# Muzeum i Instytut Zoologii PAN



# Wpływ poziomu transkrypcji genów *hsp* na kondycję stadium J2 nicienia *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 w zakresie wybranych temperatur

# Łukasz Flis

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Tadeusza Malewskiego oraz promotora pomocniczego dr hab. Renaty Dobosz w Muzeum i Instytucie Zoologii Polskiej Akademii Nauk

# Finansowanie badań

Badania wykonane w niniejszej rozprawie zostały sfinansowane w ramach grantu Preludium nr 2016/21/N/NZ9/03434 przyznanego Łukaszowi Flisowi przez Narodowe Centrum Nauki (okres realizacji: 24.01.2017 – 23.11.2021).

# Część wyników badań przedstawionych w niniejszej rozprawie opublikowano jako:

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

# Serdeczne podziękowania dla ...

mojego promotora Prof. dr. hab. Tadeusza Malewskiego oraz promotora pomocniczego dr hab. Renaty Dobosz, za ogromną pomoc na każdym etapie moich badań oraz niezliczone konsultacje i rozmowy.

wszystkich współpracowników z Pracowni Nematologii: Pani dr Grażyny Winiszewskiej, dr Katarzyny Rybarczyk-Mydłowskiej, Magdaleny Kubicz oraz Grzegorza Sikory – na Was zawsze można polegać!

wszystkich pracowników Pracowni Technik Molekularnych, w szczególności dla dr Hanny Panagiotopoulou-Stawnickiej za bezinteresowną pomoc i poświęcony mi czas.

Pana dr. hab. Przemysława Chylareckiego, za pomoc podczas wykonywania analiz statystycznych i poczucie humoru w trudnych sytuacjach.

Pani Prof. dr hab. Joanny Gliwicz, za bezcenną wiedzę przekazaną podczas inspirujących i poszerzających horyzonty seminariów doktoranckich.

Spis treści

Streszczenie	1
Abstract	3
1. Wstęp	5
1.1. Charakterystyka nicieni glebowych	5
1.2. Charakterystyka rodzaju Meloidogyne ze szczególnym uwzględnieniem M. hapla	5
1.2.1. Historia badań rodzaju <i>Meloidogyne</i>	5
1.2.2. Występowanie Meloidogyne hapla	7
1.2.3. Cykl rozwojowy Meloidogyne hapla	7
1.3. Wpływ temperatury na tempo metabolizmu nicieni	11
1.4. Wpływ temperatury na ekspresję genów hsp oraz funkcje białek Hsp	12
1.4.1. Geny <i>hsp</i> u nicieni	16
1.5. Wpływ temperatury na wybrane elementy procesów życiowych Meloidogyne	19
1.5.1. Wpływ temperatury na cykl życiowy Meloidogyne	20
1.5.2. Wpływ temperatury na aktywność ruchową Meloidogyne	23
1.5.3. Wpływ temperatury na wzrost i masę Meloidogyne	25
1.5.4. Wpływ temperatury na zawartość lipidów w organizmie Meloidogyne	26
2. Cel pracy	29
3. Materiały i metody	30
3.1. Materiał badawczy	30
3.2. Profilowanie ekspresji wybranych genów <i>hsp</i>	32
3.2.1. Inkubacja	32
3.2.2. Izolacja całkowitego RNA	32
3.2.3. Synteza jednoniciowego cDNA	34
3.2.4. Gen referencyjny	34
3.2.5. Projektowanie starterów do genów hsp	35
3.2.6. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (qPCR)	35
3.2.7. Obliczanie zmiany ekspresji badanych genów hsp	36
3.3. Wpływ temperatury na stadium jaja oraz na parametry stanu fizjologic.	znego
wylęgniętych z tych jaj stadiów J2	37
3.4. Wpływ temperatury na parametry stanu fizjologicznego osobników stadium J2	38
3.5. Wpływ temperatury na aktywność ruchową osobników stadium J2	40
3.6. Analiza danych	42
4. Wyniki	44

4.1. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp	44
4.1.1. Identyfikacja genów hsp w genomie Meloidogyne hapla	44
4.1.2. Startery do badania ekspresji genów hsp	44
4.1.3. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp w stadium jaja	45
4.1.3.1. Ekspresja genu Mh-hsp90	45
4.1.3.2. Ekspresja genu Mh-hsp1	46
4.1.3.3. Ekspresja genu Mh-hsp4	48
4.1.3.4. Ekspresja genu Mh-hsp6	49
4.1.3.5. Ekspresja genu Mh-hsp60	51
4.1.3.6. Ekspresja genu Mh-dnj19	52
4.1.3.7. Ekspresja genu Mh-hsp43	54
4.1.3.8. Ekspresja genu Mh-hsp12.2	56
4.1.4. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp u osobników w stadium J2	57
4.1.4.1. Ekspresja genu Mh-hsp90	57
4.1.4.2. Ekspresja genu Mh-hsp1	59
4.1.4.3. Ekspresja genu <i>Mh-hsp</i> 4	60
4.1.4.4. Ekspresja genu <i>Mh-hsp</i> 6	62
4.1.4.5. Ekspresja genu Mh-hsp60	64
4.1.4.6. Ekspresja genu Mh-dnj19	65
4.1.4.7. Ekspresja genu Mh-hsp43	67
4.1.4.8. Ekspresja genu Mh-hsp12.2	68
4.1.5. Podsumowanie wyników badań ekspresji genów hsp	69
4.2. Wpływ temperatury na stadium jaja oraz na parametry stanu fizjologic	znego
wylęgniętych z tych jaj stadiów J2	70
4.2.1. Zależność długości ciała osobników stadium J2 od temperatury i czasu ink	ubacji
stadium jaja	70
4.2.2. Zależność szerokości ciała osobników stadium J2 od temperatury i	czasu
inkubacji stadium jaja	72
4.2.3. Zależność masy ciała osobników stadium J2 od temperatury i czasu ink	ubacji
stadium jaja	73
4.3. Wpływ temperatury na parametry stanu fizjologicznego osobników stadium J2	74
4.3.1. Zależność długości ciała od temperatury i czasu inkubacji stadium J2	75
4.3.2. Zależność szerokości ciała od temperatury i czasu inkubacji stadium J2	76
4.3.3. Zależność masy ciała od temperatury i czasu inkubacji stadium J2	77

4.3.4. Powierzchnia wybarwionych lipidów
4.3.4.1. Zależność powierzchni wybarwionych lipidów od temperatury i czasu
inkubacji stadium J280
4.3.4.2. Zależność powierzchni wybarwionych lipidów od temperatury i masy
ciała stadium J2
4.3.5. Zależność masy lipidów od temperatury i czasu inkubacji stadium J288
4.4. Wpływ temperatury na aktywność ruchową osobników stadium J290
4.4.1. Zależność aktywności ruchowej stadium J2 od temperatury i czasu inkubacji90
5. Dyskusja
5.1. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp
5.2. Wpływ temperatury na stadium jaja oraz na parametry stanu fizjologicznego
wylęgniętych z tych jaj stadiów J2100
5.3. Wpływ temperatury na parametry stanu fizjologicznego osobników stadium J2102
5.4. Wpływ temperatury na aktywność ruchową osobników stadium J2109
5.5. Podsumowanie dyskusji
6. Podsumowanie
7. Wnioski
8. Literatura
<b>9. Załączniki</b>

# Streszczenie

Nicienie (Nematoda) stanowią jeden z najliczniej występujących na Ziemi typów w obrębie królestwa zwierząt. Bytują w prawie każdym nadającym się do życia środowisku na Ziemi, w tym w glebie. Spośród ponad 284 tysięcy znanych gatunków nicieni, około 1,5% stanowią pasożyty roślin. Jedną z grup pasożytów o największej szkodliwości dla roślin uprawnych są gatunki należące do rodzaju Meloidogyne. W wyniku żerowania tych pasożytów na korzeniach roślin powstają wyrośla przypominające guzy, dlatego potocznie nazywane są guzakami. Na obszarze Europy, w tym na terenie Polski reprezentuje je guzak północny Meloidogyne hapla, szkodnik wielu upraw roślin dwuliściennych. Nicień ten jest groźnym pasożytem nie tylko ze względu na żerowanie na wielu gatunkach roślin uprawnych, ale także na możliwość przetrwania w glebie w niskich temperaturach w okresie zimowym. Szczególnie istotne dla przetrwania tego gatunku sa stadium jaja, które zimuje w glebie, oraz wylegające się z tych jaj osobniki stadium inwazyjnego J2, które porażają z początkiem okresu wegetacyjnego nowe rośliny zachowując tym samym ciągłość populacji. Poza rośliną żywicielską rozwój oraz aktywność guzaków zależa od czynników otaczającego środowiska, w tym od działania temperatury. Na M. hapla i innych gatunkach z rodzaju Meloidogyne przeprowadzono wiele badań dotyczących wpływu temperatury, w tym na rozwój stadium jaja i osobników w stadium J2, wymiary i masę ciała osobników w stadium J2, zawartość lipidów w organizmie stadium J2 czy aktywność ruchową tego stadium, ale tylko nieliczne z nich dotyczyły ekspresji genów szoku termicznego (genów hsp).

Celem pracy było zbadanie reakcji organizmu nicienia *M. hapla* na zmiany temperatury środowiska zewnętrznego. Badania przeprowadzono na nicieniach tego gatunku pozyskanych z gleby na obszarze Polski. Cel realizowano poprzez wykonanie kompleksowych badań na poziomie molekularnym i fizjologicznym (odpowiedź całego organizmu) w stadium jaja i u osobników stadium J2, po inkubacji w wybranych temperaturach i czasie. Oba stadia inkubowano w temperaturach stresowych 5°C (stres zimna), 35°C i 40°C (stres gorąca) oraz niestresowych 10°C, 20°C i 30°C, w czasie 1, 2, 8 i 24 godzin, a osobniki J2 inkubowano dodatkowo przez 336, 1008 i 1344 godziny. Po raz pierwszy u tego gatunku przeprowadzono badania wpływu stresu zimna i gorąca na poziom transkrypcji (ekspresji) genów *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*1, *Mh-hsp*4, *Mh-hsp*6, *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19, *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2 w stadium jaja i stadium J2, jak również badania stanu fizjologicznego (długość, szerokość, masa ciała, masa i powierzchnia wybarwionych lipidów) oraz aktywności ruchowej osobników stadium J2. Po raz pierwszy u *M. hapla* badano także

parametry – długości, szerokości i masy ciała mierzone u osobników J2, które wylęgły się z jaj inkubowanych w ww. warunkach temperatury i czasu inkubacji.

Wykonane badania w kompleksowy sposób pokazują reakcję obu stadiów rozwojowych M. hapla na działanie wybranych temperatur. Temperatura stresowa 40°C okazała się letalna dla stadium jaja, natomiast osobniki J2 w zależności od czasu ekspozycji nie przeżyły inkubacji w temperaturach 35°C i 40°C. Badania genów hsp wykazały ich zróżnicowaną reakcję na temperatury stresowe. Spośród ośmiu badanych genów tylko dwa (Mh-hsp60 i Mh-dnj19) reagowały wzrostem ekspresji na stres gorąca i zimna w obu stadiach rozwojowych. Na stres gorąca reagowało więcej genów hsp, a ich ekspresja była wyższa niż na działanie stresu zimna. Wzrost ekspresji większości genów hsp podczas inkubacji w temperaturach stresowych był wyższy u osobników J2 niż w stadium jaja. Uzyskane wyniki sugerują, że geny Mh-hsp90 i Mh-hsp1 moga być stosowane jako bioindykatory wpływu środowiska zewnętrznego na organizm nicieni z rodzaju Meloidogyne. Ponadto wykazano, że z jaj inkubowanych w temperaturach stresowych wylęgają się osobniki stadium J2, których średnie wartości parametrów stanu fizjologicznego są niższe od parametrów osobników J2 wylęgniętych w temperaturach niestresowych. W badaniach osobników stadium J2 wykazano zależności wartości mierzonych parametrów stanu fizjologicznego od temperatury i czasu inkubacji tych nicieni. Temperatury stresowe 35°C i 40°C, wraz z wydłużaniem czasu inkubacji, istotnie wpływają na obniżanie wartości badanych parametrów. Badania aktywności ruchowej dowiodły także, że temperatury stresowe 5°C i 35°C ograniczają aktywność ruchową osobników stadium J2 oraz powodują jej brak w temperaturze 40°C.

Przeprowadzone badania ekspresji genów *hsp*, parametrów stanu fizjologicznego oraz aktywności ruchowej potwierdziły, że optymalnymi temperaturami do rozwoju nicienia *M. hapla* pochodzącego z gleb strefy klimatu umiarkowanego są temperatury w przedziale od  $20^{\circ}$ C do  $30^{\circ}$ C.

### Abstract

The effect of *hsp* gene transcription levels on the fitness of *Meloidigyne hapla* Chitwood, 1949, second-stage juveniles (J2) across a selection of temperature ranges

Nematodes (Nematoda) are among the most abundant metazoan taxa on Earth. They are found in almost every habitat, including soil. Of more than 284,000 named nematode species, about 1.5% occur as parasites in plants. One of the groups of parasites most harmful to crops are nematode species belonging to the genus *Meloidogyne*. As a result of feeding by these parasites the plant roots form swellings called "knots", hence they are commonly known as root-knot nematodes. In Europe, including Poland, they are represented by the northern root-knot nematode Meloidogyne hapla, a common pest of many dicot crops. This nematode is a dangerous parasite because it not only feeds on many species of arable crops, but it can also survive in the soil at low temperatures during winter. Two of the developmental stages: the egg state, which overwinters in soil, and the second-stage juvenile (J2) hatching from these eggs and subsequently infecting young plants at the beginning of the growing season, thus securing the survival of the nematode population, are particularly important for the survival of this species. The growth and activity of root-knot nematodes, depend, in addition to the host plant, on ambient factors, including temperature. Although many studies have been conducted on *M. hapla* and other species of the genus *Meloidogyne* into the effects of temperature on the development of the egg state as well as the J2 specimens, the body size and weight of the J2 specimens, the body lipid content in the J2 specimens, and also on the motility of this developmental stage, only a few of these studies addressed the expression of heat shock genes (hsp genes).

The aim of the study was to investigate the response of the *M. hapla* nematode to changes in ambient temperature. It was carried out on nematodes of this species collected from soil in Poland. The project was pursued by performing comprehensive studies at the molecular and physiological levels (whole-organism response) in the egg state and in J2 specimens, after incubation at selected temperatures and for pre-determined exposure duration times. Both stages were incubated at stress-inducing temperatures of 5°C (cold stress), 35°C, and 40°C (heat stress), and non-stress temperatures of 10°C, 20°C, and 30°C for 1, 2, 8, and 24 hours, and J2 specimens were additionally incubated for 336, 1008, and 1344 hours. For the first time in this species, the study of the effects of cold and heat stress on the levels of transcription (expression) of the *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*1, *Mh-hsp*4, *Mh-hsp*6, *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19, *Mh-hsp*43, and *Mh-hsp*12.2 genes was carried out in the egg state and the J2 specimens, as well as an examination of the physiological status (length, width, body weight,

mass and area of stained lipids) and motility in J2 specimens. For the first time in *M. hapla*, the study covered parameters – length, width, and body weight measured in J2 specimens hatched from eggs incubated in the above-mentioned conditions of temperature and incubation duration periods. The findings of these tests show in great detail the response to selected temperatures in both developmental stages of *M. hapla*. The stress temperature of 40°C proved to be lethal to the egg state. In contrast, the J2 specimens, depending on the exposure time, did not survive incubation at 35°C and 40°C. Studies of hsp genes showed their diverse responses to stress temperatures. Of the eight genes investigated, only two, i.e., Mh-hsp60 and Mh-dnj19, responded with increased expression to hot and cold stress, in both developmental stages. More hsp genes were found to respond to heat stress and their expression levels were higher than those triggered by cold stress. The increase in expression levels of most *hsp* genes during incubation at stress temperatures was higher in J2 specimens than in the egg state. The obtained results suggest that the Mh-hsp90 and Mh-hsp1 genes might be used as bioindicators of how nematodes of the genus Meloidogyne are affected by ambient conditions. Furthermore, the study indicated that J2 specimens hatched from eggs incubated at stress temperatures were characterised by lower average values of measured parameters of the physiological status than those exhibited by J2 specimens hatched at nonstress temperatures. The studies of J2 specimens found the values of measured parameters of the physiological status to be determined by the temperature and incubation time. Stress temperatures of 35°C and 40°C, along with the increasing incubation time, were found to significantly decrease the values of the tested parameters. Studies of the motility also proved stress temperatures of 5°C and 35°C to be limiting the motility of J2 specimens rendering them immotile at 40°C.

