

Warszawa, 10 sierpnia 2023 r.

Recenzent:

dr hab. Mateusz Labudda

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Flisa
pt. „Wpływ poziomu transkrypcji genów *hsp* na kondycję
stadium J2 nicienia *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 w zakresie
wybranych temperatur”**

wykonanej w Muzeum i Instytucie Zoologii Polskiej Akademii Nauk
pod kierunkiem prof. dr. hab. Tadeusza Malewskiego
i dr hab. Renaty Dobosz

Podstawą formalną opracowania recenzji jest dokument podpisany w Warszawie dnia 12.06.2023 r. przez Dyrektora Muzeum i Instytutu Zoologii Polskiej Akademii Nauk dr. hab. Tomasza Mazgajskiego, zgodnie z którym zostałem powołany na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Flisa.

1. Ocena formalna i sylwetka Kandydata

Niniejszą recenzję przygotowałem w oparciu o komplet dokumentów dostarczonych przez Sekretariat Rady Naukowej Muzeum i Instytutu Zoologii Polskiej Akademii Nauk zawierający: pismo przewodnie Dyrektora Muzeum i Instytutu Zoologii Polskiej Akademii Nauk, oprawiony wydruk komputerowy rozprawy doktorskiej oraz jej wersję elektroniczną zapisaną na płycie CD. W mojej ocenie dostarczony wydruk komputerowy rozprawy doktorskiej spełnia wymogi formalne, przez co możliwe było wykonanie oceny merytorycznej.

Pan mgr Łukasz Flis uzyskał tytuł zawodowy magistra biologii w 2009 r. na Wydziale Przyrodniczym Akademii Podlaskiej w Siedlcach (dziś: Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach). W 2010 r. rozpoczął pracę zawodową na stanowisku biologa w Pracowni Nematologii Muzeum i Instytutu Zoologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Uczestniczył w realizacji projektu „Opracowanie innowacyjnych metod szybkiej identyfikacji nicieni powodujących straty w gospodarce”. W 2015 r. został

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Instytut Biologii
Katedra Biochemii i Mikrobiologii

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 325 71
mateusz_labudda@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl



awansowany na stanowisko asystenta naukowego. W 2016 r. otrzymał grant wewnętrzny dla młodych naukowców „Gwiazda”. W 2017 r. został kierownikiem projektu pt. „Wpływ poziomu transkrypcji genów *hsp* na kondycję wybranych stadiów rozwojowych pasożyta roślin *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 w zakresie wybranych temperatur” w konkursie Preludium 11, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki w Krakowie.

Kandydat jest współautorem 15 publikacji naukowych opublikowanych w latach 2013-2023. W 5 jest pierwszym autorem, a w 8 jest autorem korespondencyjnym. Jest także współautorem cyklu 3 publikacji popularnonaukowych dotyczących problematyki ochrony pomidora zwyczajnego (*Solanum lycopersicum* L.) przed pasożytniczymi nicieniami. Kandydat z powodzeniem współpracował z różnymi krajowymi i zagranicznymi instytucjami naukowymi. Dotychczas został powołany na recenzenta trzech artykułów naukowych złożonych do czasopism *Annales Zoologici* (2020), *Infection, Genetics and Evolution* (2021) oraz *Progress in Plant Protection* (2023). Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że badania wykonane w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane w ramach grantu Preludium nr 2016/21/N/NZ9/03434 przyznanego mgr. Łukaszowi Flisowi przez Narodowe Centrum Nauki w Krakowie. Przytoczone powyżej fakty świadczą o tym, że Kandydat jest specjalistą z zakresu nematologii. Zdobyte wykształcenie podczas studiów uniwersyteckich oraz bogate doświadczenie zawodowe dały solidne podstawy merytoryczne i metodyczne do przygotowania ocenianej rozprawy doktorskiej.

2. Ocena rozprawy doktorskiej

Kandydat rozprawę doktorską przedstawił w formie typowej dla biologicznych rozpraw doktorskich opisujących oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Uzyskane przez Kandydata wyniki z badań empirycznych zostały opisane w formie monograficznej. Rozprawa doktorska zawiera następujące elementy strukturalne: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski, Literaturę i Załączniki. Przygotowano też streszczenia (w języku polskim i języku angielskim).

Tematyka rozprawy doktorskiej jest spójna i koncentruje się wokół charakterystyki reakcji nicienia *Meloidogyne hapla* na zmiany temperatury środowiska zewnętrznego. Od strony metodycznej, rozprawa doktorska została poparta metodami biologii molekularnej i prostymi technikami pozwalającymi ocenić ogólną kondycję fizjologiczną organizmu zwierzęcego. Na tej podstawie stwierdzam, że badania prezentowane przez Kandydata zostały przeprowadzone poprawnie w ramach określonego nurtu teoretycznego, a metodologia badań jest spójna z wybraną orientacją teoretyczno-empiryczną.

