



Wrocław, 17.08.2023

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgra Łukasza Flisa pt. "Wpływ poziomu transkrypcji genów *hsp* na kondycję stadium J2 nicienia *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 w zakresie wybranych temperatur"**

Jednym z pasożytów szczególnie szkodliwym dla roślin dwuliściennych jest guzrak północny *Meloidogyne hapla*. Zakaża on wiele gatunków roślin uprawnych, co powoduje istotne straty w rolnictwie i gospodarce człowieka. Rozwój i aktywność tego nicienia zależą od czynników środowiskowych, a zwłaszcza od temperatury. Mimo, że przeprowadzono wiele badań dotyczących wpływu tego czynnika na rozwój jaja i stadium larwalnego, to wciąż słabo znane są zmiany na poziomie molekularnym w różnych warunkach w powiązaniu ze zmianami morfologicznymi i fizjologicznymi. Dlatego bardzo słusznie ambitnym przedmiotem pracy doktorskiej Pana mgra Łukasza Flisa stało się zbadanie wpływu różnych warunków temperaturowych środowiska zewnętrznego na poziom molekularny i fizjologiczny nicienia *Meloidogyne hapla*. W analizach molekularnych skupiono się na ekspresji genów szoku termicznego (*hsp*).

Rozprawa doktorska została napisana w języku polskim ze streszczeniem w języku angielskim. Zawiera ona klasyczny układ, czyli: Spis treści, Streszczenie, Abstract, Wstęp wprowadzający do tematyki nicieni glebowych i wpływu temperatury na ich rozwój, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski, Literaturę i Załączniki. Podrozdziały w głównych częściach są poprawnie zorganizowane w sposób hierarchiczny, co zwiększa przejrzystość pracy i prezentowanie rezultatów. W Załącznikach zebrano tabele z surowymi wynikami.

W pracy doktorskiej po raz pierwszy u *Meloidogyne hapla* zaprezentowano wyniki badań wpływu stresu zimna i gorąca na poziom transkrypcji genów szoku termicznego *Mh-hsp90*, *Mh-hsp1*, *Mh-hsp4*, *Mh-hsp6*, *Mh-hsp60*, *Mh-dnj19*, *Mh-hsp43* i *Mh-hsp12.2* w stadium jaja i J2. Dodatkowo uwzględniono wpływ tego stresu na stan fizjologiczny opisany przez długość, szerokość, masę ciała oraz masę i powierzchnię wybarwionych lipidów, a także aktywność ruchową osobników stadium J2. Zastosowano dużo kombinacji temperatury i czasu inkubacji.

Wstęp jest przejrzyste napisany i odpowiedni dla wprowadzenia czytelnika do omawianych zagadnień oraz zrozumienia stawianych problemów. Przedstawiono w nim charakterystykę nicieni glebowych oraz ich znaczenie dla gospodarki i oceny stanu środowiska. Najwięcej miejsca poświęcono guzakom z rodzaju *Meloidogyne*, które są pasożytami wewnętrznymi wielu roślin, w tym uprawnych, powodując średnio 10%-owy spadek plonowania. Szczegółowiej opisano gatunek *Meloidogyne hapla* będący przedmiotem pracy doktorskiej. Na jego temat przedstawiono najważniejsze informacje dotyczące historii odkrycia, występowania, znaczenia i cyklu rozwojowego. Stosunkowo dużo miejsca poświęcono wpływowi temperatury na tempo metabolizmu i różne procesy życiowe nicieni, w tym *Meloidogyne*, oraz ekspresję genów, w tym kodujących białka szoku termicznego. Informacje te zostały napisane w jasny i zwięzły oraz dobrze uporządkowany sposób. Należy zwrócić uwagę na rozbudowane cytacje literaturowe.

Mam do doktoranta pytania dotyczące tej części. W związku z tym, że *Meloidogyne hapla* został odkryty stosunkowo niedawno, bo w 1949 r., to czy nie jest to związane z tym, że znany był wcześniej, ale opisywany był pod inną nazwą, a w podanym roku wyróżniono go pod aktualną nazwą? Czy można odróżnić morfologicznie od siebie stadium J3 i J4? Ile razy na rok samica składa jaja?

Głównym celem pracy stało się zbadanie reakcji nicienia *Meloidogyne hapla* na zmiany temperatury środowiska zewnętrznego. Uwzględniono przy tym ekspresję genów szoku termicznego oraz parametry stanu fizjologicznego, zawartość lipidów i aktywność ruchową wybranych stadiów rozwojowych tego gatunku. Cele pracy zostały poprawnie sformułowane i wszystkie zostały właściwie zrealizowane.

Doktorant rzetelnie opracował Materiały i metody. Szczegółowo opisano materiał badawczy, sposób hodowli oraz zastosowane metody: izolację i amplifikację materiału genetycznego, określanie ekspresji genów *hsp* metodą ilościową PCR, badanie wpływu temperatur na stan fizjologiczny i aktywność ruchową oraz analizę uzyskanych danych. W oparciu o uogólnione modele linowe wybrano najlepsze kombinacje predyktorów (temperatury i czasów inkubacji) badanych parametrów. Nie mam zastrzeżeń do metodyki przeprowadzonych analiz. Analizy zostały wykonane przy zastosowaniu odpowiednich metod.