The studies of *hsp* gene expression, parameters of physiological status, and motility, have confirmed that the optimal temperatures for the growth of the *M. hapla* nematode obtained from soils of the temperate climate zone are between 20°C and 30°C.

### 1. Wstęp

# 1.1. Charakterystyka nicieni glebowych

Nicienie glebowe to robakokształtne zwierzęta, u których długość dorosłych osobników najczęściej waha się w granicach od 0,3 do 5,0 mm (Yeates, 1979). Nematoda tworzą jeden z najliczniejszych typów organizmów w królestwie zwierząt (Groombridge, 1992; Wilson, 2000). Dotychczas opisano ponad 284 tysiące gatunków, przy czym liczbe wszystkich istniejących szacuje się na milion lub więcej (Hodda, 2022). Powszechnie występują w glebie w liczbie od 3,5 do nawet 5 milionów osobników przypadających na metr kwadratowy jej powierzchni (Yeates, 2003). Nicienie glebowe należą do takich grup troficznych jak bakteriofagi, fitofagi, polifagi, drapieżcy i mykofagi (Yeates i in., 1993). Ponieważ żywią się różnorodnymi organizmami glebowymi a ich przemieszczanie się wymaga ciagłej dostępności wody to ich aktywność w dużej mierze zależna jest od warunków biologicznych i fizycznych panujących w glebie (Yeates i Bongers, 1999). Funkcjonowanie nicieni glebowych związane jest między innymi z dekompozycją detrytusu, wspomaganiem retencji i uwalnianiem wody, a w rezultacie także z produktywnością roślin (Klukowski, 2006). Z uwagi na łatwość pozyskiwania nicieni i możliwość identyfikacji ich głównych taksonów są one wykorzystywane jako wskaźniki różnorodności biologicznej. Przydatne są również do oceny wpływu różnych czynników na warunki glebowe (Yeates i Bongers, 1999). "Wrażliwość nicieni" wykorzystywana jest również do badania wpływu zachodzących zmian klimatycznych na te organizmy (Zhou i in., 2022; Martinez i in., 2023). Dużą część badań poświecono nicieniom pasożytującym na roślinach (nicieniom fitofagicznym) ze względu na ich negatywny wpływ na rośliny uprawne. Globalne szkody powodowane przez te nicienie w uprawach szacuje się na około 173 miliardy dolarów rocznie (Gamalero i Glick, 2020). Dotychczas opisano ponad 4300 gatunków nicieni pasożytujących na roślinach (Hodda, 2022).

# 1.2. Charakterystyka rodzaju *Meloidogyne* ze szczególnym uwzględnieniem *M. hapla* 1.2.1. Historia badań rodzaju *Meloidogyne*

Wśród nicieni pasożytujących na roślinach znane są zarówno gatunki będące pasożytami zewnętrznymi (ektopasożyty), jak i takie, które część swojego cyklu życiowego spędzają wewnątrz tkanek rośliny (endopasożyty), aktywnie się w nich przemieszczając lub przyjmując formę osiadłą (Yeates, 1971). Grupę endopasożytów osiadłych reprezentują guzaki *Meloidogyne*. Nicienie te w wyniku żerowania tworzą na korzeniach roślin żywicielskich charakterystyczne zgrubienia, przypominające guzy, od których wzięła się ich

nazwa guzaki (root-knot nematodes). Przez wiele lat objawy wywoływane przez guzaki były przypisywane innym patogenom roślinnym. Berkeley (1855) w swojej pracy po raz pierwszy zauważył, że w guzach na korzeniach ogórka (Cucumis sativus L.) występują nicienie. Obserwacja ta stała się początkiem badań nad nicieniami tworzącymi guzy na korzeniach różnych gatunków roślin, co doprowadziło do wyróżnienia i opisania kilku nowych gatunków. Pierwszy z nich to Anguillula marioni Cornu, 1879. Kolejnymi poznanymi gatunkami tworzącymi guzy były: Heterodera javanica Treub, 1885; Anguillula arenaria Neal, 1889; Meloidogyne exigua Göldi, 1892; Anguillula vialae Lavergne, 1901 oraz Oxyuris incognita Kofoid i White, 1919, których przeniesienie do rodzaju Heterodera (Schmidt, 1871) zaproponowali wiele lat później Marcinowski (1909) i Sandground (1923). Wynikiem tego działania było połączenie gatunków tworzących cysty wraz z gatunkami tworzącymi guzy. W roku 1949 Chitwood przeniósł guzaki z rodzaju *Heterodera* do rodzaju *Meloidogyne* Göldi, 1892. W swojej publikacji Göldi (1892) zaproponował dla opisanego przez siebie nowego gatunku exigua nazwę rodzajową Meloidogyne. Nazwa ta pochodzi z języka greckiego i oznacza "kobietę o kształcie jabłka" (Hunt i Handoo, 2009). Obecnie rodzaj Meloidogyne liczy 111 gatunków (Hodda, 2022; Gu i in., 2023).

Gatunki należące do rodzaju *Meloidogyne* mogą żerować na ponad 2000 gatunków roślin jednorocznych i wieloletnich (Bleve-Zacheo i in., 2007). Są grupą najbardziej szkodliwą dla roślin uprawnych i dlatego też uważane są na świecie za ekonomicznie bardzo ważną grupę nicieni fitofagicznych (Chitwood, 2003; Lilley i in., 2007). W uprawach warzyw powodują średnio 10%-owy spadek plonowania (Barker i Koenning, 1998; Koenning i in., 1999). Podczas żerowania i rozmnażania w korzeniach zaburzają fizjologię zainfekowanej rośliny, czego skutkiem jest zmniejszenie plonów i jakości upraw (Karssen, 1999). Guzaki występują na całym świecie, zarówno w strefie klimatu umiarkowanego, jak i tropikalnego i subtropikalnego (Karssen, 1999; Flis i in., 2018). W Europie stwierdzono obecność 23 gatunków należących do rodzaju *Meloidogyne* (Wesemael i in., 2011), z czego pięciu w Polsce (Karssen i Brzeski, 1998). Badania wykazały, że spośród opisanych dotąd gatunków najbardziej pospolite są *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, *M. hapla* Chitwood, 1949, *M. incognita* (Kofoid i White, 1919) oraz *M. javanica* (Treub, 1885), 1949. Stanowią one aż 95% wszystkich znanych populacji *Meloidogyne* na świecie oraz powodują największe straty w uprawach (Dautova, 2001; Hunt i Handoo, 2009).

## 1.2.2. Występowanie Meloidogyne hapla

Jednym z najbardziej rozpowszechnionych w Europie gatunków należących do rodzaju *Meloidogyne* jest guzak północny *M. hapla (northern root-knot nematode)* (Sasser, 1980; Karssen, 1999; Hunt i Handoo, 2009; Skwiercz i in., 2019). *M. hapla* został po raz pierwszy opisany przez Chitwood (1949) z prób zebranych z korzeni roślin ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na obszarze Long Island w stanie Nowy Jork. Jego występowanie stwierdzono też w północnych regionach Stanów Zjednoczonych, ale również w Kanadzie, Ameryce Południowej, Azji, Afryce, w południowych stanach Australii, na wyspach leżących w rejonie Morza Karaibskiego i w Oceanii (Taylor i Sasser, 1978; Singh i in., 2013; CABI, 2021). Gatunek ten zasiedla zarówno tereny uprawne jak i środowiska naturalne, takie jak wydmy nadbrzeżne, lasy czy brzegi rzek (Karssen, 1999). Występuje najczęściej w glebach piaszczystych i torfach niskich. Jego żywicielami są rośliny dwuliścienne (Brinkman i Goosens, 1994; Mugniéry, 2007), uprawne i dziko rosnące. Gatunek ten jest poważnym szkodnikiem wielu upraw (Olthof i Potter, 1972; Belair, 1992; Widmer i in., 1999; Mitkowski i in., 2002).

W Polsce guzak północny jest częścią naszej rodzimej fauny i jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych szkodników roślin uprawnych. Zaobserwowano, że żerowanie *M. hapla* prowadzi do obniżenia plonu pomidora zwyczajnego (*Solanum lycopersicum* L.), pietruszki zwyczajnej (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill) i truskawki (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne ex Rozier) prowadzonych w uprawach polowych (Brzeski, 1993). W uprawach pod osłonami guzak północny szczególnie szkodzi uprawom cyklamenu (*Cyclamen persicum* Mill.) (Brzeski, 1993).

### 1.2.3. Cykl rozwojowy Meloidogyne hapla

Guzak północny rozmnaża się płciowo, ale może rozmnażać się również przez fakultatywną lub obligatoryjną partenogenezę. W rozwoju guzaka północnego, jak i u pozostałych przedstawicieli rodzaju *Meloidogyne*, na cykl rozwojowy składa się stadium jaja (Ryc. 1), cztery stadia młodociane (J1 – J4) (Ryc. 1, 3), oraz stadium dojrzałe płciowo (Ryc. 4, 5, 6) (Taylor i Sasser, 1978). Wewnątrz jaj przebiega embriogeneza osobników młodocianych pierwszego stadium (J1). Następnie w wyniku pierwszego linienia rozwijają się osobniki drugiego stadium (J2). Osobniki stadium J2 posiadają już zdolność ruchu i opuszczają osłony jajowe (Moens i in., 2009). Proces ten nie jest uwarunkowany obecnością rośliny żywicielskiej, ale zależy od wilgotności i temperatury otoczenia (Jones i in., 2013). W glebie osobniki stadium J2, nazywane też stadium inwazyjnym, aktywnie przemieszczają się

między cząstkami gleby w poszukiwaniu korzeni rośliny żywicielskiej (Ryc. 3 A, B, C) (Rödelsperger i in., 2013). W tym czasie osobniki J2 nie odżywiają się a energię czerpią ze zgromadzonych w ciele substancji zapasowych (lipidów). Jeśli nie wnikną do korzenia lub nie znajdą odpowiednich komórek w jego wnętrzu (komórki inicjalne) to po wyczerpaniu substancji zapasowych giną (Karssen i Moens 2006). Osobniki stadium J2 oraz osobniki dojrzałe płciowo posiadają w przedniej części ciała wysuwany sztylet – strukturę podobną do igły iniekcyjnej (Eisenback i Hunt, 2009).





Ryc. 1. Stadium jaja i osobniki drugiego stadium młodocianego (J2) *Meloidogyne hapla* (fot. Ł. Flis).

Ryc. 2. Guzy i złoża jajowe *Meloidogyne hapla* na korzeniach pomidora (fot. Ł. Flis).

Przy użyciu sztyletu służącego do mechanicznego przekłuwania ściany komórkowej korzenia i wprowadzania do komórek rośliny enzymów degradujących ściany komórkowe, osobniki J2 wnikają do wnętrza korzenia i przemieszczają się międzykomórkowo wewnątrz jego tkanek. Następnie osiadają i żerują w tkance miękiszu w pobliżu walca osiowego. W wyniku działania enzymów wydzielanych przez gruczoły gardzielowe wokół głowy nicienia, w otaczającej go tkance korzenia, powstają tzw. komórki olbrzymie. Komórki olbrzymie są miejscem odżywiania się nicieni (Rosso i in., 1999; Jaubert i in., 2002; Abad i in., 2009). Jest

to również miejsce, w którym zachodzą kolejne etapy rozwoju nicienia (Karssen i Moens, 2006). W wyniku ich żerowania w tkankach korzeni zachodzą zmiany anatomicznofizjologiczne, których efektem jest powstanie charakterystycznych zgrubień (guzów) na korzeniu, zwanych wyroślami (Dobosz i in., 2008).



Ryc. 3. Drugie stadium młodociane (stadium J2) *Meloidogyne hapla*: A – pokrój ciała, B – przednia część ciała ze sztyletem, C – tylna część ciała (fot. Ł. Flis).

Dalsze etapy rozwoju poprzedzone są linieniami. W wyniku intensywnego wzrostu ciała osobniki stadium J2 rozwijają się przez kolejne stadia J3 i J4 do stadium dojrzałego płciowo (Karssen i Moens, 2006). Stadia młodociane J3 i J4 nie posiadają sztyletu i nie odżywiają się, dopiero po ostatnim linieniu samica ponownie zaczyna pobierać pokarm (Moens i in., 2009).



Ryc. 4. Samice *Meloidogyne hapla* (fot. Ł. Flis).

U guzaków występuje dymorfizm płciowy oraz różnice w trybie życia między płciami. Samice, o kształcie ciała od okrągłej do gruszkowatej, są osiadłe, pozbawione zdolności poruszania się (Ryc. 4). Samce, robakowatego kształtu, są ruchliwe i nie odżywiają się (Ryc. 5). Gatunek charakteryzuje zmienna proporcja płci (Karssen i Moens, 2006). Samce są zwykle obecne w niewielkiej liczbie. Uważa się, że rozwijają się one częściej w niesprzyjających warunkach środowiskowych np. gdy jest niski poziom tlenu, znikoma dostępność roślin żywicielskich, podwyższona temperatura lub duża liczba osobników w stadium J2 (Eisenback i Triantaphyllou, 1991). Samce opuszczają korzenie i przechodzą do gleby. W glebie samiec przemieszczając się wokół korzeni napotyka samicę, której tylna część ciała z otworem płciowym (vulva) jest wysunięta na zewnątrz korzenia. Po zapłodnieniu samicy ginie (Bleve-Zacheo i in., 2007).



Ryc. 5. Samce *Meloidogyne hapla* (fot. Ł. Flis).

Zapłodniona samica składa jaja do przyczepionego do tylnej części jej ciała galaretowatego worka jajowego (tzw. złoże jajowe), utworzonego z wydzielin sześciu gruczołów odbytowych. Złoża jajowe zwykle wystają na zewnątrz korzenia, ale również mogą znajdować się – tak jak samica – w jego wnętrzu (Moens i in., 2009) (Ryc. 2). W okresie od 2 do 3 miesięcy samice składają średnio od 100 do 1000 jaj (Karssen, 1999). Samica umiera wkrótce po ich złożeniu. Jaja zamknięte w galaretowatym woreczku często pozostają przyczepione do fragmentów korzeni w glebie jeszcze długo po śmierci samicy stając się źródłem nowych infekcji. W tych złożach jajowych w glebie mają one zdolność przetrwania niesprzyjających warunków podczas okresu zimowego (Bleve-Zacheo i in., 2007; Wu i in., 2019). Długość cyklu rozwojowego *M. hapla* w optymalnych warunkach

temperatury oraz dostępności korzeni rośliny żywicielskiej trwa około 35 dni (Daulton i Nusbaum, 1961; Bird i Wallace, 1965; Griffin i Jensen, 1997; Charchar i Santo, 2009).



Ryc. 6. Cykl życiowy Meloidogyne hapla (rys. Ł. Flis).

# 1.3. Wpływ temperatury na tempo metabolizmu nicieni

Nicienie są organizmami zmiennocieplnymi, w związku z tym zmiany temperatury wpływają na tempo ich procesów metabolicznych (Lee i Atkinson, 1976). W badaniach metabolizmu zwierząt zmiennocieplnych ma zastosowanie prawo Van't Hoffa-Arrheniusa, które mówi, że wraz ze wzrostem temperatury o 10°C szybkość reakcji wzrasta 2-4 krotnie. Podobnie ma to miejsce w trakcie reakcji chemicznych i biochemicznych (Vinberg, 1983). Właściwie wszystkie reakcje biochemiczne zachodzące w organizmie katalizowane są przez enzymy, które *de facto* są białkami. Reakcje enzymatyczne zachodzące w żywej komórce odpowiadają praktycznie za całe jej funkcjonowanie tzn. jej wzrost, podział i różnicowanie się oraz za syntezę związków enzymatycznych. W wyższych temperaturach (dla większości białek to 40°C-50°C) zachodzi zaburzenie natywnej struktury białka, czyli tzw. denaturacja termiczna. Jedynie białka o natywnej strukturze wykazują aktywność katalityczną. Dla aktywności katalitycznej enzymów istnieje tzw. temperatura optymalna (T<sub>opt</sub>) (Ryc. 7). Jeżeli temperatura wzrośnie i zostanie przekroczony próg T<sub>opt</sub>, wtedy liczba aktywnych cząsteczek enzymów zmniejsza się na skutek ich denaturacji. Następuje wówczas obniżenie szybkości reakcji katalizowanej przez te enzymy. Spadek tempa metabolizmu zachodzi także, gdy

temperatura jest zbyt niska, a reagujące cząsteczki enzymów nie mają wystarczającej energii kinetycznej do katalizowania reakcji biochemicznych (Korzeniewski, 1995).