Przeprowadzone badania doprowadziły do uzyskania ciekawych wyników. Ich analiza pozwala na stwierdzenie, że oceniana rozprawa doktorska zawiera *novum* w stosunku do istniejącej wiedzy. Rzeczone



novum można znaleźć w wynikach pokazujących zmiany ekspresji genów kodujących białka szoku cieplnego (hsp) *Mh-hsp90*, *Mh-hsp1*, *Mh-hsp4*, *Mh-hsp6*, *Mh-hsp60*, *Mh-dnj19*, *Mh-hsp43* i *Mh-hsp12.2* w jajach i larwach stadium J2 *M. hapla* w odpowiedzi na stres termiczny. Na tej podstawie stwierdzam, że określony przez Kandydata problem badawczy okazał się być warty postawienia i rozwiązania.

Ponadto wyniki badań prezentowanych przez Kandydata były poprawnie analizowane i prawidłowo dyskutowane na tle bieżącej światowej literatury. W ocenianej rozprawie doktorskiej są obecne odwołania do ważnych tekstów z podjętej tematyki badawczej i nie zostały pominięte kluczowe publikacje. Kandydat zachował adekwatny balans między treściami węzłowymi dla postawionego celu badawczego, które zostały odpowiednio podkreślone, a pobocznymi, którym nie poświęcono zbyt dużo uwagi. Przedstawione przez Kandydata modele i badania zostały zaprezentowane w sposób trafny i wnikliwy, a zarazem zrozumiały i wyrazisty. Zastosowane analizy statystyczne są zgodne ze standardami w badaniach biologicznych, a ich wyniki zostały prawidłowo zinterpretowane.

Uważam, że do najważniejszych, szczegółowych osiągnięć naukowych przedstawionych w rozprawie doktorskiej należą:

- wykazanie, że u obu badanych stadiów rozwojowych *M. hapla* dochodzi do wzrostu transkrypcji prawie wszystkich genów hsp (oprócz ekspresji genu *Mh-hsp12.2* w stadium J2) w odpowiedzi na stres gorąca,
- wykazanie, że w stadium J2 zawsze indukowany był wyższy poziom ekspresji genów hsp (z wyjątkiem genów *Mh-hsp43* i *Mh-hsp12.2*) niż w stadium jaja, zarówno po ekspozycji na stres gorąca i zimna,
- wykazanie, że temperatury nieoptymalne wraz z wydłużaniem czasu ekspozycji istotnie wpływały na obniżanie parametrów kondycji u larw J2: ich długości, szerokości i masy ciała oraz masy i powierzchni wybarwionych lipidów.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Łukasza Flisa jest interesująca, została zrealizowana z wykorzystaniem warsztatu metodycznego, co do którego nie mam zastrzeżeń merytorycznych oraz charakteryzuje się dobrą wartością naukową i wnosi nowe elementy do rozwoju nematologii, szczególnie rolniczej.

3. Uwagi i pytania do Kandydata

Praca jest napisana dobrym językiem naukowym. W większości przypadków Kandydat używał poprawnej polszczyzny. Nie zauważyłem poważnych błędów składniowych. Uwagi krytyczne oraz kwestie

do dyskusji przytoczę poniżej. Jak już wspomniałem na początku recenzji, oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne. Jednak w pewnych jej miejscach zawiera elementy, które w mojej ocenie są co najmniej dyskusyjne.

1. Jeden z rozdziałów został zatytułowany przez Kandydata jako Wstęp. W mojej ocenie zgodnie ze strukturą, która została przyjęta przez Doktoranta bardziej trafionym tytułem byłby np. Przegląd literatury, bo w gruncie rzeczy ten rozdział właśnie jest przeglądem piśmiennictwa. Przyjęło się, że wstęp w monograficznych rozprawach doktorskich jest skrętnie napisanym wywodem o tym jak powstawała rozprawa – co kierowało Doktorantem przy planowaniu badań, jaki był stan wiedzy przed powstaniem rozprawy doktorskiej, z jakich materiałów źródłowych skorzystano oraz jaką przyjęto strukturę rozprawy. Wobec powyższego, wstęp do rozprawy doktorskiej opracowuje się zawsze na końcu, już po napisaniu całej rozprawy.
2. Na końcu rozdziału Wstęp oczekiwałbym krótkiego podsumowania przedstawionej literatury oraz postawienia hipotezy badawczej, która miałaby być weryfikowana doświadczalnie. To właśnie brak hipotezy badawczej, sprawia, że moja ogólna ocena tej rozprawy jest obniżona. Chciałbym zachęcić Kandydata, aby podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej spróbował zmierzyć się z tym wyzwaniem, jako że sztuka stawiania intrygujących i odważnych hipotez jest siłą napędową postępu naukowego i dyskursu uniwersyteckiego.
3. Chciałbym zauważyć, że w języku formalnym nie stosuje się zdrobnień. Na stronie 30 Doktorant pisze: „Po czym rośliny przesadzono do wazonów wypełnionych podłożem glebowym (1:1 **źwirku** i gleby do produkcji warzyw), w którym znajdowały się nicienie w stadium J2, w liczbie 50 osobników przypadających na 200 cm³ gleby”. Jest „**źwirku**”, powinno być „**źwiru**”.
4. Na rycinach 38-48 zabrakło np. grotów precyzyjnie wskazujących o które wybarwione struktury w ciałach nicieni chodzi. Takie przedstawienie w zdecydowany sposób poprawiłoby odbiór tego typu rycin. Moim zdaniem można było też pokusić się o wykonanie i zaprezentowanie w rozprawie doktorskiej zdjęć z wyższą rozdzielczością. Być może Doktorant jest w posiadaniu takowych zdjęć? Jeżeli tak, to uprzejmie proszę o zaprezentowanie ich podczas referowania też rozprawy doktorskiej podczas publicznej obrony.