Mam jednak pewne pytania. Dlaczego wybrano dokładnie 336, 1008 i 1344 godziny do inkubowania osobników J2? Czy znaczenie miało, że nicienie zostały pozyskane z

marchwi, a hodowane na pomidorze? Czy występuje specjalizacja populacji tego gatunku do roślin? Wzory na masę ciała i lipidów są do siebie podobne i mają tę samą stałą. Czy nie powinna być ona różna, ponieważ ogólna gęstość ciała nicienia i lipidów jest najprawdopodobniej inna? Dlaczego temperaturę i czas inkubacji stosowano jako zmienne kategoryczne, a nie ciągle? W Tabeli 2 dziwnie jest oznaczenie eksperymentu dla kontroli. Sądzę, że liczba plusów powinna odpowiadać czasom inkubacji i powinny być wyróżnione komórki odpowiadające tym czasom. W przypadku analizy danych dobrze byłoby podać funkcje i komendy zastosowane dla modeli liniowych.

Wyniki opisano skrupulatnie i obiektywnie. Szczegółowo scharakteryzowano zależność ekspresji genów od temperatury, czasu inkubacji i interakcji tych dwóch parametrów. W stadium jaja i J2 stwierdzono wzrost poziomu transkrypcji wszystkich genów *hsp* na działanie stresu gorąca z wyjątkiem genu *Mh-hsp12.2* w stadium J2. Natomiast pod wpływem stresu zimna odnotowano wzrost ekspresji dla genów *Mh-hsp60*, *Mh-dnj19* i *Mh-hsp12.2* w obu badanych stadiach rozwojowych oraz *Mh-hsp1* i *Mh-hsp43* dla stadium J2. Ekspresja genów była wyższa w warunkach stresu gorąca niż stresu zimna. Wzrost ekspresji większości genów *hsp* w temperaturach stresowych był generalnie wyższy w stadium J2 niż jaja.

Badanie wpływu warunków inkubacji na parametry fizjologiczne wykazało, że z jaj inkubowanych w temperaturach stresowych wylęgają się osobniki stadium J2, których średnie wartości długości, szerokości i masy ciała są mniejsze od odpowiednich parametrów osobników J2 wylęgających w temperaturach optymalnych. Ciekawe jest to, że długość ciała osiągała największe wartości w temperaturze 30°C, a szerokość i masa ciała w 20°C.

Badając osobniki stadium J2 poddane różnym warunkom stwierdzono wzrost długości ciała do 30°C, a później spadek w temperaturach stresowych, natomiast długość ciała cały czas zwiększała się ze wzrostem czasu inkubacji. W przeciwieństwie do tego szerokość i masa ciała zmniejszały się ze wzrostem temperatury i czasem inkubacji. Również powierzchnia i masa wybarwionych lipidów zmniejszały się w zależności od czasu inkubacji i ze wzrostem temperatury. Powierzchnia wybarwionych lipidów była generalnie większa w niższych temperaturach inkubacji. Aktywność ruchowa osobników J2 była najniższa w temperaturach stresowych 5°C i 35°C, a zanikała w temperaturze 40°C.

Przeprowadzone badania ekspresji genów *hsp*, parametrów stanu fizjologicznego oraz aktywności ruchowej potwierdziły, że optymalnymi temperaturami do rozwoju nicienia

*Meloidogyne hapla* pochodzącego z gleb strefy klimatu umiarkowanego są temperatury w przedziale od 20°C do 30°C.

Zaletą pracy było wprowadzenie rozdziału "Podsumowanie wyników badań ekspresji genów *hsp*", który w zwięzły sposób zbiera opisane wcześniej szczegółowe wyniki. Mam jednak uwagi. Wykresy pokazujące wartości danych parametrów od innych mogłyby mieć mniejsze kropki oznaczające wartości szacowane. Można by jeszcze podsumować przypadki spadków ekspresji w porównaniu do kontroli. Chciałbym również, aby doktorant wyjaśnił jak interpretuje wynik, że nie zawsze ekspresja genów była najwyższa w ekstremalnej temperaturze 40°C. Dobrze byłoby także opisać, czym są wartości szacowane na rycinach? Domyślam się, że są to wartości wyliczone z modelu. Jak bardzo te wartości szacowane z modelu różnią się od średniej wyliczonej w oparciu o dane surowe? W pracy stosowano termin o istotnej statystycznie różnicy. W jaki sposób określano tą istotność?

W rozdziale Dyskusja doktorant wyczerpująco, obiektywnie i rzetelnie przedyskutował najważniejsze osiągnięcia swojej pracy doktorskiej. Pan Łukasz Flis porównał wyniki z dostępnymi danymi literaturowymi dotyczącymi wpływu temperatury na ten sam i inne gatunki nicieni uzyskanymi przez innych badaczy. Znaleziono wiele podobieństw we wpływie szoku termicznego na ekspresję genów oraz parametry fizjologiczne. Odmienne wyniki tłumaczono różnymi warunkami eksperymentów, np. hodowlą nicieni z dostępem pokarmu przez innych autorów. Potwierdzono także zależność TSR (temperature size rule) mówiącą, że organizmy zmiennocieplne rosną wolniej w chłodniejszym środowisku, ale dojrzewając w tych warunkach osiągają większe rozmiary ciała.