Ryc. 7. Wykres zależności aktywności od temperatury dla typowego enzymu (wg Korzeniewski, 1995).

Opisane powyżej procesy w uproszczony i schematyczny sposób wyjaśniają, jak temperatura wpływa na metabolizm komórki a w dalszej konsekwencji na fizjologię całego organizmu (Angilletta, 2009).

## 1.4. Wpływ temperatury na ekspresję genów hsp oraz funkcje białek Hsp

Jak już wcześniej wspomniano w wyniku działania ekstremalnej temperatury (szoku termicznego), ale także na skutek zmiany pH środowiska, stresu oksydacyjnego czy zadziałania innego czynnika stresowego (biotycznego lub abiotycznego), w komórkach organizmu zachodzą zmiany metaboliczne. Czynniki te wywołują w organizmie reakcję stresową (szok) (Feder i Hofmann, 1999). Stres jest reakcją organizmu na bodźce, które zaburzają homeostazę. Wszystkie żywe organizmy wykształciły reakcje na warunki stresowe (Selye, 1956). Jednym z mechanizmów odpowiedzi komórek organizmu na bodźce stresowe jest wzrost ekspresji genów szoku termicznego (*heat shock proteins genes, hsp* genes), wzrost poziomu RNA i wytworzenie w komórkach specyficznych białek określanych jako tzw. białka szoku termicznego (*heat shock proteins*, Hsp) (Feder i Hofmann, 1999). Wzmożenie syntezy białek Hsp powoduje obniżenie zagrożenia uszkodzeniem komórek podczas stresu i/lub wspomaga ich regenerację (Parcellier i in., 2003; Cymerys i Niemiałtowski, 2004; Arya i in., 2007; Kaźmierczuk i Kiliańska, 2010). Cząsteczki tych białek są "łącznikiem" między komórką a środowiskiem zewnętrznym, czego dowodzi szybka i intensywna synteza Hsp pod wpływem działania zewnątrzkomórkowego stresora (Kaźmierczuk i Kiliańska, 2010).

Białka Hsp zostały odkryte przez włoskiego genetyka Ferrucio Ritossa w wyniku przypadkowego eksperymentu, podczas którego hodowane w inkubatorze muszki owocówki (*Drosophila melanogaster* Meigen, 1830) zostały poddane działaniu wyższej niż zwykle temperatury (Ritossa, 1962). Mikroskopowe badanie gruczołów ślinowych tych owadów wykazało zgrubienia na tzw. chromosomach olbrzymich, które zostały zidentyfikowane jako *loci* genów *hsp* (Tissières i in., 1974). Od lat dziewięćdziesiątych XX w. białka Hsp znalazły się w centrum zainteresowań nauk biochemicznych. Badania wykazały, że białka te występują u organizmów prokariotycznych (bakterii i archeonów) i eukariotycznych (zwierząt i roślin), a charakteryzują się na ogół bardzo niską zmiennością budujących je sekwencji aminokwasów (Kregel, 2002; Al-Whaibi, 2011; Devaney, 2011). Na podstawie ich masy cząsteczkowej białka Hsp zostały podzielone na sześć głównych rodzin: Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 i tzw. małe białka szoku termicznego (*small heat shock proteins*, sHsps) (Gething i Sambrook,1992; Feder i Hofmann, 1999; Kampinga i in., 2009; Carra i in., 2017).

W warunkach fizjologicznych białka Hsp stanowią od 5 do 10% wszystkich białek wytwarzanych we wnętrzu komórki (Creagh i in., 2000; Garrido i in., 2001; Dinh i in., 2002). Występują głównie w cytoplazmie, w miejscach gdzie odbywa się proces biosyntezy białek, czyli w siateczce śródplazmatycznej, a także w mitochondriach i lizosomach. Przyłączają się także do cytoszkieletu podczas podziału komórkowego, przyczyniając się w ten sposób do stabilizowania tej struktury (Kiliańska i Ptasińska, 1999; Jolly i Morimoto, 2000). Uczestniczą także w podstawowych procesach fizjologicznych, odpowiadając za prawidłowe funkcjonowanie wszystkich organelli, szlaków metabolicznych i sygnalizacyjnych wewnątrz komórki (Creagh i in., 2000; Garrido i in., 2001; Dinh i in., 2002). Białka Hsp występują także na powierzchni komórek. Białka te są związane z błoną cytoplazmatyczną i biorą udział w odpowiedzi immunologicznej uczestnicząc w biosyntezie przeciwciał lub funkcjonując jako antygeny (np. Hsp70) (Menoret i in., 2000; Cymerys i Niemiałtowski, 2004; Schmitt i in., 2007). Podstawową funkcją białek Hsp jest rola ochronna, dlatego też nazywane są białkami opiekuńczymi (chaperon proteins). Uczestniczą w utrzymaniu i nadawniu prawidłowej przestrzennej (konformacji) łańcuchów białkowych zapobieganiu struktury oraz nieodwracalnej agregacji białek uszkodzonych (zdenaturowanych) (Hubbard i Sander, 1991; Zeng i in., 2004; Poulain i in., 2010). Zapobiegając agregacji zdenaturowanych białek, Hsp biorą udział w regulacji apoptozy. Kiedy komórka ulegnie poważnym uszkodzeniom, a naprawa zdenaturowanych białek nie jest możliwa, wtedy Hsp wraz z proteasomami powoduja jej eliminację (Lanneau i in., 2008). Ważną funkcją białek Hsp jest transport innych białek do miejsc ich przeznaczenia. Następuje to dzięki możliwości tworzenia z nimi przejściowych kompleksów (Kaźmierczuk i Kiliańska, 2010).



Ryc. 8. Czynniki biotyczne i abiotyczne aktywujące wzrost ekspresji genów szoku termicznego (wg Pilch i Piotrowska, 2011; zmodyfikowany).

Geny *hsp* są aktywowane przez stresogenne czynniki biotyczne i abiotyczne, które można podzielić na stresory środowiskowe (np. zbyt wysoka temperatura – hipertermia lub zbyt niska – hipotermia), stany patofizjologiczne oraz naturalne procesy fizjologiczne zachodzące w komórce (Morimoto, 1998) (Ryc. 8). Aktywacja genów *hsp* jest reakcją przejściową i odwracalną (Cymerys i Niemiałtowski, 2004). Regulacja ich ekspresji zachodzi na poziomie transkrypcji i translacji (Arya i in., 2007). Podczas podstawowych procesów fizjologicznych białkowy czynnik transkrypcyjny, nazywany także czynnikiem szoku cieplnego (*heat shock factor*, HSF), występuje w postaci nieaktywnego monomeru związanego z białkami Hsp. Powstały kompleks uniemożliwia przemieszczenie czynnika HSF do jądra komórkowego i wiązanie z nicią kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) (Cymerys i Niemiałtowski, 2004; Gupta i in., 2013). W wyniku zadziałania stresu komórkowego dochodzi do denaturacji białek, efektem tego jest odłączenie czynnika HSF od białek Hsp. Uwolnione monomery czynnika HSF ulegają fosforylacji przez kinazy białkowe i przemieszczają się do jądra komórkowego. W jądrze następuje trimeryzacja czynnika transkrypcyjnego HSF, co aktywuje HSF i umożliwia jego przyłączenie do konserwatywnej

sekwencji DNA, w obszarze promotorów genów *hsp* (Gupta i in., 2013). Konserwatywna sekwencja DNA nazywana jest elementem odpowiedzi na szok termiczny (*heat shock element*, HSE). Wiązanie HSF z DNA hamuje transkrypcję większości genów i indukuje wzrost transkrypcji genów *hsp* (Jolly i Morimoto, 2000; Kaźmierczuk i Kiliańska, 2010). Ponadto, powstający transkrypt jest bardziej stabilny, a jego wykorzystanie jest promowane w procesie translacji informacyjnego kwasu rybonukleinowego (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) do białek Hsp (Jolly i Morimoto, 2000; Kaźmierczuk i Kiliańska, 2010). Wytworzone w jądrze mRNA białek Hsp przemieszcza się do cytoplazmy, gdzie w rybosomach syntezowane są nowe białka Hsp. Powstałe białka Hsp tworzą przejściowe kompleksy z białkami zdenaturowanymi, umożliwiając im przyjęcie bądź odzyskanie natywnej struktury (renaturacja białek) (Cymerys i Niemiałtowski, 2004) (Ryc. 9). Schematycznie opisany poniżej mechanizm ochrony komórkowej przez białka Hsp przedstawia ich funkcje jako molekularnych białek w komórce oraz naprawie i ponownym fałdowaniu uszkodzonych, zdenaturowanych białek (Gupta i in., 2013) (Ryc. 9).



Ryc. 9. Mechanizm ochrony komórkowej przez białka Hsp (wg Gupta i in., 2013, zmodyfikowany).

# 1.4.1. Geny hsp u nicieni

Wiele badań wskazuje, że białka Hsp odgrywają istotną rolę w procesie adaptacji do środowiska i przetrwania w nim nicieni (Zhao i Wang, 2012; Seybold, 2015; Weinstein i in., 2019; Fanelli i in., 2021). Dotychczas geny hsp i kodowane przez nie białka Hsp najlepiej zbadano i opisano u wolnożyjącego bakteriożernego organizmu modelowego Caenorhabditis elegans (Maupas, 1900) (Kapulkin i in., 2005; Ramos, 2012; Frumkin i in., 2014; Feleciano i in., 2019; Ito i in., 2021). Badania dowiodły, że ekspresja genów hsp ma wpływ na długość życia C. elegans (Halaschek-Wiener i in., 2005; Heidler, 2009; Manière i in., 2014; Morley i Morimoto, 2004; Richter, 2015; Jiang i in., 2022). Wykazano również, że geny szoku termicznego u C. elegans są indukowane w odpowiedzi na różne stresory takie jak stres oksydacyjny (Hasegawa i in., 2010; Chen i in., 2013; Li i in., 2014; Chen i in., 2018; Govindan i in., 2018), pole elektromagnetyczne (Junkersdorf i in., 2000; Cranfield i in., 2004; Huang i in., 2008; Dawe i in., 2008), stres immunologiczny (Nowell i in., 1999; Bolz i in., 2010; Prithika i in., 2016; Eckl i in., 2017) czy toksyczne związki chemiczne (Roh i in., 2006; Saini i in., 2011; Kumarasingha i in., 2014; Ray i in., 2015; Avila i in., 2016; Ezemaduka i in., 2017; Li i in., 2018). Jednakże to szok termiczny (heat shock) jest jednym z czynników stresogennych, który jest najczęściej wykorzystywany w eksperymentach mających na celu aktywację genów hsp u C. elegans (Stringham i in., 1992; Mutwakil i in., 1997; Shim i in., 2003; Bacaj i Shaham, 2007; Adhikari i Adams, 2011; Maman i in., 2013; Labbadia i Morimoto, 2015; Crombie i in., 2016; Sandner i in., 2020; Fu i in., 2020; Huang i in., 2021; Pagliuso i in., 2021; Zhang i in., 2022). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że białka Hsp zapobiegają denaturacji białek na skutek działania wysokich temperatur w organizmach nicieni (Kim i in., 2017).

Do najczęściej badanych białek Hsp u *C. elegans* należą Hsp90 (Him, 2010; Prithika i in., 2016; Ryan i in., 2016; Zheng i in., 2020; Pant i in., 2021), Hsp70 (Heschl i Baillie, 1990; Maman i in., 2013; Labbadia i Morimoto, 2015; Crombie i in., 2016; Pagliuso i in., 2021), Hsp60 (Massie i in., 2003; Bar-Lavan i in., 2016; Liu i in., 2019; Wagner i in., 2019; Ito i in., 2021), Hsp40 (Kourtis i in., 2012; Hughes i in., 2019; Joshi i in., 2021) oraz małe Hsp (Kokke i in., 1998; Krause, 2013; Labbadia i Morimoto, 2015; Fu i in., 2020; Sandner i in., 2020; Fu i in., 2021).

Gen *hsp*90, kodujący białko Hsp90 (u *C. elegans* Daf-21), jest najlepiej poznanym genem *hsp* u nicieni (np. Him i in., 2009; Gillan i Devaney, 2014). Białko Hsp90 jest wysoce konserwatywnym białkiem (Hoter i in., 2018). Homologia sekwencji aminokwasowej członków tej podrodziny genów w organizmach eukariotycznych osiąga prawie 50%

(Polanowska-Grabowska i Gear, 2000). Białko to występuje głównie w cytoplazmie, ale także w mitochondriach oraz w siateczce śródplazmatycznej (Jakob i Buchner, 1994; Ishiguro i in., 2002; Inoue i in., 2003; Cao i in., 2003; Prassinos i in., 2008). W optymalnych warunkach białko Hsp90 stanowi 1-2% wszystkich białek występujących w komórce (Jakob i Buchner, 1994; Falsone i in., 2005). Białko Hsp90 wraz z Hsp70 są głównymi białkami opiekuńczymi w cytoplazmie komórek eukariotycznych. Odgrywają istotną rolę w kontroli jakości białek i eliminowaniu białek zdenaturowanych (Itoh i Tashima, 1991; Kubota, 2009; Hartl i in., 2011).

Białko Hsp70 występuje, podobnie jak Hsp90, w cytoplazmie, jądrze, retikulum endoplazmatycznym i mitochondriach. U *C. elegans* gen *hsp*1, który koduje białka Hsp70, bierze udział w regulacji długości życia tego organizmu (Morley i Morimoto, 2004; Craig, 2018). Te dwa białka opiekuńcze mogą współuczestniczyć w przebudowie i aktywacji różnych innych białek. U organizmów eukariotycznych, w tym u *C. elegans* Hsp90 i Hsp70 tworzą funkcjonalnie aktywny kompleks z białkiem Hop (*HSC70/HSP90 organizing protein*) działający jako pomost między tymi dwoma białkami (Gaiser i in., 2009; Doyle i in., 2019). Wyniki badań wskazują, że ekspresja Hsp70 jest nieodzowna w nabywaniu termotolerancji. Brak mechanizmów zabezpieczających przed szokiem cieplnym może wywoływać nieodwracalne uszkodzenia i prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu komórek i ich śmierci. Komórki "uodpornione" na stres temperaturowy wykazują podwyższony poziom białek Hsp70 (Kiliańska, 2002).

Funkcjonalnie białko Hsp60 jest podobne do białka Hsp70, ponieważ oba biorą udział w tworzeniu właściwej konformacji białek w trakcie procesu ich fałdowania (Hartl, 1996). Około 80% białek Hsp60 występuje w mitochondriach, natomiast 20% znajduje się poza tymi organellami (Habich, 2002). Hsp60 odgrywa ważną rolę jako białko opiekuńcze w wyniku działania stresu termicznego aby prawdopodobnie chronić mitochondria (Ewalt i in., 1997; Xu i in., 2010). Kammenga (1998) wykazał, że białko Hsp60 może być stosowane jako potencjalny biomarker stresu toksycznego u nicieni na działanie metali ciężkich – kadmu i miedzi. Kolejne badania wykazały także intensyfikację aktywności białek Hsp60 u *C. elegans* w odpowiedzi na czynnik stresowy jakim była symulowana mikrograwitacja (Liu i in., 2019).

Białka Hsp40 odgrywają istotną rolę w procesie hamowania agregacji białek i naprawie białek uszkodzonych, głównie poprzez stymulowanie aktywności ATPazy białek opiekuńczych takich jak Hsp70 (Qiu i in., 2006). W ten sposób chronią komórki przed działaniem stresu proteotoksycznego. Hsp40 odgrywają również ważną rolę w fałdowaniu powstających polipeptydów oraz translokacji białek przez błony (Ramos i in., 2008). U *C. elegans* grupy białek Hsp40 występują w cytosolu (białka Dnj12, Dnj13 i Dnj19) a także w mitochondriach (Dnj7) i retikulum endoplazmatycznym (Dnj16) (Schmauder i in., 2021).