5. Dość zaskakującym elementem ocenianej rozprawy doktorskiej wydał mi się podrozdział zatytułowany „Podsumowanie dyskusji”. Ta część zawarta została na blisko 11 stronach komputeropisu (strony od 111 do 122). Nie wykazuje ona znaczących różnic od poprzedzającej części Dyskusji. W mojej ocenie wystarczyłoby, aby Doktorant zrezygnowałby z podrozdziału „Podsumowanie dyskusji”, a odbiór Dyskusji dla czytelnika poprawiłby się. Jeżeli czytamy, że Autor chciałby podsumować pewną całość, a dalej prowadzi swój wywód przez 11 kolejnych stron, to może to doprowadzić czytelnika do konsternacji.
6. W rozdziale Wnioski w punkcie I. Doktorant pisze: „W warunkach ekspozycji na **pewne temperatury**, w jajach jak również u osobników stadium J2 *M. hapla*, zachodzą zmiany na poziomie molekularnym i fizjologicznym”. W mojej ocenie w tym miejscu rozprawy doktorskiej użycie sformułowania „**pewne temperatury**” jest dość niefortunne.
7. W rozdziale Wnioski w punkcie IV. Doktorant pisze: „Uzyskane wyniki sugerują, że geny *Mh-hsp90* i *Mh-hsp1* mogą być stosowane jako **bioindykatory** wpływu środowiska zewnętrznego na organizm nicieni z rodzaju *Meloidogyne*. Natomiast gen *Mh-hsp1* może uczestniczyć w nabywaniu termotolerancji przez organizm stadium J2 *M. hapla*”. Użycie słowa „**bioindykatory**” w tym znaczeniu jest niepoprawne. Bioindykatory lub inaczej gatunki wskaźnikowe to gatunki będące stenobiontami czyli organizmami o wąskim zakresie tolerancji wobec jednego lub kilku czynników ograniczających. Bioindykatory i bioindykacja to pojęcia przypisane do działu biologii jaką jest ekologia i nie należy pojęcia „**bioindykatory**” stosować w rozumieniu wskaźników czy markerów, jak przypuszczam chciał to zrobić Doktorant.
8. Uprzejmie proszę, aby podczas publicznej obrony Kandydat jasno określił, które z wyników badań przedstawionych w niniejszej rozprawie (jak sam pisze) opublikowano w pracy: Dobosz R., Flis Ł., Bocianowski J., Malewski T. 2023. Effect of *Vicia sativa* L. on motility, mortality and expression levels of hsp genes in J2 stage of *Meloidogyne hapla*. Journal of Nematology 55(1): 1–17. <https://doi.org/10.2478/jofnem-2023-0009>. Sprawa ta jest o tyle istotna i zarazem kłopotliwa, bo tematyka wspomnianego artykułu nie dotyczy wpływu poziomu transkrypcji genów *hsp* na kondycję stadium J2 nicienia *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 w zakresie wybranych temperatur. We wspomnianej pracy Dobosz et al. (2023) w podziękowaniach autorzy napisali: „część dotycząca badań nad ekspresją genów



hsp została zrealizowana w ramach projektu Preludium nr 2016/21/N/NZ9/03434 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki”. Ta dwa stwierdzenie (z rozprawy doktorskiej i przytoczonego artykułu) nie są tożsame i aby wykluczyć prawno-proceduralne wątpliwości nasuwające się po przeczytaniu tych dwóch oświadczeń proszę o dalsze wyjaśnienia w tym zakresie.

Podczas analizowania rozprawy doktorskiej nasunęło mi się następujące pytanie do Kandydata. Bardzo proszę o odniesienie się do następującego zagadnienia podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej:

- proszę o przedstawianie (na konkretnych przykładach) udziału roślinnych białek szoku cieplnego podczas odpowiedzi roślin na zasiedlenie przez różne pasożyty.

4. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Łukasza Flisa potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a wyniki zostały opisane w postaci pracy pisemnej. Do rozprawy doktorskiej dołączone zostały streszczenia w języku polskim i języku angielskim. Na tej podstawie stwierdzam, że wszystkie wymagania prawne zapisane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim i Kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora zostały spełnione.

W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Muzeum i Instytutu Zoologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr. Łukasza Flisa do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Dr hab. Mateusz Labudda

*Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/