Pan Łukasz Flis wytłumaczył również mechanizmy leżące u podstaw wpływu temperatury i czasu inkubacji na badane parametry. Powiązał te zjawiska z denaturacją białek oraz tempem wzrostu i metabolizmu. Wyjaśnienia są logiczne i sensowne. Przedstawiono to w rozdziale "Podsumowanie dyskusji", który uważam za najbardziej interesujący. Mam sugestię na przyszłe badania. Opisane w pracy eksperymenty na nicieniach przeprowadzono w warunkach głodu, dlatego ciekawe byłoby wykonanie podobnych analiz przy dostępie do rośliny żywicielskiej. Czy te wyniki byłyby podobne czy różniłyby się?

Rozdział Podsumowanie i Wnioski są do siebie podobne i jeden z nich byłby wystarczający. Niewątpliwie, są one napisane przejrzysto i zawierają najważniejsze wnioski uzyskane z badań.

Uzyskane wyniki są wartościowe. Poznanie zakresów temperatur stresowych i niestresowych działających na nicienie stadium J2 *Meloidogyne hapla* pomoże opracować skuteczniejsze metody zwalczania tego pasożyta. Doktorant zasugerował także zastosowanie wyciszania genów *hsp* w walce z tymi pasożytami. Poruszył także kwestię zmiany zasięgów nicieni z powodu ocieplania się klimatu, co zmusza do szukania nowych metod zwalczania nicieni pasożytniczych. Uzyskane wyniki sugerują, że geny *Mh-hsp90* i *Mh-hsp1* mogą być stosowane jako bioindykatory wpływu środowiska zewnętrznego na organizm nicieni z rodzaju *Meloidogyne*.

Opisy są dobrze zorganizowane pod względem formalnym i należy podkreślić poprawne sformatowanie i ładną szatę graficzną pracy. Warto zwrócić uwagę, że Wstęp jest ilustrowany ładnymi zdjęciami wykonanymi przez doktoranta. Praca i artykuły są napisane poprawnym językiem i stylem. Dostrzegłem tylko niewiele błędów. Ryc. 4 mogłaby mieć białą czcionkę. Przed "cm" powinna być spacja, a przecinek przed "tzn." oraz "a", "to" i "aby" w niektórych zdaniach złożonych. Zdanie "Jedynie białka o natywnej strukturze wykazują aktywność katalityczną." zamieniłbym na "Jedynie białka o natywnej strukturze wykazują właściwą aktywność katalityczną." Tytuł "Wpływ temperatury na tempo metabolizmu nicieni" zamieniłbym na bardziej ogólny "Wpływ temperatury na tempo metabolizmu." Termin "retikulum endoplazmatyczne" zamieniłbym na "siateczka śródplazmatyczna". Zamiast terminu homologia sekwencji aminokwasowej powinno się stosować, w zależności, co było liczone, identyczność (identity), czyli procent identycznych reszt aminokwasowych lub nukleotydowych) lub podobieństwo (similarity), czyli procent identycznych reszt aminokwasowych oraz reszt o podobnych właściwościach fizykochemicznych posiadających wartości punktacji dodatnie w danej macierzy punktacji par aminokwasów.

Stwierdzone przeze mnie zastrzeżenia nie rzutują jednak na bardzo pozytywną ocenę pracy, a przedstawione powyżej uwagi nie zmniejszają wartości ocenianej rozprawy. Przeprowadzone badania były bardzo zasadne, ponieważ istnieje potrzeba zbadania i zrozumienia wpływu warunków temperaturowych i czasu inkubacji na rozwój nicieni pasożytniczych w aspekcie fizjologicznym i molekularnym. Należy podkreślić, że analizy zostały przeprowadzone skrupulatnie, a zastosowana metodyka okazała się skuteczna. To świadczy o dużej samodzielności doktoranta. Pan Łukasz Flis włożył dużo trudu w przeprowadzone analizy, a przedstawiona dyskusja wyników świadczy o jego dużej

dojrzałości naukowej i umiejętności wydobywania najważniejszych informacji z uzyskanych wyników oraz przedstawiania ich w formie zwartych wniosków.

Warto podkreślić, że badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu Preludium. W związku z tym, że doktorant postawił sobie trudny cel badawczy i go rozwiązał przeprowadzając wiele eksperymentów, a wyniki opisał w bardzo dobry sposób i częściowo opublikował w *Journal of Nematology* proponuję wyróżnić rozprawę.

Uważam, więc, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy o Stopniach Naukowych. Zgłaszam, zatem wniosek do Rady Naukowej Muzeum i Instytutu Zoologii Polskiej Akademii Nauk o uznanie rozprawy Pana mgra Łukasza Flisa za odpowiadającą wymogom stawianym rozprawom doktorskim i o dopuszczenie doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Paweł Mackiewicz