Białka sHsps to rodzina białek opiekuńczych charakteryzujących się masą cząsteczkową 12-43 kDa. Podstawową funkcją sHsps jest utrzymanie homeostazy białek w odpowiedzi na różne warunki stresowe, w tym stres termiczny, hiperosmozę, stres oksydacyjny i głodzenie (Kegel i in., 1996; Wang i in., 2004; Haslbeck i in., 2005; Ungelenk i in., 2016; Janowska i in., 2019). Ekspresję genu *hsp*43, kodującego białko Hsp43 z grupy sHsp, obserwowano we wszystkich stadiach rozwojowych *C. elegans* (Ding i Candido, 2000). Wykazano, że u *C. elegans* aktywność białka Hsp43 jest indukowana w hipodermie i pełni istotną funkcję w odporności tego zwierzęcia na stres cieplny (Liu i in., 2018; Fu i in., 2020).

Badania genów szoku termicznego przeprowadzone dotychczas na nicieniach pasożytujących na roślinach należących do rodzaju Meloidogyne skupione są głównie na genie hsp90 i kodowanym przez ten gen białku Hsp90 (Handoo i in., 2005; De Luca i in., 2009; Bai i in., 2014; Eisenback i in., 2019; Kundu i in., 2021). Na podstawie wyników badań stwierdzono także, że gen hsp90 badany u Meloidogyne artiellia Franklin, 1961 jest homologiczny wobec genu daf-21 u C. elegans (De Luca i in., 2009). Część badań nad genem hsp90 dotyczyła molekularnej identyfikacji i filogenezy gatunków z rodzaju Meloidogyne na podstawie uzyskanej sekwencji DNA tego genu (Skantar i Carta, 2004; Skantar i in., 2008; Nischwitz i in., 2013; Eisenback i in., 2019). Prowadzono również badania wpływu temperatury na ekspresję genu hsp90 u M. artiellia (De Luca i in., 2009) i M. incognita (Bai i in., 2014). Badania wykazały różnice w poziomie ekspresji genu hsp90 między stadiami rozwojowymi M. artiellia w różnych temperaturach. W wyniku tych badań dowiedziono również, iż gen hsp90 odgrywa istotną rolę w przetrwaniu M. artiellia na różnych etapach jego rozwoju w zmieniających się warunkach środowiska (temperatury środowiska). Gen ten może także odgrywać decydującą rolę w chemorecepcji, zwłaszcza w interakcji między nicieniem fitofagicznym a korzeniami rośliny żywicielskiej (De Luca i in., 2009). W badaniach genu hsp90 u M. incognita (stadium J2) wykazano istotny wzrost ekspresji tego genu na temperaturę 4°C (stres zimna) i 39°C (stres gorąca) (Bai i in., 2014). Uzyskane wyniki badań nad nicieniami M. artilella i M. incognita wskazują, że ekspresja genu hsp90 może wpływać na rozwój i rozmnażanie guzaków (De Luca i in., 2009; Bai i in., 2014; Lourenço-Tessutti i in., 2015).

U guzaka północnego tak, jak w całym rodzaju *Meloidogyne* najczęściej badanym genem szoku termicznego jest gen *hsp*90 (Skantar i Carta, 2004; Handoo i in., 2005; Wu i in.,

2019). Jedne z pierwszych badań genu *hsp*90 dotyczyły molekularnej filogenezy *M. hapla* wykonanej na postawie otrzymanej sekwencji DNA tego genu (Skantar i Carta, 2004; Handoo i in., 2005). Sekwencja genu *hsp*90 była wykorzystana do opracowania szybkiego i specyficznego testu do wykrywania i oznaczania ilościowo DNA *M. hapla* w glebie (Omer i in., 2022). Badania dotyczące genu *Mh-hsp*90 u *M. hapla* wykazały wzrost ekspresji tego genu w wyniku działania dyfuzatu z nasion *Vicia sativa* L. (Dobosz i in., 2023). Również u tego gatunku badano wpływ stresowych temperatur oraz związków organicznych na ekspresję genu *hsp*90 (Wu i in., 2019). Równocześnie w warunkach działania tych czynników stresowych testowano 11 wybranych genów referencyjnych niezbędnych do badań ekspresji genów. Wykazano, że jednym z najbardziej stabilnych, odpowiednich genów referencyjnych do badań ekspresji genów u *M. hapla* jest gen dehydrogenazy jabłczanowej (*malate dehydrogenase, Mdh*) (Wu i in., 2019).

W genomie *M. hapla* zidentyfikowano również gen *hsp*70 (Weinstein i in., 2019). Przeprowadzono także badania dotyczące genów *Mh-hsp*1, *Mh-hsp*60, *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.3 mające na celu zbadanie wpływu działania dyfuzatu z nasion *Vicia sativa* L. na ekspresję tych genów w stadium J2 *M. hapla* (Dobosz i in., 2023). Brak natomiast informacji o badaniach pozostałych genów *hsp* lub kodowanych przez nie białek Hsp, które uzupełniłyby dotychczasowy stan wiedzy na temat czynności życiowych nicieni z rodzaju *Meloidogyne*, a w szczególności gatunku *M. hapla*. Badania genetyczne mające na celu zsekwencjonowanie genomu *M. hapla* wykazały, że nicień ten posiada najmniejszy genom spośród zbadanych dotychczas genomów zwierząt wielokomórkowych (Opperman i in., 2008). Poznanie sekwencji genów tego nicienia stwarza nowe możliwości badania jego procesów życiowych.

# 1.5. Wpływ temperatury na wybrane elementy procesów życiowych Meloidogyne

Obserwacje naukowe wykazały, że cechą wspólną organizmów, w tym nicieni, jest uwarunkowanie ich wzrostu i cyklu życiowego optymalną temperaturą środowiska. Czynnikiem ograniczającym funkcje życiowe są ekstrema temperaturowe (wysokie i nickie temperatury) wyznaczające granice ich tolerancji życiowej (Tsai, 2008). Temperatura otoczenia ogranicza również rozmieszczenie zwierząt, a także wpływa na ich aktywność (Lee i Atkinson, 1976). Nicienie zasiedlające glebę są eksponowane na działanie szerokiego zakresu temperatur. Temperatura powierzchni gleby może ulegać dużym wahaniom w ciągu dnia. Różnice wartości temperatury w dwudziestocentymetrowej wierzchniej warstwie gleby między sezonami sięgają nawet od 20°C do 30°C (Anderson i Coleman, 1982).

19

Dotychczas zbadano wpływ temperatury na wiele aspektów procesów życiowych nicieni. Wykazano, że temperatura wpływa między innymi na tempo rozwoju osobniczego i tempo rozwoju populacji (Laughlin i in., 1969; Triantaphyllou, 1973; Malek, 1980; Karssen i Moens, 2006; Charchar i Santo, 2001, 2009; Kaczmarek i in., 2019; Ewing i in., 2021; Tatli i in., 2021; Giné i in., 2021), proporcję płci w populacji (Griffin, 1969; Laughlin, 1969; Evans i Fisher, 1970; Hansen i in., 1972; Greet, 1978; Melton i in., 1986), wymiary ciała osobników (Evans i Fisher, 1970; Doucet i in., 2001; Kammenga i in., 2007; So i in., 2012), zdolność poruszania się (Dusenbery, 1978; Prot i Van Gundy, 1981; Morris i in., 2011; Khan i in., 2014; Boroş i in., 2018) oraz infekcyjność (Wallace, 1969; Rebois, 1973; Griffin, 1974; Umesh i Ferris, 1994; Khan i in., 2014).

#### 1.5.1. Wpływ temperatury na cykl życiowy Meloidogyne

Temperatura jest jednym z czynników determinujących przebieg cyklu rozwojowego guzków. Wpływa ona między innymi na proces opuszczania osłon jajowych przez osobniki inwazyjne guzaków oraz na rozwój wszystkich kolejnych stadiów aż do form dojrzałych płciowo (Boroş i in., 2018). Jest również jednym z czynników ograniczających zdolność kolonizowania i zadomowienia nicieni w nowych siedliskach, co ma znaczenie dla procesu rozprzestrzeniania się guzaków oraz dla stopnia ich szkodliwości (Karssen i Moens, 2006).

W obrębie rodzaju Meloidogyne można wyróżnić dwie odrębne grupy gatunków takie jak termofile i kriofile. Grupy te zostały wydzielone ze względu na zdolność tych nicieni do przetrwania w temperaturze 10°C. M. hapla, M. chitwoodi Golden, O'Bannon, Santo i Finley, 1980 oraz M. naasi Franklin, 1965 są kriofilami, ponieważ są w stanie przetrwać w glebie w temperaturze poniżej 10°C. Natomiast M. incognita, M. javanica i M. exigua są termofilami i nie są zdolne do rozwoju w temperaturze gleby poniżej 10°C. W obrębie jednego gatunku moga występować tzw. termotypy – populacje, które inaczej reagują na tę samą temperaturę. Takie populacje różnią się od siebie niewielkimi wartościami minimalnych temperatur inicjujących proces wylegu, co prawdopodobnie wynika z dostosowania się populacji do lokalnych amplitud temperaturowych i dostępności rośliny żywicielskiej (Lee i Atkinson, 1976; Karssen i Moens, 2006). Prawdopodobnie z tego też względu, w wielu badaniach wykazywane są rozbieżne wartości temperatur, mające istotny wpływ na przebieg cyklu życiowego M. hapla (Tab. 1) (Daulton i Nusbaum, 1961; Sturhan, 1968; Dao, 1970; Stephan i Trudgill, 1982). Stwierdzono, że zaobserwowane rozbieżności w optimach temperaturowych są wynikiem zastosowania różnych ras nicieni w przeprowadzonych eksperymentach (Stephan i Trudgill, 1982). Różnice te mogą być związane ze zdolnością różnych populacji guzaka północnego do tolerowania szerszego zakresu temperatur. Stephan (1983) w swoich badaniach wykazał różnice w stopniu infekcji korzeni pomidora między trzema różnymi populacjami *M. hapla*, poddanych działaniu tych samych temperatur. Podobnie Bergeson (1959) wykazał różnice w przeżywalności stadium J2 między dwoma populacjami *M. hapla* obserwowanych w identycznych temperaturach. Różnice w obserwacjach wpływu temperatury na nicienie z rodzaju *Meloidogyne* wykazywane między publikowanymi badaniami mogą także wynikać z niewystandaryzowanych warunków eksperymentalnych, jakim poddawane były nicienie w różnych laboratoriach (Evans i Perry, 2009).

Stadium jaja i stadium młodociane J2 guzaka północnego występują w glebie (poza rośliną żywicielską), co powoduje, że są one najbardziej narażone na działanie czynników zewnętrznych, w tym temperatury środowiska (Bird i Wallace, 1965; Wallace, 1966; Davide i Triantaphyllou, 1968; Bird, 1972; Prot i Van Gundy, 1981; Evans i Perry, 2009). Według Vrain i in. (1978) stadium jaja oraz znajdujące się jeszcze wewnątrz jaja stadium J1, są bardziej odporne na działanie niskich temperatur niż osobniki stadium J2. Prawdopodobnie chitynowa osłona jaja stanowi izolacyjną barierę między wewnętrzną zawartością a środowiskiem zewnętrznym. Ponadto złoża jajowe otoczone są galaretowatą masą składającą się z tzw. macierzy glikoproteinowej, która utrzymuje jaja razem i chroni je przed niekorzystnymi warunkami środowiska, w tym też przed ekstremalnymi temperaturami (Sharon i Spiegel, 1993). U stadium J2 *M. hapla*, które nie posiada tej dodatkowej ochrony przed niekorzystnymi warunkami środowiska zewnętrznego, obserwowano szybką śmierć świeżo wylęgniętych osobników w temperaturze 4°C (Forge i MacGuidwin, 1992; Castagnone-Sereno, 2006).

Jedne z pierwszych badań dotyczących wpływu temperatury na przeżywalność stadium jaja i stadium J2 *Meloidogyne* przeprowadził Bergeson (1959) wykorzystując w tym celu *M. hapla* oraz *M. incognita*. Doświadczenie polegało na oddzielnym umieszczeniu w glebie jaj lub osobników J2 i inkubacji obu stadiów w tych samych temperaturach i czasie. Następnie do gleby z nicieniami wysadzano rośliny pomidora, które rosły przez pięć tygodni w optymalnych dla nich warunkach. Po tym czasie liczono guzy na korzeniach roślin pomidora i przez porównanie do liczby uprzednio inkubowanych w doświadczeniu jaj i osobników J2 oceniono śmiertelność badanych stadiów rozwojowych. Wykazano, że osobniki stadium J2 *M. hapla* przeżywały w temperaturze 0°C ponad 16 dni, natomiast śmiertelność osobników J2 *M. incognita* osiągnęła 100% już po 7 dniach. Stadium J2 *M. hapla* w liczbie 500 osobników po 4 tygodniach inkubacji w temperaturze 5°C było wstanie wniknąć i wytworzyć 7,6 guza na korzeniu (średnia z 5 powtórzeń). W tej samej temperaturze

obserwowano 100% śmiertelność form J2 *M. incognita* już po 2 tygodniach trwania eksperymentu. Nicienie w stadium jaja *M. hapla* zachowały żywotność przez 90 dni w temperaturze 0°C. W tej samej temperaturze, w populacji *M. incognita* stadium jaja przetrwało jedynie 50 dni. Stwierdzono, że *M. hapla* jest lepiej przystosowany do życia w chłodniejszym klimacie (Bergeson, 1959).

Dalsze badania wykazały, że optymalna temperatura rozwoju wszystkich stadiów guzaka północnego oraz optymalna temperatura wnikania w tkanki korzenia roślin stadium J2 mieści się w zakresie od 15°C do 30°C (Daulton i Nusbaum, 1961; Bird i Wallace, 1965; Griffin i Jorgensen, 1969; Taylor i Sasser, 1978; Griffin i Jensen, 1997; Charchar i Santo, 2009). Wykazano, że w zakresie temperatur od 15 do 20°C infekcyjność osobników J2 wobec korzeni roślin pomidora była najwyższa (Bird i Wallace, 1965). Oceniono, że optymalną temperaturą rozwoju zarodka jest 30°C, gdyż w tych warunkach opuszczenie osłon jajowych przez osobniki J2 nastąpiło najszybciej, czyli już po 10 dniach inkubacji (Charchar i Santo, 2001).

Temperatury ekstremalne (stresowe), które znacząco ograniczają rozwój guzaka północnego to 6°C (stres zimna) i 35°C (stres gorąca). W temperaturze 6°C embrionalny rozwój jaj zatrzymuje się w stadium gastruli (Charchar i Santo, 2001) a w temperaturze 35°C dochodzi do upośledzenia składania jaj przez samice (Thomason i Lear, 1961). Vrain i Barker (1978) stwierdzili, że minimalną temperaturą, w której może przebiegać dalszy rozwój stadium J2 u *M. hapla* jest 8,8°C. Inserra i in., (1983) wykazali, że w 10°C embriogeneza *M. hapla* przebiegała wolniej i zakończyła się dopiero po 97 dniach inkubacji.

Temperatura	Stadium rozwojowe	Wpływ na organizm <i>Meloidogyne hapla</i>	Literatura		
0°C	jaja	Możliwość przeżycia ponad 90 dni.	Bergeson, 1959		
0°C	J2	Możliwość przeżycia do 16 dni.	Bergeson, 1959		
5°C	J2	Zdolność do infekcji korzenia pomidora po 4 tyg. inkubacji	Bergeson, 1959		
6°C	jaja	Zahamowanie rozwoju jaj w stadium gastruli.	Charchar i Santo, 2001		
6°C	J2	Stadium zdolne do infekowania korzeni roślin, niezdolne do rozwinięcia się w formy dojrzałe płciowo.	Charchar i Santo, 2009		
6,74°C	jaja	Zahamowanie rozwoju jaj.	Vrain i Barker, 1978		
8°C	J2	Stadium zdolne do infekowania korzeni roślin, niezdolne do rozwinięcia się w formy dojrzałe płciowo.	Vrain i in., 1978		
8,25°C	wszystkie stadia	Minimalna temperatura pełnego cyklu życiowego.	Lahtinen i in., 1988		
8,8°C	J2	Minimalna temperatura do dalszego rozwoju.	Vrain i in., 1978		
15-20°C	J2	Optymalne warunki infekcji korzeni roślin.	Bird i Wallace, 1965		
Dalsza część Tabeli na następnej stronie					

Tabela 1. Wpływ różnych wartości temperatury na wybrane procesy życiowe Meloidogyne hapla.

