdziału jest przeprowadzenie czytelnika przez kolejne etapy procesu produkcji triploidalnego samczego materiału zarybieniowego wraz jasnym wskazaniem w nim na rolę gynogenezy i hormonalnej maskulinizacji samic.

Powyższe informacje pozwoliły Doktorantowi na sformułowanie głównego celu pracy brzmiącego „określenie wpływu trzech zestawów chromosomów ($3n$) na rozwój gonad, przeżywalność, tempo wzrostu i atrakcyjność wędkarską lipienia europejskiego oraz próba opracowania warunków produkcji wyłącznie samczych triploidalnych osobników tego gatunku”. W celu realizacji celu głównego, Autor zaplanował realizację pięciu następujących zadań badawczych:

1. Analizę makroskopową i porównawczą struktury oraz stopnia rozwoju gonad u diploidalnych i triploidalnych lipieni europejskich, obejmującą ocenę ich funkcjonalności rozrodczej.
2. Ocenę przeżywalności, tempa wzrostu oraz konkurencji pokarmowej diploidalnych i triploidalnych lipieni.
3. Porównanie łowności oraz waleczności diploidalnych i triploidalnych lipieni w standaryzowanych warunkach imitujących środowisko rzeczne.
4. Opracowanie i optymalizację procedury indukcji gynogenetycznego rozwoju u lipienia europejskiego w celu uzyskania wyłącznie samczego potomstwa.
5. Opracowanie i ocena skuteczności hormonalnej maskulinizacji lipienia europejskiego z zastosowaniem 11β -hydroksyandrostendionu (OHA) oraz 17α -metylotestosteronu (MT) w celu uzyskania funkcjonalnych neosamców.

W następnym rozdziale zatytułowanym Materiały i metody, Doktorant starannie opisał metodykę badań wraz z dokładną charakterystyką ryb użytych do poszczególnych analiz. Należy tu

podkreślić, że wachlarz zastosowanych w pracach narzędzi badawczych jest dosyć szeroki i obejmował między innymi technikę szoku ciśnieniowego, rozmazy krwi obwodowej, cytometrię przepływową, analizę makroskopową gonad, techniki cytogenetyczne, inaktywację materiału genetycznego promieniowaniem UV, hormonalną maskulinizację, techniki biologii molekularnej czy technikę połowów wędkarskich. Do tej części pracy w zasadzie nie mam większych uwag, poza jedną dotyczącą terminologii. Na stronie 25 w ramach opisu podpunktu 3.7. Opracowanie metody indukcji gynogenezy u lipienia europejskiego, Autor pisze „Uzyskane nasienie wykorzystano następnie do aktywacji jajek lipienia”. Podobnie na stronie 29 w opisie wyników zadania nr 4 czytamy „W przypadku jajek od jednej z samic przeżywalność gynogenetycznych embrionów w stadium zaoczkowania była zbliżona do wyników uzyskanych w grupie kontrolnej” i także na stronie 30 „Wszystkie osobniki, które się wykluły z jajek aktywowanych nasieniem heterologicznym były genetycznymi samicami”. Myślę, że termin „jajka” nie jest adekwatny w przypadku przytoczonych opisów i bardzo łatwo można zamienić go na właściwy, zależnie od kontekstu.

W następnym rozdziale, Autor przedstawił szczegółowo opisane wyniki z podziałem na poszczególne zadania badawcze. Generalnie, ta część pracy jest rzeczowa i pozwala czytelnikowi zapoznać się z najważniejszymi osiągnięciami uzyskanymi w ramach prezentowanych badań. Myślę, że tylko w przypadku opisu wyników Zadania nr 3 pomocne okazałoby się podanie zakresów lub maksymalnych wartości punktowych poszczególnych parametrów takich jak łowność czy waleczność, co z pewnością stanowiłoby ułatwienie pod kątem zapoznania się z powyższymi wynikami bez konieczności odwoływania się do publikacji.

W kolejnych dwóch rozdziałach tej części pracy, Doktorant podsumował najważniejsze osiągnięcia oraz te elementy, których nie udało się zrealizować w ramach opisywanych badań, po czym przedstawił 5 trafnych wniosków. Ostatnim rozdziałem, polskojęzycznej części opracowania jest zbiór pozycji bibliograficznych w liczbie 136.

Po zapoznaniu się zarówno z publikacjami będącymi podstawą rozprawy doktorskiej jak i polskojęzycznym opisem badań, proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

1. W jaki sposób dobrano parametry sesji wędkarskich (muchowych) pod kątem ich długości oraz liczby?
2. W jaki sposób dokonano wyboru loci mikrosatelitarnych użytych do kontroli obecności materiału ojcowskiego podczas oceny skuteczności gynogenezy?
3. Czym autor tłumaczy różnice w przeżywalności lipienia w stadium dojrzałości w grupie triploidalnej (do 56,8 %) w stosunku do grupy diploidalnej (do 65,0 %)?
4. Proszę przybliżyć mechanizm pojawiania się fragmentów jądrowego genomu ojcowskiego w genomie potomstwa gynogenetycznego w przypadku stosowania nasienia homologicznego.

5. W Podsumowaniu (str. 32) Autor stwierdza: "że zarówno 11 β -hydroksyandrostendion, jak i 17 α -metylotestosteron wpływają na proces różnicowania płci u lipienia europejskiego, jednak uzyskane wyniki nie pozwalają jeszcze na efektywną produkcję funkcjonalnych neosamców tego gatunku". Zatem, czy i, jeśli tak, to jakie dalsze kroki zamierza Autor podjąć w celu podniesienia wspomnianej efektywności?

Podsumowując, niniejszą rozprawę doktorską oceniam wysoko, zaś drobne uwagi nie pomniejszają jej wartości merytorycznej. Z całą pewnością warto podkreślić, że przedstawione w dysertacji wyniki badań są ciekawe i nowatorskie, o dużym potencjale poznawczym jak i w dużej części aplikacyjnym. Poszerzają wiedzę z zakresu biologii, fizjologii czy ekologii lipienia europejskiego oraz technik związanych ze wsparciem rozrodu tego gatunku. Wspomniane tu informacje mogą być skutecznie wykorzystane w ochronie gatunkowej dziko żyjących populacji lipienia europejskiego jak również w zastosowaniach akwakulturowych. Niewątpliwą zaletą niniejszych badań jest także wskazanie na ich wartość z punktu widzenia działalności wędkarskiej. Ponadto, przedstawione w dysertacji wyniki wskazują na fakt potrzeby kontynuowania badań.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. inż. Rafała Rożyńskiego pt. Zastosowanie inżynierii genomowej i hormonalnego odwracania płci w rozrodzie lipienia europejskiego (*Thymallus thymallus*) spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2024 r., poz. 1571) stawiane kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr. inż. Rafała Rożyńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę oryginalność badań, ich wysoki stopień poznawczy i aplikacyjny oraz innowacyjne podejście badawcze uwzględniające cele naukowe jak i wykorzystanie praktyczne otrzymanych wyników, przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki o Ziemi i Środowisku Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