16-20°C	jaja	Optymalne warunki rozwoju jaj do stadium J2.	Vrain i Barker, 1978
20°C	J2	Optymalne warunki poruszania się stadium J2.	Bird i Wallace, 1965
20°C	J2	Optymalne warunki infekcji korzeni roślin pomidora.	Kinloch i Allen, 1972
20°C	J2	Po czterech tygodniach od wylęgu przeżycie drastycznie spada.	Boroș i in., 2018
24°C	jaja	Optymalne warunki dla procesu embriogenezy, maksymalna liczba wylęgniętych osobnikówJ2.	Charchar i Santo, 2001
25°C	jaja	Maksymalna liczba wylęgniętych osobników J2.	Bird i Wallace, 1965
25°C	jaja	Maksymalna liczba wylęgniętych osobników J2.	Inserra i in., 1983
25°C	wszystkie stadia	Optymalne warunki odbycia pełnego cyklu życiowego.	Kinloch i Allen, 1972
25-30°C	samica	Optimum znoszenia jaj przez samice i odbycia pełnego cyklu życiowego.	Thomason i Lear, 1961
30°C	samica	Optimum znoszenia jaj przez samice i odbycia pełnego cyklu życiowego.	Charchar i Santo, 2009
35°C	J2	Stadium J2 niezdolne do infekcji korzeni roślin pomidora./Urata zdolności infekowania korzeni roślin pomidora przez nicienie stadium J2.	Kinloch i Allen, 1972
35°C	samica	Upośledzenie składania jaj.	Thomason i Lear, 1961
36°C	jaja	Temperatura letalna.	Daulton i Nusbaum, 1961

# 1.5.2. Wpływ temperatury na aktywność ruchową Meloidogyne

Jedynymi stadiami rozwojowymi w rodzaju Meloidogyne zdolnymi do aktywnego poruszania się w glebie sa osobniki stadium J2 oraz stadium dojrzałe – samce (Moens i in., 2009). Oba stadia poruszają się w podobny sposób jak większość nicieni. Poruszanie się nicieni przypomina ruch pełzającego weża. Polega on na wykonywaniu powtarzających się falistych zgięć ciała, które zaczynają się od przodu (głowy) przesuwając się do końca ciała, czyli do ogona (Croll, 1970; Croll i Sukhdeo, 1981; Burr i Robinson, 2004). Ten falisty (sinusoidalny) ruch możliwy jest dzięki rytmicznemu kurczeniu się i rozluźnianiu mięśni gładkich na przemian po obu stronach ciała w płaszczyźnie grzbietowo-brzusznej (Ryc. 10) (Brzeski i Sandner, 1974; Buchsbaum i in., 1987). Nicienie poruszają się na boku ciała. Taki sposób poruszania się determinuje brak mięśni poprzecznych u nicieni (Brzeski i Sandner, 1974). Zbadano, że przejście pojedynczej fali zajmuje od 2 do 5 sekund, a związane z tym przemieszczenie osobników J2 trwa dłużej, niż u innych nicieni. Przepływ fal przez ciało nicienia zachodzi nieprzerwanie do momentu napotkania przeszkody. Odpowiedzią na napotkaną przeszkodę jest zatrzymanie się nicienia, ocena napotkanego otoczenia przednim końcem ciała, a następnie wznowienie ruchu w nowym kierunku. W doświadczeniu przeprowadzonym w płytkach z agarem zaobserwowano, że stosunek amplitudy do długości

fali zmienia się bezpośrednio wraz z oporem podłoża otaczającego nicienia (Robinson i Perry, 2006).



Ryc. 10. Schemat sinusoidalnego poruszania się nicienia między cząsteczkami gleby (wg Wallace, 1968).

Temperatura wpływa na aktywność ruchową osobników stadium J2 podczas wylęgania się, przemieszczania się w glebie jak i wnikania do wnętrza korzenia rośliny żywicielskiej (Prot i Van Gundy, 1981; Roberts, 1987; Jeffers i Roberts, 1993; Ploeg i Maris, 1999). Prot i Van Gundy (1981) wykazali, że aktywność ruchowa osobników J2 *M. incognita* osiągnęła maksimum w temperaturze 20°C, podczas gdy osobniki stadium J2 *M. hapla* przemieszczały się równie szybko także w niższych temperaturach (18°C, 14°C). Aktywność ruchowa osobników J2 *M. javanica* wzrosła w zakresie temperatur od 25°C do 30°C (Bird i Wallace, 1965; Wallace, 1966). Pinkerton i in. (1987) wykazali, że aktywność ruchowa J2 *M. chitwoodi* i *M. hapla* była większa w 18°C niż w 12°C. W temperaturach 12°C, 18°C i 24°C osobniki J2 *M. chitwoodi* przemieszczały się na większe odległości i w większej liczbie, niż osobniki analogicznego stadium *M. hapla*.

Optymalne temperatury do infekowania korzeni sałaty przez *M. hapla* przedstawiono w artykule Wong i Mai (1973). Wykazano, że najwięcej osobników J2 aktywnie wnikało do korzeni sałaty w temperaturach 21,1°C (noc) i 26,7°C (dzień) a najmniej w temperaturach 15,5°C (noc) i 21,1°C (dzień). Istotne obniżenie aktywności ruchowej *M. hapla* obserwowano w temperaturze 4°C oraz w temperaturach wyższych w zakresie od 30°C do 35°C (Bird i Wallace, 1965; Boroș i in., 2018). Powyższe wyniki sugerują, że istnieje optymalny zakres temperatur dla aktywności ruchowej i może on być specyficzny dla poszczególnych gatunków z rodzaju *Meloidogyne* (Robinson i Perry, 2006).

## 1.5.3. Wpływ temperatury na wzrost i masę Meloidogyne

Temperatura, w jakiej organizm się rozwija może wywierać istotny wpływ na wielkość jego ciała. W środowiskach chłodniejszych większość zwierząt zmiennocieplnych rośnie wolniej, osiągając większe rozmiary ciała. Takie zjawisko nazywane jest regułą zależności wielkości ciała od temperatury otoczenia (temperature size rule, TSR) (Atkinson, 1994; Atkinson i in., 2003). Wykazano, że osobniki C. elegans rozwijające się w temperaturze 12°C były dużo większe (długość i szerokość ciała) niż te hodowane w temperaturze 24°C (Kammenga i in., 2007). Wykazano również związek między temperaturą a wzrostem ciała dwóch innych wolnożyjących gatunków nicieni. Dowiedziono, że osobniki Pelodera (Rhabditis) strongyloides (Scheider, 1860) i Pellioditis (Rhabditis) typica (Stefanski, 1922) rozwijające się do stadium dojrzałego w temperaturze 12°C miały dłuższe i szersze ciała niż te, których rozwój zachodził w temperaturze 25°C (So i in., 2012). Temperatury w zakresie od 16 do 28°C miały również wpływ na długość ciała samic i samców nicienia Pratylenchus vulnus Allen i Jensen, 1951. Największą wartość współczynnika "a" (stosunek długości do szerokości ciała nicienia) samice osiągneły w temperaturze 21°C a najniższą wartość w 16°C. Maksymalną wartość współczynnika "a" dla samców P. vulnus obserwowano w temperaturze 28°C, a najniższą w 25°C (Doucet i in., 2001).

Temperatura oddziałując na wielkość ciała organizmu równocześnie wpływa też na jego masę (biomasę) (Van der Have i De Jong, 1996). Biomasę stanowi masa materii zawarta w każdym żywym organizmie w danym czasie, w odniesieniu do jednostki powierzchni lub objętości (Łabno, 2006). Nicienie, mimo że są jednym z najliczniejszych typów w królestwie zwierząt, stanowią jedynie 1% całkowitej biomasy zwierząt na ziemi (Bar-On i in., 2018). W przeprowadzonym globalnym badaniu oszacowano, że około 0,3 gigaton nicieni zamieszkuje gleby powierzchniowe na całym świecie z większą liczebnością w regionach subarktycznych (38% ogółu), niż w umiarkowanych (24%) lub regionach tropikalnych (21%) (Van den Hoogen i in., 2019). Wskaźnik biomasy wyliczany dla różnych grup troficznych nicieni glebowych wykorzystywany był w wielu badaniach ekologicznych np. do oceny stopnia sukcesji nematofauny zachodzącej w różnych środowiskach (Smolik i Lewis, 1982; De Goede i in., 1993; Afzal i in., 2021) oraz jako bioindykator oceny stanu środowiska (Losi i in., 2013; Grzelak i in., 2016; Thai i in., 2022).

Wskaźnik biomasy znalazł zastosowanie także w badaniach opisujących interakcje zachodzące między nicieniami fitofagicznymi a ich roślinami żywicielskimi, prowadzonych w kierunku poszukiwania odporności roślin użytkowych na porażenie przez nicienie. W badaniach wykonanych przez Melakeberhan i Ferris (1988) infekowano nicieniami w stadium J2 *M. incognita* sadzonki winorośli (*Vitis vinifera* L.) odmiany Colombard i Thompson, a po 36 dniach obliczono m.in. biomasę samic i ich złóż jajowych pochodzących z korzeni badanych roślin. Wykazano, że biomasa nicieni, jakie rozwinęły się na korzeniach winorośli odmiany Colombard była znacznie wyższa od biomasy nicieni pasożytujących na odmianie Thompson.

Badano również biomasę nicieni *Meloidogyne graminicola* Golden i Birchfield, 1968 rozwijających się na korzeniach ryżu (*Oryza sativa* L.) w powiązaniu z objawami chorobowymi wywołanymi przez tego nicienia. Wykazano, że rośliny ze stosunkiem całkowitej biomasy nicieni do biomasy korzenia powyżej 1:161 nie wykazywały żadnych objawów chorobowych, natomiast te z proporcjami od 1:43 do 1:20 wykazywały silne zahamowanie wzrostu sadzonek ryżu przez *M. graminicola* (Singh i in., 2006).

Wskaźnik biomasy określano również w badaniu porównawczym oceniającym rozwój *M. hapla* i *M. javanica* na roślinach pomidora w różnych temperaturach. Wykazano, że biomasa samic *M. hapla* po 28 dniach rozwoju na korzeniach pomidora w temperaturze od 20 do 25°C była dwukrotnie wyższa niż samic *M. javanica* (Bird i Wallace, 1965; Evans i Perry, 2009).

# 1.5.4. Wpływ temperatury na zawartość lipidów w organizmie Meloidogyne

Osobniki stadium J2 nie odżywiają się podczas poszukiwania korzeni rośliny żywicielskiej aż do wniknięcia do korzenia i dotarcia do docelowego miejsca dalszego rozwoju osobniczego (Karssen i Moens, 2006). Przeżycie w niekorzystnych warunkach oraz zdolność infekowania korzeni przez stadium J2 zależy w dużej mierze od ilości zgromadzonych w ciele materiałów zapasowych (rezerw energetycznych), powstających podczas rozwoju embrionalnego (Van Gundy i in., 1967; Lee i Atkinson, 1976; Selvan i in., 1993; Fitters i in., 1997; Wright i Perry, 2006; Rocha i in., 2015).

Tłuszcze (lipidy) obojętne są podstawowym materiałem gromadzącym rezerwy energii w organizmie nicieni, a wśród nich największy udział stanowią trójglicerydy (Lee i Atkinson, 1976). Jest ich zwykle ponad 70% (nawet do 94%) w porównaniu do pozostałych lipidów (Chitwood, 1998). Organellami komórkowymi magazynującymi te tłuszcze są krople lipidowe (*lipid droplets*). Są sferycznego kształtu, a ich powierzchnię tworzy pojedyncza warstwa fosfolipidowa (Jędrzejowska, 2010). W komórkach występuje różna liczba kropli lipidowych, które różnią się rozmiarem. U *C. elegans* są to struktury wielkości od 1 do 1,5 μm i występują w tkance ściany jelita i hipodermie (Suzuki i in., 2011; Shi i in., 2013).

Oprócz magazynowania i uwalniania zgromadzonych tłuszczów krople lipidowe uczestniczą w wewnątrzkomórkowym transporcie lipidów i fosfolipidów oraz posiadają zdolność wiązania białek. Podwyższona zawartość białek w komórce może wpływać toksycznie na jej działanie, a zdolność kropli lipidowych do wiązania białek może prowadzić do ich czasowej inaktywacji chroniąc komórkę przed uszkodzeniem (Jędrzejowska, 2010).

Z uwagi na wspomniane wcześniej znaczenie tych organelli komórkowych, zarówno krople lipidowe, jak i tłuszcze w nich zawarte, stały się przedmiotem wielu badań u *C. elegans*. Badania te dotyczyły m.in.: wpływu czynników egzo- i endogennych na metabolizm kropli lipidowych w organizmie *C. elegans* (Mullaney i Ashrafi, 2009; Chughtai i in., 2015; Cao i in., 2019; Xie i in., 2019; An i in., 2023), opracowania metod wizualizacji kropli lipidowych w organizmie tego nicienia (Zhang i in., 2010; Klapper i in., 2011) a także analizy składu tłuszczów obojętnych zawartych w kroplach lipidowych u *C. elegans* (Zhang i in., 2012; Vrablik i in., 2015).

Badaniem tłuszczów zawartych w kroplach lipidowych objęto również guzaki (Hunt i Handoo, 2009). Zawartość tłuszczów obojętnych oceniono u głodzonych osobników J2 *Meloidogyne fallax* Karssen, 1996 i *M. chitwoodi* po 6- i 12-tygodniowej inkubacji w temperaturze 4°C, 10°C i 20°C. Wyniki porównano z zawartością lipidów u świeżo wylęgniętych osobników J2 (do 24 godzin od wylęgu) tych gatunków. W przypadku obu gatunków zawartość lipidów była najniższa po 6 i 12-tygodniowej inkubacji w 20°C. Po 6 tygodniach inkubacji w temperaturze 4°C osobniki J2 *M. chitwoodi* miały istotnie wyższe rezerwy lipidów niż osobniki *M. fallax*. W pozostałych wariantach eksperymentu temperatury i czasu inkubacji to osobniki J2 *M. fallax* miały znacząco wyższą zawartość lipidów niż osobniki J2 *M. fallax* miały znacząco wyższą zawartość lipidów było pozytywnie skorelowane z zawartością lipidów w ich ciałach (Das i in., 2011).

Badania zawartości lipidów przeprowadzono także u *M. exigua* Goeldi, 1892 i *M. incognita.* W tym celu głodzone osobniki stadium J2 inkubowano w temperaturze 28°C przez 3, 6, 9 i 12 dni. Zawartości lipidów porównano do ich zawartości u świeżo wylęgniętych osobników J2 (do 24 godzin od wylęgu). Wykazano, że wraz z upływem czasu inkubacji następowała redukcja zawartości lipidów w ciałach osobników J2 u obu badanych gatunków. Już po 6 dniach inkubacji zawartość lipidów u osobników J2 *M. incognita* i *M. exigua* była o ponad 50% niższa w porównaniu do ich pierwotnego poziomu. Po 12 dniach inkubacji zawartość lipidów u J2 *M. exigua* spadła do 9%, a u J2 *M. incognita* była nieznacznie wyższa i wyniosła 11%. Wykazano także korelację między zawartością lipidów u *M. incognita* a infekcyjnością i reprodukcją tego gatunku. Wraz ze spadkiem ilości lipidów spadała zdolność

osobników J2 do infekcji korzeni pomidora. Najniższą zdolność infekowania korzeni posiadały osobniki J2 *M. incognita* po 12 dniach głodzenia (Rocha i in., 2015).

W pracy Shivakumara i in. (2018) przedstawiono wyniki badań dotyczące zawartości lipidów u *M. incognita*. Przez 2, 4, 6, 8 i 10 dni głodzone osobniki stadium J2 inkubowano w temperaturze 28°C. Otrzymane wyniki porównywano z zawartością lipidów mierzoną u świeżo wylęgniętych osobników J2 (do 24 godzin od wylęgu). Tak jak w powyżej opisanych badaniach również wykazano redukcję zawartości lipidów, która wyniosła 60,3% po 2 dniach inkubacji aż do 23,5% po 10 dniach głodzenia osobników J2. Badania wykazały również, że głodzenie osobników J2 wpływało w późniejszym etapie rozwoju na obniżenie rozmnażania tego nicienia na korzeniach bakłażana (*Solanum melongena* L.). Po 0, 2, 4, 6, 8 i 10 dniach głodzenia 500 osobników J2 wykorzystano do porażenia korzeni bakłażana. Po 15 dniach od infekcji na korzeniach obserwowano najwyższą liczbę guzów w wariancie eksperymentu, gdzie osobniki stadium J2 nie były głodzone (0 dni) a najniższą gdzie osobniki J2 głodzono przez 10 dni (Shivakumara i in., 2018).

# 2. Cel pracy

Głównym celem pracy było zbadanie reakcji nicienia *M. hapla* na zmiany temperatury środowiska zewnętrznego. Obejmował on następujące cele szczegółowe:

I. Analiza wpływu wybranych temperatur i czasu inkubacji na ekspresję genów (na poziomie transkrypcji) *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*1, *Mh-hsp*4, *Mh-hsp*6, *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19, *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2 badanych w stadium jaja i stadium J2;

II. Zbadanie oddziaływania wybranych temperatur i czasu inkubacji na stadium jaja wyrażone przez parametry stanu fizjologicznego (kondycji) (długość, szerokość, masa ciała) mierzone u wylęgniętych z tych jaj osobników stadium J2;

III. Zbadanie wpływu wybranych temperatur i czasu ekspozycji na parametry stanu fizjologicznego (kondycji) osobników stadium J2 poprzez zmierzenie długości, szerokości i masy ciała oraz masy i powierzchni wybarwionych lipidów u tych organizmów;

IV. Zbadanie oddziaływania wybranych temperatur i czasu inkubacji na aktywność ruchową osobników stadium J2.

### 3. Materiały i metody

#### **3.1. Materiał badawczy**

Do badań wykorzystano osobniki *M. hapla,* pozyskane z korzeni marchwi zwyczajnej (*Daucus carota* L.) pochodzącej z przemysłowej uprawy z powiatu sieradzkiego (woj. łódzkie). Nicienie hodowano na roślinach pomidora (*S. lycopersicum,* odmiana Moneymaker), która jest rośliną modelową w badaniach interakcji między rośliną żywicielem a nicieniami pasożytami roślin z rodzaju *Meloidogyne* (Seid i in., 2015).

Nasiona roślin pomidora poddano kiełkowaniu na wilgotnej bibule umieszczonej w szalkach Petriego (Ø 10cm) w ciemności, w temperaturze 20°C. Skiełkowane nasiona przeniesiono do doniczek (Ø 10cm), wypełnionych podłożem glebowym. Natępnie rośliny te umieszczono w komorach fitotronowych, gdzie rosły w warunkach temperatury 20°C/18°C (dzień/noc) i fotoperiodzie 16/8 godzin (dzień/noc) do czasu uzyskania od czterech do pięciu liści właściwych (BBCH 14-15 – skala wykorzystywana w państwach UE do identyfikacji fitofenologicznych faz wegetacji roślin uprawnych) (Hack i in., 1992). Po czym rośliny przesadzono do wazonów wypełnionych podłożem glebowym (1:1 zwirku i gleby do produkcji warzyw), w którym znajdowały się nicienie w stadium J2, w liczbie 50 osobników przypadających na 200 cm<sup>3</sup> gleby. W czasie wegetacji roślin warzywnych (N 3%, K 2%, Cu 70mg/L, Fe 400mg/L, Mn 170mg/L, Mo 20mg/L, Zn 150mg/L) zgodnie z zaleceniem producenta. Hodowlę nicienia utrzymywano w komorach fitotronowych, w wazonach, w temperaturze 20°C/18°C (dzień/noc) i fotoperiodzie 16/8 godzin (dzień/noc).

Po upływie 60 dni korzenie roślin pomidora zostały delikatnie wyjęte z gleby i opłukane wodą. Z oczyszczonych korzeni mechanicznie pozyskiwano złoża jajowe nicienia (Ryc. 11), które zanurzone zostały w wodzie, w szalkach Petriego (Ø 3,5cm, wys. 1cm). Wykorzystując mikroskop stereoskopowy (Leica M205 C) dokonano segregacji złóż jajowych oceniając etap ich rozwoju w oparciu o wielkość i zabarwienie. Złoża jajowe na wczesnym etapie rozwoju są mniejsze, białe i zawierają jaja na etapie rozwoju embrionalnego prowadzącego do powstania stadium J1. Dojrzałe złoża jajowe są większe, brązowe i zawierają jaja na różnych etapach rozwoju zarodka, również stadia J1 oraz gotowe do opuszczenia osłon jajowych stadia J2 (De Luca i in., 2009; Evans i Perry, 2009; Díaz-Manzano i in., 2016). Do badań stadium jaja wybierane były białe złoża jajowe na wczesnym etapie rozwoju.

Osobniki stadium J2 pozyskiwano ze wszystkich złóż jajowych, zarówno tych mniej lub bardziej dojrzałych. W tym celu złoża jajowe inkubowano w wodzie w szalkach Petriego
w optymalnej temperaturze 20°C do czasu wyjścia osobników J2 z osłon jajowych (Vrain i Barker, 1978).



Ryc. 11. Złoże jajowe *Meloidogyne hapla* na korzeniu pomidora (fot. Ł. Flis).

Do badań wykorzystano dwa stadia rozwojowe: stadium jaja (pojedyncze jaja lub jaja zgromadzone w złożu jajowym) i osobniki w drugim stadium rozwojowym (stadium J2). W tych etapach rozwoju nicienie z rodzaju *Meloidogyne* występuja poza roślina żywicielską i są najbardziej narażone na bezpośrednie działanie stresorów środowiskowych (De Luca i in., 2009). Obydwa stadia inkubowano w temperaturach 5°C, 10°C, 20°C, 30°C, 35°C i 40°C w czasie: 1, 2, 8 i 24 godziny, natomiast tylko osobniki J2 inkubowano dodatkowo przez 336, 1008 i 1344 godziny. Za temperatury stresowe dla Meloidogyne uznano: 5°C - tzw. stres zimna (cold stress) (Vrain i Barker, 1978; Charchar i Santo, 2001; Gulyas i Powell, 2022) oraz 35°C i 40°C – tzw. stres goraca (heat stress) (Thomason i Lear, 1961; Kinloch i Allen, 1972; Treinin i in., 2003). Temperatury niestresowe to temperatury od 10°C do 30°C, ponieważ ontogeneza tego gatunku nicienia przebiega w tych temperaturach normalnie, ale w różnym tempie (Thomason i Lear, 1961; Inserra i in., 1983). Jako kontrolę dla wszystkich doświadczeń przyjęto temperaturę 20°C, uważaną za optymalną dla rozwoju *M. hapla* (Bird i Wallace, 1965; Kinloch i Allen, 1972) (Ryc. 12). Ekspozycję nicieni na wymienione temperatury prowadzono w inkubatorze (Shaking incubator, NB-205V). Wszystkie doświadczenia przeprowadzane były w trzech powtórzeniach.



Ryc. 12. Temperatury stresowe, niestresowe oraz optymalna temperatura rozwoju nicienia *Meloidogyne hapla* (O – temperatura optymalna / kontrola) (wg Kinloch i Allen, 1972; Vrain i Barker, 1978; Vrain i in., 1978; Charchar i Santo, 2001) (rys. Ł. Flis).

### 3.2. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp

## 3.2.1. Inkubacja

Doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach według zmodyfikowanej metodyki De Luca i in. (2009). Oddzielnie w każdej szalce Petriego (Ø 3,5 cm, wys. 1 cm) w wodzie destylowanej (4 ml) umieszczono 1 złoże jajowe (stadium jaja) lub 200 świeżo wylęgniętych osobników stadium J2 (do 24 godzin od wylęgu). Szalki z każdym z wymienionych stadiów inkubowano w odpowiedniej temperaturze przez 1, 2, 8 i 24 godziny oraz osobniki J2 dodatkowo inkubowano przez 336, 1008 i 1344 godziny w temperaturach stresowych i niestresowych (Tab. 2). Wartości temperatur (5°C i 30°C) i czas ich działania (1, 2, 8, 24 godziny) wybrano analogicznie do badań prowadzonych na *M. artiellia* przez De Luca i in. (2009). Kontrolą w tym doświadczeniu było stadium jaja oraz osobniki stadium J2 inkubowane w temperaturze 20°C. Po inkubacji nicienie niezwłocznie przenoszono do 800 µl fenozolu i przechowywano w temperaturze -20°C w celu zabezpieczenia materiału do izolacji całkowitego RNA (zgodnie z protokołem załączonym do zestawu Total RNA Mini firmy A&A Biotechnology).

Stadium	Czas			Liczba powtórzeń	Geny <i>hsp</i>				
rozwojowe	inkubacii	Stres zimna	Temp	eratury nies	eratury niestresowe Stres go				
3	(godzina)	5°C	10°C	20°C	30°C	35°C	40°C		
Próba badana Kontrola					Próba	Próba badana			Mh-hsp90
Stadium	1	+	+		+	+	+		Mh-hsp1
jaja,	2	+	+	+	+	+	+		Mh-hsp4
stadium J2	8	+	+		+	+	+		Mh-hsp6
	24	+	+		+	+	+	111	Mn-nsp60 Mh-dnj19
Stadium	336	+	+		+	+	+		Mh-hsp43
	1008	+	+	+	+	+	+		Mh-hsp12.2
J2	1344	+	+		+	+	+		

Tabela 2. Temperatura i czas inkubacji stadium jaja i osobników stadium J2.

## 3.2.2. Izolacja całkowitego RNA

Całkowity RNA izolowano z dwóch stadiów rozwojowych: jaj ze złoża jajowego i z 200 osobników stadium J2 utrwalonych w 800 µl fenozolu i przechowywanych w temperaturze -20°C. RNA izolowano zmodyfikowaną metodą fenolo-chloroformową (Chomczynski i Sacchi, 1987) z wykorzystaniem zestawu Total RNA Mini firmy A&A Biotechnology. Izolację całkowitego RNA prowadzono w pomieszczeniu wolnym od produktów PCR, z użyciem jednorazowych, wolnych od DNaz i RNaz, końcówek do pipet z filtrem i probówek. Wszystkie etapy doświadczenia, poza tymi wymagającymi ustalonej wg protokołu temperatury, wykonywano w temperaturze ok. 4°C, umieszczając probówki w statywach chłodzących.

Wszystkie etapy izolacji całkowitego RNA były identyczne dla obydwu stadiów rozwojowych. Złoża jajowe i osobniki stadium J2 homogenizowano w homogenizatorze (TissueLyser LT Qiagen) przez 5 minut (45 obrotów/s). Homogenat inkubowano przez 5 minut w temperaturze 50°C w inkubatorze (HLC Biotech). Do lizatów dodawano po 200 µl chloroformu i mieszano delikatnie próbki przez kilkakrotne odwracanie probówek. Następnie próbki pozostawiono na 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano przez 10 minut przy 12 000 RPM (revolutions per minute, RPM). Uzyskaną w trakcie wirowania fazę wodna (ok. 450 µl supernatantu) przenoszono do nowych 1,5 ml probówek eppendorfa, a następnie dodawano po 250 µl alkoholu izopropylowego. Całość dokładnie mieszano i nanoszono na minikolumny do izolacji RNA. Minikolumny wirowano przez 1 minutę przy 12 000 RPM, po czym przenoszono je do nowych probówek. Do minikolumn dodawano po 700 µl roztworu płuczącego A1 i wirowano przez 1 minutę przy 12 000 RPM. Minikolumny wyjmowano z probówek, przesącz wylewano i ponownie umieszczano w tych samych probówkach. Następnie powtórnie płukano mini kolumny, nanosząc 700 µl roztworu płuczącego A1. Trzeci raz minikolumny płukano nanosząc po 200 µl roztworu A1. Minikolumny przenoszono do nowych jałowych, wolnych od RNAz 1,5 ml probówek i eluowano RNA nanosząc 100 µl wody jałowej. Minikolumny pozostawiano na 3 minuty w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 minutę przy 12 000 RPM. Oczyszczone RNA znajdujące się na dnie probówki przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

Stężenie i jakość otrzymanego RNA mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000 (Spectrophotometer vs. 3.7, Thermo Scientific). Miarą stopnia czystości kwasów nukleinowych jest oznaczony stosunek absorbancji 260/230 oraz 260/280. Za progowe wartości czystości RNA, przyjęto stosunki absorbancji wynoszące ok. 2,0 (Jin i in., 2015). Integralność wydzielonego RNA (ocenę stopnia degradacji RNA) oceniano za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, wybarwionym odczynnikiem SimplySafe™ w 1%

33

buforze TBE (wg protokołu Thermo Scientific RiboRuler High Range RNA Ladder 200 to 6000 bases, ready-to-use).

## 3.2.3. Synteza jednoniciowego cDNA

Otrzymane RNA oczyszczano ze śladowych pozostałości DNA oraz syntezowano jednoniciowe komplementarne DNA (*complementary* DNA, cDNA) zgodnie z protokołem załączonym do zestawu iScript<sup>™</sup> gDNA Clear cDNA Synthesis Kit firmy Bio-Rad. Do 14 µl RNA dodawano 0,5 µl roztworu DNazy I (iScript DNase) oraz 1,5 µl roztworu buforowego. Tak przygotowaną próbkę mieszano i odwirowano (*short-spin*). Mieszaninę inkubowano przez 5 minut w 25°C, a następnie inkubowano przez 5 minut w 75°C w celu inaktywacji DNazy I, po czym przenoszono na statyw chłodzący w przypadku bezpośredniej syntezy cDNA, zaś w przypadku dłuższego przechowywania umieszczano próbkę w -80°C (Ryc. 13).

Do syntezy cDNA użyto 16 µl traktowanego DNazą RNA o stężeniu 10 ng/µl oraz 4 µl gotowej mieszaniny reakcyjnej zawierającej: odwrotną transkryptazę iScript (Bio-Rad), inhibitor RNaz, starter oligo(dT), wolne nukleotydy (dNTPs), jony magnezowe (Mg<sup>2+</sup>) oraz substancje stabilizujące polimerazę. Syntezę prowadzono w następujących etapach: reakcja wstępna (priming) – 5 minut w 25°C, odwrotna transkrypcja (synteza cDNA) – 20 minut w 46°C, inaktywacja aktywności odwrotnej transkryptazy – 1 minuta w 95°C. Uzyskany cDNA stosowany był bezpośrednio w reakcji qPCR lub przechowywany w -20°C (Ryc. 13).



Ryc. 13. Schemat trawienia DNazą próbek RNA i syntezy jednoniciowego cDNA (z katalogu 172-5034 firmy Bio-Rad, zmodyfikowany).

## 3.2.4. Gen referencyjny

Poziom transkrypcji badanych genów *hsp* określany był względem genu referencyjnego dehydrogenazy jabłczanowej (*malate dehydrogenase*, *Mdh*) (Tab. 3). Według Wu i in. (2019) gen ten, spośród 11 badanych, ulega ekspresji na najbardziej stałym poziomie w zakresie temperatur od 4°C do 40°C. Doświadczalnie wykazana stabilność ekspresji genu

*Mdh* na działanie rożnych temperatur na organizm *M. hapla* wskazuje, że ten spełnia wymagania genu referencyjnego.

Tabela 3. Sekwencje starterów: S – sensowny, A – antysensowny, do amplifikacji genu referencyjnego *Mdh* wykorzystane do badań ekspresji genów szoku termicznego (wg Wu i in., 2019).

Gen	Nr sekwencji GenBank	Sekwencja startera (5'-3')	Długość produktu (pz)	Temperatura [°C] przyłączania starterów	Temperatura [°C] topnienia starterów
<i>Mdh</i> CA997091.1	S:GAAAGCCAGGGATGACAC	100	58,8	60,8	
	CA997091.1	A:AGAAAAGCATTGGGACAG	100	55,9	58,1

#### 3.2.5. Projektowanie starterów do genów hsp

Użyte w reakcji qPCR startery do badanych genów *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*1, *Mh-hsp*4, *Mh-hsp*6, *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19, *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2 zostały zaprojektowane z wykorzystaniem programu PRIMER3 vs.0.4.0 (Untergasser i in., 2012). Do projektowania stosowano następujące parametry:

- optymalna długość starterów od 18 do 24 par zasad (pz),

- temperatura topnienia starterów od 59 do 68°C (Thornton i Basu, 2011),

- lokalizacja starterów na różnych eksonach (Ciesielska i Sikorski, 2008),

- długość produktu nie większa niż 300 pz (Ginzinger, 2002).

#### 3.2.6. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (qPCR)

Profil transkrypcji genów *hsp* został określony przy zastosowaniu techniki ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). Badania ekspresji genów *hsp* prowadzono przy użyciu zestawu odczynników SsoAdvanced universal SYBR Green supermix (Bio-Rad) dedykowanego dla termocyklera 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Zestaw zawiera barwnik fluorescencyjny SYBR Green I, polimerazę fuzyjną Sso7d termostabilną (typu *hot start*), mieszaninę trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP), MgCl<sub>2</sub>, wzmacniacze, stabilizatory i pasywny barwnik referencyjny ROX.

Odczynniki przed użyciem były dokładnie wymieszane, odwirowane, aby zebrać roztwory na dnie probówek, a następnie przechowywane w pojemniku chłodzącym chroniącym przed światłem. Reakcję prowadzono w 20 µl. Najpierw przygotowywano premiks składający się z:

- 10 µl polimerazy SsoAdvanced universal SYBR Green supermix,

- 1,5 µl (250 nM) startera sensownego,
- 1,5 µl (250 nM) startera antysensownego,
- 5,5 μl H<sub>2</sub>O wolnej od nukleaz na każdą próbkę.

Premiks dokładnie mieszano i 18,5 µl mieszaniny dodawano do studzienek płytki PCR. Następnie do każdej studzienki, zawierającej prefiks, dodawano 1,5 µl cDNA. Uszczelniano studzienki optycznie przezroczystą folią, a następnie wirowano przez 30 sekund (*short-spin*), aby usunąć pęcherzyki powietrza z mieszaniny. Tak przygotowaną płytkę umieszczano w termocyklerze 7500 Real Time PCR.

### Profil termiczny reakcji:

- wstępna denaturacja przez 30 s w 95°C,

 - 40 cykli obejmujących: denaturację w 95°C przez 15 s, przyłączanie starterów do matrycy oraz wydłużanie w 59°C przez 60 s.

Reakcję qPCR wykonano trzykrotnie jako powtórzenia biologiczne dla każdego wariantu eksperymentu temperatura/czas/stadium rozwojowe (Tab. 2).

Specyficzność przebiegu reakcji określano na podstawie temperatury topnienia amplikonu (*melting temperature*, Tm). Bezpośrednio po każdej amplifikacji matryc cDNA, analiza Tm wykonywana była automatycznie przez oprogramowanie termocyklera 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA). Oprogramowanie generowało także w czasie rzeczywistym wykres fluorescencji oraz wykres ujemnej pierwszej pochodnej – oba w zależności od aktualnej temperatury. Uzyskany profil topnienia porównywano z profilem Tm uzyskanym podczas reakcji optymalizacji. Analiza Tm służyła, jako kontrola jakościowa amplifikowanych produktów, dlatego też nie przeprowadzano elektroforezy w żelu agarozowym dla produktów powstałych z matryc cDNA.

## 3.2.7. Obliczanie zmiany ekspresji badanych genów hsp

Zmiany poziomu ekspresji genów *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*1, *Mh-hsp*4, *Mh-hsp*6, *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19, *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2 obliczano za pomocą metody porównawczej CT (*comparative CT method*), nazywanej także metodą podwójnej delty -  $\Delta\Delta$ CT (Livak i Schmittgen, 2001). Stosując metodę porównawczą liczono zmiany poziomu ekspresji genów *hsp* w próbach badanych w porównaniu do kalibratora (próby kontrolnej). Jako próbę kontrolną stosowano RNA wydzielony ze stadium jaja i osobników stadium J2 *M. hapla*, hodowanych w laboratorium w optymalnych dla tego gatunku warunkach w temperaturze 20°C. Próby badane to RNA pozyskane ze stadium jaja i osobników J2 inkubowanych w określonych warunkach temperatury i czasu z wyjątkiem temperatury 20°C (Tab. 2).

Pierwszym etapem było wyznaczenie cykli progowych (Ct) genów badanych (genów *hsp*) oraz genu referencyjnego (gen *Mdh*). Następnie, dla wszystkich prób, obliczone zostały

różnice między wartościami Ct genów badanych i genu referencyjnego ( $\Delta$ Ct) (Livak i Schmittgen, 2001; Tyburski i in., 2008). Obliczenia prowadzono według wzorów:

```
\DeltaCt (próba badana) = Ct genu badanego - Ct genu referencyjnego
\DeltaCt (kalibrator) = Ct genu badanego - Ct genu referencyjnego
\Delta\DeltaCt = \DeltaCt (próba badana) - \DeltaCt (kalibrator)
R = 2<sup>-\Delta\DeltaCt</sup>
```

gdzie Ct – cykl progowy, a R – zmiana ekspresji genu. Jeżeli uzyskano wartość parametru R = 1 oznacza to, że poziom ekspresji genu w próbie kalibracyjnej i nieznanej są jednakowe. Liczba < 1 wskazuje na wyższy poziom ekspresji w próbie kalibracyjnej, liczba > 1 wskazuje na wyższą ekspresję genu w próbie badanej w porównaniu do próby kalibracyjnej (Ginzinger, 2002; Liu i Saint, 2002; Pfaffl, 2003; Bubner i Baldwin, 2004; Tyburski i in., 2008). Wartości uzyskane dla trzech niezależnych prób badanych porównano z wartościami wyliczonymi dla prób kontrolnych. Zastosowano w tym celu test *t*-Studenta przy użyciu programu "Do my qPCR calculation" (Tournayre i in., 2019).

# 3.3. Wpływ temperatury na stadium jaja oraz na parametry stanu fizjologicznego wylęgniętych z tych jaj stadiów J2

## Inkubacja

Doświadczenie przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Rocha i in. (2015). W każdej z szalek Petriego (Ø 3,5 cm, wys. 1 cm) w wodzie destylowanej (4 ml) zanurzono 10 jaj nicienia. Szalki z jajami inkubowano w temperaturach stresowych i niestresowych przez 1, 2, 8 i 24 godziny. Następnie wszystkie szalki z jajami inkubowano w 20°C aż do wylęgnięcia się osobników J2, ale nie dłużej niż 25 dni, ponieważ według Inserra i in. (1983) rozwój jaja do stadium J2 w temperaturze 20°C trwa do 25 dni. Świeżo wylęgnięte osobniki stadium J2 (do 24 godzin od wylęgu) liczono, a następnie zamknięto w stałych preparatach mikroskopowych. Kontrolą w tym doświadczeniu było stadium jaja inkubowane w temperaturze 20°C aż do wylęgnięcia się osobników J2 (Tab. 4). Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Stadium	Czas inkubacji	5	Temperatura						
	(godzina)	Stres zimna	Tem	peratury niestre	sowe	Stres g	gorąca	powtórzeń	
10 :-:	1								
10 jaj	2	590	1000	20°C	2000	2500	1000	ш	
	8	54	10.0	kontrola	30°C	35°C	40°C	111	
	24								

Tabela 4. Temperatura i czas inkubacji stadium jaja.

## Wykonanie stałych preparatów mikroskopowych

Przy użyciu stempla na mikroskopowych szkiełkach podstawowych (wymiary 2,5 x 7,5 cm) wykonano pierścienie parafinowe (Ø 1,5) stosując parafinę techniczną. Wewnątrz pierścienia parafinowego, w kropli wody destylowanej, umieszczono wylęgnięte osobniki stadium J2 *M. hapla*. Następnie na pierścieniu parafinowym ułożono mikroskopowe szkiełko nakrywkowe (wymiary 22 mm x 22 mm) i całość podgrzano na płycie (HTS-1003) rozgrzanej do temperatury 65°C w celu rozpuszczenia parafiny. Rozpuszczona parafina scala szkiełko nakrywkowe ze szkiełkiem podstawowym i zamyka wewnątrz preparatu nicienie, zabezpieczając je przed wyschnięciem i umożliwiając wykonanie pomiarów z wykorzystaniem mikroskopu badawczego.

#### Pomiary – długość, szerokość i masa ciała

Pomiary wykonano przy pomocy mikroskopu badawczego Leica DM 5000 B z zainstalowanym oprogramowaniem Leica Application Suite Version 3.7. U osobników stadium J2 zamkniętych w stałych preparatach (n=10, dla każdego doświadczenia) przeprowadzono pomiary parametrów stanu fizjologicznego (kondycji) tzn. pomiary długości i szerokości ciała. W celu uzyskania porównywalnych wyników szerokość ciała zmierzona została w najszerszym miejscu w połowie długości ciała nicienia. W oparciu o uzyskane dane wyliczono masę ciała dla każdego osobnika stadium J2 przy zastosowaniu zmodyfikowanego wzoru Andrássy'ego (1956):

$$BM = \sum_{i=1}^{n} \left( (L_i \times W_i^2) / (1.6 \times 10^6) \right) / n$$

gdzie: **BM** – masa ciała (µg), W – szerokość ciała w najszerszym miejscu (µm), L – długość ciała (µm), **1.6** – stała, **10**<sup>6</sup> – współczynnik do przekształcenia µm<sup>3</sup> na µg, n – liczba nicieni, a i – indeks sumowania (Rocha i in., 2015).

## **3.4. Wpływ temperatury na parametry stanu fizjologicznego osobników stadium J2** *Inkubacja*

Doświadczenie przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Rocha i in. (2015). W każdej z szalek Petriego (Ø 3,5 cm, wys. 1 cm) w wodzie destylowanej (4 ml) zanurzono 10 świeżo wylęgniętych osobników stadium J2 (do 24 godzin od wylęgu). Szalki inkubowano w temperaturach stresowych i niestresowych przez okres od 1 do 1344 godzin (Tab. 5). Kontrolą w tym doświadczeniu były osobniki stadium J2 inkubowane w temperaturze 20°C. Po upływie zaplanowanego czasu inkubacji osobniki J2 poddano barwieniu czerwienią oleistą w celu oznaczenia ilości substancji zapasowych. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach.

Stadium	Czas inkubacji	Temperatura						Liczba
Staulum	(godzina)	Stres zimna	Temperatury niestresowe Stres gorąca					powtórzeń
	1							
	2							
10	8							
osobników	24	5°C	10°C	20°C	30°C	35°C	40°C	ш
stadium	336	50	10 0	kontrola	000	0.5 C	10 0	
J2	1008							
	1344							

Tabela 5. Temperatura i czas inkubacji osobników stadium J2.

#### Barwienie czerwienią oleistą

Barwienie lipidów w ciele osobników stadium J2, zgromadzonych w kroplach lipidowych, wykonano stosując zmodyfikowaną metodę Croll (1972). Do barwienia lipidów użyto nasyconego roztworu czerwieni oleistej (oil red O, wzór chemiczny C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O), czyli barwnika rozpuszczalnego w lipidach, odpowiedniego do barwienia histochemicznego tłuszczów obojętnych i estrów cholesterolu (Pearse, 1968; Kruth, 1984; Fowler i Greenspan, 1985). Roztwór barwiący wykonano przez dodanie 3 g czerwieni oleistej w postaci proszku do 100 ml 96% alkoholu etylowego i mieszano aż do uzyskania jednolitej zawiesiny. Uzyskany roztwór przesączono przez filtr strzykawkowy (membrana 0,22 µm), uzyskując gotowy do użycia roztwór barwiący (Croll, 1972). W celu wybarwienia nicieni uprzednio poddanych ekspozycji na różne warunki temperatury i czasu (patrz Tab. 5) osobniki stadium J2 umieszczono w bloku barwiącym (barwiaczu) w kropli wody, do której dodano 150 µl roztworu barwiącego. Blok barwiący przykryto szklaną przykrywką i umieszczano w cieplarce i inkubowano w 60°C przez 20 min. Po tym czasie nicienie wyjęto z cieplarki i płukano wodą destylowaną na sicie o średnicy oczek 40 µm do czasu wypłukania barwnika z zewnętrznych części ciała nicieni. Nicienie zamknieto W stałych preparatach mikroskopowych wykonanych zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale 3.3.

## Pomiary – powierzchnia wybarwionych lipidów (%)

Obserwacje wybarwionych na czerwono lipidów u osobników stadium J2 *M. hapla* przeprowadzono za pomocą mikroskopu badawczego Leica DM 5000 B z kontrastem fazowym Nomarskiego, przy użyciu oprogramowania Leica Application Suite Version 3.7. W

zachowaniu spójności uzyskanych pomiarów w mikroskopie stosowano stałe ustawienia natężenia światła, kondensora, filtrów i przesłony. Analizę obrazu przeprowadzono za pomocą programu LAS Archive Basic w celu określenia powierzchni ( $\mu$ m<sup>2</sup>) ciała nicieni oraz powierzchni wybarwionych kropli lipidowych wyrażonych w  $\mu$ m<sup>2</sup>. Obliczono procentowy stosunek powierzchni wybarwionych kropli lipidowych do całkowitej powierzchni ciała (100%) dla każdego badanego osobnika stadium J2 (powierzchnia wybarwionych lipidów (%)). Dodatkowo, do każdego wariantu eksperymentu temperatury i czasu, wykonano fotografie poglądowe przedstawiające wybarwione lipidy w ciele osobników stadium J2.

## Pomiary – długość, szerokość, masa ciała

Podczas wykonywania pomiarów wybarwionych lipidów wykonano także pomiary długości i szerokości ciała osobników stadium J2 oraz obliczano masę ciała tych nicieni. Obliczenia wykonano metodykę opisaną w rozdziale 3.3.

## Pomiary – masa lipidów

Po obliczeniu masy ciała i powierzchni wybarwionych lipidów (%), zajmującej ciało osobników J2, obliczono masę lipidów tych samych okazów. Masę lipidów dla każdego osobnika J2 wyliczono stosując zmodyfikowany wzór Andrássy'ego (1956):

BML = 
$$\sum_{i=1}^{n} ((L_i \times W_i^2)/(1.6 \times 10^6)) \times NL_i/n$$

gdzie: **BML** – masa lipidów (µg), W – szerokość ciała w najszerszym miejscu (µm), L – długość ciała (µm), **1,6** – stała, **10**<sup>6</sup> – współczynnik do przekształcenia µm<sup>3</sup> na µg, NL – powierzchnia wybarwionych lipidów (%), n – liczba nicieni, a i – indeks sumowania (Rocha i in., 2015).

#### 3.5. Wpływ temperatury na aktywność ruchową osobników stadium J2

#### Inkubacja

Badanie aktywności ruchowej osobników stadium J2 *M. hapla* przeprowadzono według zmodyfikowanej metody opisanej przez Morris i in. (2011). Doświadczenie przeprowadzono w szalkach Petriego (Ø 3,5 cm, wys. 1 cm) z wodą destylowaną (4 ml). W każdej z szalek zanurzono 10 świeżo wylęgniętych osobników stadium J2 (do 24 godzin od

wylęgu). Szalki z nicieniami inkubowano w temperaturach stresowych i niestresowych (Tab.
6). Kontrolą w tym doświadczeniu było stadium J2 inkubowane w temperaturze 20°C.
Doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

	usera o. Temperatara rezus inkubacji osobinkow stadiani 52.									
Stadium	Czas inkubacji		Temperatura					Liczba		
Staulum	(godzina)	Stres zimna	Temperatury niestresowe Stres gorąca				powtórzeń			
10	1							Ш		
osobników	2	590	1090	20°C	30°C	35°C	40°C			
stadium	8	5.0	10-0	kontrola						
J2	24									

Tabela 6. Temperatura i czas inkubacji osobników stadium J2.

#### Pomiary – aktywność ruchowa

Niezwłocznie po zakończeniu inkubacji przeprowadzono obserwację aktywności ruchowej osobników stadium J2 przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (Leica M205 C, 40×) wyposażonego w źródło zimnego światła. Zastosowanie zimnego światła nie wpłynęło na zmianę temperatury obserwowanych nicieni. Za miarę aktywności ruchowej osobników J2 uznano liczbę ruchów głowy odnotowanych w czasie 5 minut (L./5min.). Za ruch głowy przyjęto moment, w którym głowa osobnika J2 ułożona jest pod kątem >90° względem osi ciała w dowolnym kierunku np. odchylenie w lewo od osi ciała uznawane jest za jeden ruch głowy natomiast przesunięcie z pozycji odchylonej w lewą stronę do pozycji zbieżnej z osią ciała uznawane jest za drugi ruch głowy (Ryc. 14).



Ryc. 14. Osobnik stadium J2 *Meloidogyne hapla* – ruch głowy w lewą stronę (wg metodyki Morris i in. 2011, rys. Ł. Flis).

#### 3.6. Analiza danych

Dane były modelowane z użyciem uogólnionych modeli liniowych (*generalized linear models*, GLM) z gaussowskim (normalnym) rozkładem błędu (Biecek, 2013). W ramach wstępnej, eksploracyjnej analizy danych sprawdzano również zasadność stosowania błędów opisanych rozkładem Poissona i ujemnym rozkładem dwumianowym. Wynika z tego, iż we wszystkich przypadkach rozkłady gaussowskie dawały lepsze dopasowania niż sprawdzane rozkłady alternatywne. Wszystkie obliczenia wykonano w środowisku obliczeniowym R (R Core Team, 2022). W zależności od eksperymentu zmiennymi zależnymi były odpowiednio:

- zmiana poziomu ekspresji genów szoku termicznego, badana w stadium jaja oraz u osobników stadium J2. Analizowane były różnice w poziomie ekspresji, w wyniku działania różnych temperatur i czasów inkubacji, następujących genów *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*1, *Mh-hsp*4, *Mh-hsp*6, *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19, *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2;
- parametry stanu fizjologicznego (kondycji), czyli długość, szerokość i masa ciała, mierzone u osobników J2, które wylęgły się z jaj, uprzednio poddanych inkubacji w różnych temperaturach i czasie;
- parametry stanu fizjologicznego (kondycji), czyli długość, szerokość, masa ciała, masa i powierzchnia wybarwionych lipidów mierzone u osobników J2 po inkubacji w różnych temperaturach i czasie;
- aktywność ruchowa osobników J2, wyrażona liczbą ruchów głowy tego nicienia obserwowanych w jednostce czasu po inkubacji w różnych temperaturach i czasie.

Wiodącymi predyktorami we wszystkich modelach była temperatura oraz czas inkubacji. Obie zmienne były traktowane, jako zmienne kategoryczne (*factors*) przybierające wartości temperatur 5°C, 10°C, 20°C (kontrola), 30°C, 35°C i 40°C oraz czasu inkubacji 1, 2, 8 i 24 godzin, a w części eksperymentów także 336, 1008 i 1344 godzin. Poziomem referencyjnym była temperatura 20°C, a dla czasu inkubacji 1 godzina. W części analiz poza temperaturą i czasem inkubacji dodatkowo uwzględniono również długość i szerokość ciała osobnika stadium J2, względnie jego masę, jako potencjalne zmienne zaburzające, których efekt należało kontrolować oceniając wpływ temperatury i czasu inkubacji. Masa osobnika była wyliczana z jego długości i szerokości, dlatego była ona traktowana jako predyktor alternatywny do obu wymiarów liniowych, nie pojawiając się w modelach, w których one występowały. Długość, szerokość i masa ciała osobników J2 były analizowane, jako zmienne ciągłe. Podobnie przy modelowaniu powierzchni wybarwionych lipidów, gdzie jako zmienne objaśniające wykorzystano m.in. długość, szerokość lub masę ciała osobnika stadium J2.

osobnika stadium J2 względnie jego długości i szerokości ciała, gdyż zmienne te posłużyły wcześniej do obliczania masy lipidów.

W każdym przypadku, do opisu różnic wartości zmiennej zależnej generowanych było od 4 do 14 alternatywnych modeli, różniących się zestawem zmiennych objaśniających. Obok modeli, w których predyktory były dopasowywane jako czynniki oddziałujące addytywnie na zmienną zależną, analizowane też były modele, w których zmienne objaśniające oddziaływały w sposób interaktywny. Modele z interakcją predyktorów obejmowały głównie (choć niewyłącznie) interakcje drugiego stopnia, z uwagi na problemy z klarowną interpretacją interakcji wyższego stopnia.

Wybór modelu najlepiej dopasowanego do danych odbywał się z użyciem procedury tzw. selekcji modeli (*model selection*; Burnham i Anderson, 2002) w ramach, której dopasowanie modeli było oceniane w oparciu o kryteria z zakresu teorii informacji. Wiodącym kryterium oceny modelu była wartość tzw. kryterium Akaikego w wersji dostosowanej do niewielkich zbiorów danych (AICc), zaś kryterium uzupełniające stanowiła waga modelu (czyli prawdopodobieństwo, iż dany model jest najlepiej dopasowanym modelem w analizowanym zestawie). Za model najlepiej dopasowany do danych spośród analizowanego zestawu modeli uważany był ten z najniższą wartością AICc (McCarthy, 2015; Murray i in., 2020). W ramach poszczególnych analiz, wykonanych na potrzeby niniejszej pracy, z reguły jeden model był ewidentnie lepiej dopasowany, niż pozostałe analizowane (tj. jego waga była bliska 1), nie zachodziła więc potrzeba uśredniania modeli o podobnym stopniu dopasowania. Zapis "(A+B)^2" w modelach oznacza wszystkie interakcje drugiego stopnia pomiędzy predyktorami A i B.

Oszacowania wielkości efektów poszczególnych zmiennych (predyktorów) w najlepiej dopasowanym modelu były uzyskiwane z użyciem pakietu "effects" (Fox i Weisberg, 2019). Ponadto do obliczeń i wizualizacji wyników wykorzystano również pakiety z biblioteki "tidyverse" (Wickham i in., 2019).

## 4. Wyniki

## 4.1. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp

## 4.1.1. Identyfikacja genów hsp w genomie Meloidogyne hapla

Dostępność zsekwencjonowanych genomów *C. elegans* i *M. hapla* umożliwia poszukiwanie genów poprzez porównywanie ich sekwencji. W tym celu użyto bazy WormBase ParaSite (wersja WBPS16 (WS279)) https://parasite.wormbase.org/index.html, która zawiera sekwencje genomowe, umożliwia przeglądanie genomu, półautomatyczną annotację i porównywanie sekwencji. Na podstawie sekwencji genów białek szoku termicznego *C. elegans* zidentyfikowano ortologi tych genów w genomie *M. hapla* (Tab. 7).

Tabela 7. Geny szoku termicznego zidentyfikowane w genomie Meloidogyne hapla.

Rodzina białek Hsp	Nazwa genu	Gatunek	Numer genu w bazie WormBase Parasite	Lokalizacja genu
	hsp90	C. elegans	WBGene00000915	V: 14684918-14688545
Hsp90	Mh-hsp90	M. hapla	MhA1 Contig1972.frz3.gene3	Contig 1972: 4732-7425
Ham 70	hsp1	C. elegans	WBGene00002005	IV: 17278959-17281330
Hsp70	Mh-hsp1	M. hapla	MhA1_Contig113.frz3.gene45	Contig 113: 79493-86067
Hsp70	hsp4	C. elegans	WBGene00002008	II: 7350112-7352645
	Mh-hsp4	M. hapla	MhA1_Contig30.frz3.fgene1	Contig 30: 4430-7369
11	hsp6	C. elegans	WBGene00002010	V: 4824124-4826760
nsp70	Mh-hsp6	M. hapla	MhA1_Contig349.frz3.gene2	Contig 349: 1610-3014
Han60	hsp60	C. elegans	WBGene00002025	III: 1619742-1625803
пѕроо	Mh-hsp60	M. hapla	MhA1_Contig737.frz3.gene23	Contig 737: 48523-50607
Hap 10	dnj-19	C. elegans	WBGene00001037	V: 5503033-5504857
nsp40	Mh-dnj19	M. hapla	MhA1_Contig579.frz3.gene6	Contig 579: 18539-19790
allana	hsp43	C. elegans	WBGene00002024	X:6233145-6236386
shsps	Mh-hsp43	M. hapla	MhA1_Contig30.frz3.gene18	Contig 30: 50262-54876
allana	hsp12.2	C. elegans	WBGene00002011	III:8138090-8139645
snsps	Mh-hsp12.2	M. hapla	MhA1_Contig609.frz3.gene18	Contig 609: 43098-43583

## 4.1.2. Startery do badania ekspresji genów hsp

W oparciu o sekwencje cDNA genów *hsp M. hapla* zaprojektowano startery zlokalizowane na różnych sekwencjach kodujących (eksonach) analizowanych genów. Sekwencje nukleotydowe zaprojektowanych starterów, temperatury ich przyłączania i długości produktów amplifikacji podano w Tabeli 8.

Gen	Numer sekwencji genu w bazie WormBase ParaSite	Pozycja	Sekwencja startera (5'-3')	Długość produktu (pz)	Temperatura [°C] przyłączania starterów
Ml. Laron	Mh A 1 Comtin 1072 from 2	1391-1412	S: TCTCTGATGATGAGGCTGAAGA	120	60,1
Mn-nsp90	MIAI_Contig1972.frz3.gene3	1553-1572	A: TCACCGTCCTTCTTGTCCTT	150	59,7
Mh han1	MhA1 Contig112 frz2 gono45	1410-1431	S: ACTCATCTTGGTGGTGAAGATT	200	57,4
Mh-hsp1	MIIA1_Contig115.1125.gene45	1671-1694	A: TCAATGCCATCAAAGAGAGAATCA	200	58,5
Mh-hsp4	MhA1_Contig30.frz3.fgene1	1866-1885	S: GAAGGAGAACGCCCAATGAC	158	58,9
		2046-2065	A: CCAGTTCCTTTGTCTTCGGC		59,1
Mh-hsp6	MhA1_Contig349.frz3.gene2	15-34	S: TCGTCCATCTTTCAACCGTT	226	58,1
		310-332	A: AACAGATTGTCTAATTGCTGGAG		57,5
Mh-hsp60	MhA1_Contig737.frz3.gene23	909-929	S: TTCCTGCTCTTGAATTGGCT	218	58,1
		1250-1269	A: AATTGTGACTTCATCCGCCT		58,2
Mh-dnj19	MhA1_Contig579.frz3.gene6	983-1002	S: TGTGAACATTGCAGTGGTGG	185	58,0
		1191-1210	A: TCTCCAGGCTCAATTCCAGG		59,1
Mh-hsp43	MhA1_Contig30.frz3.gene18	4156-4178	S: CGTAGAGAAGAATTCCGTGAAGA	138	58,7
		4407-4425	A: TTCAGAGCGGTGACTTCCA		59,2
Mh-hsp12.2	MhA1_Contig609.frz3.gene18	709-728	S: GCCCCTTCAACACACAGATG	156	59,1
		888-907	A: TACCCTTTCGTGGCTCATGA		58,7

Tabela 8. Sekwencje starterów do amplifikacji genów szoku termicznego. S – starter sensowny, A – starter antysensowny.

## 4.1.3. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp w stadium jaja

## 4.1.3.1. Ekspresja genu Mh-hsp90

W doświadczeniu dotyczącym genu *Mh-hsp*90 wykazano różnice w poziomie jego ekspresji badanej w stadium jaja *M. hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 15). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 9 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*90 badanej w stadium jaja. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*90. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 1Z.

Tabela 9. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*90 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 90 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	-15,3	108,8	0,0	25	1
2	<i>Mh-hsp</i> 90 ~ temperatura	-69,4	154,6	45,7	7	<0,001
3	<i>Mh-hsp</i> 90 ~ temperatura + czas inkubacji	-68,0	159,7	50,8	10	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 90 ~ czas inkubacji	-113,8	238,4	129,6	5	<0,001

Inkubacja w czasie od 1 do 8 godzin w temperaturze 35°C wywołała stres gorąca w stadium jaja *M. hapla* i doprowadziła do statystycznie istotnej zmiany ekspresji genu *Mh-hsp*90 w porównaniu do ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C. Ekspresja w 35°C wzrosła istotnie po 1(4,32  $\pm$  0,21 R) godzinie i osiągnęła maksimum po 2 (4,96  $\pm$  0,21 R) godzinach inkubacji. Dłuższa inkubacja prowadziła do zmniejszenia ekspresji po 8 (3,38  $\pm$  0,21 R) i 24 (1,89  $\pm$  0,21 R) godzinach inkubacji w temperaturze 35°C. Wzrost temperatury inkubacji do 40°C nie zwiększył ekspresji tego genu. Przy dłuższej inkubacji (po 24h) ekspresja rosła proporcjonalnie do wzrostu temperatury i osiągnęła maksimum przy 40°C. Inkubacja w temperaturach 5°C, 10°C i 30°C nie wpływała istotnie na ekspresję genu (Tab. 2Z, Ryc. 15).



Ryc. 15. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*90 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 9, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.1.3.2. Ekspresja genu Mh-hsp1

Badanie genu *Mh-hsp*1 w stadium jaja *M. hapla* wykazało zależność pomiędzy jego ekspresją a temperaturą i czasem inkubacji (Ryc. 16). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 10 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*1 badanej w stadium jaja. Model ten zakładał

łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*1. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 3Z.

Tabela 10. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*1 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 1 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	21,1	36,0	0,0	25	1
2	$Mh$ - $hsp1 \sim$ temperatura	-24,6	65,0	29,1	7	<0,001
3	<i>Mh-hsp</i> 1 ~ temperatura + czas inkubacji	-24,4	72,5	36,5	10	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 1 ~ czas inkubacji	-112,1	235,1	199,2	5	<0,001

Najwyższy statystycznie istotny poziom ekspresji genu *Mh-hsp*1 badany w stadium jaja *M. hapla*, wykazano w temperaturze 35°C po 1 (4,40 ± 0,13 R) godzinie inkubacji w porównaniu do ekspresji tego genu badanej w temperaturze kontrolnej 20°C. W wyniku działania stresu gorąca wywołanego przez temperaturę 35°C również w pozostałych czasach inkubacji odnotowano wysoki poziom ekspresji tego genu. Zauważalna była zależność, według której wraz z wydłużaniem czasu inkubacji w temperaturze 35°C poziom ekspresji genu *Mh-hsp*1 spadał. W temperaturze 30°C po 24 godzinach inkubacji odnotowano statystycznie istotny wzrost ekspresji genu *Mh-hsp*1. Najniższy, prawie czterokrotnie niższy w porównaniu do najwyższej wartości, statystycznie istotny poziom ekspresji genu *Mh-hsp*1 obserwowano w temperaturze 5°C po 1 (0,47 ± 0,13 R) godzinie inkubacji. W pozostałych wariantach doświadczenia temperatury i czasu inkubacji ekspresja genu *Mh-hsp*1 była zbliżona do poziomu jego ekspresji w temperaturze kontrolnej 20°C (Tab. 4Z, Ryc. 16).



Ryc. 16. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*1 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 10, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.1.3.3. Ekspresja genu Mh-hsp4

W doświadczeniu dotyczącym genu *Mh-hsp*4 badanego w stadium jaja *M. hapla* wykazano różnice w poziomie jego ekspresji w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 17). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 11 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*4 badanej w stadium jaja. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*4. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 5Z.

Tabela 11. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*4 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 4 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	34,7	8,8	0,0	25	0,9965
2	<i>Mh-hsp</i> 4 ~ temperatura + czas inkubacji	1,7	20,1	11,3	10	0,0034
3	<i>Mh-hsp</i> 4 ~ temperatura	-5,5	26,8	18,0	7	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 4 ~ czas inkubacji	-25,9	62,6	53,9	5	<0,001

Wykonane doświadczenie wykazało, że temperatura 35°C po 2 (2,02  $\pm$  0,11 R) godzinach inkubacji wywołała stres gorąca w stadium jaja *M. hapla*, który spowodował najwyższy istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genu *Mh-hsp*4. Istotny statystycznie wzrost ekspresji wykazano także w temperaturze 35°C po 24 godzinach inkubacji, a także w 40°C po 1 i 24 godzinach inkubacji. Ponad dwukrotnie niższy w porównaniu do najwyższej wartości, najniższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*4 odnotowano w temperaturze 10°C po 24 (0,63  $\pm$  0,11 R) godzinach inkubacji. Wartości ekspresji genu *Mh-hsp*4 w pozostałych wariantach (temperatura/czas inkubacji) były zbliżone do poziomu jego ekspresji w temperaturze kontrolnej 20°C (Tab. 6Z, Ryc. 17).



Ryc. 17. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*4 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 11, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.1.3.4. Ekspresja genu Mh-hsp6

W tym doświadczeniu wykazano zależność pomiędzy temperaturą i czasem inkubacji a ekspresją genu *Mh-hsp*6 badaną w stadium jaja *M. hapla* (Ryc. 18). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 12 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*6 badanej w stadium jaja. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*6. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 7Z.

Tabela 12. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*6 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 6 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	69.1	-60.0	0.0	25	1
2	<i>Mh-hsp</i> 6 ~ temperatura + czas inkubacji	-26.3	76.2	136.2	10	< 0.001
3	<i>Mh-hsp</i> 6 ~ temperatura	-40.0	95.7	155.7	7	< 0.001
4	<i>Mh-hsp</i> 6 ~ czas inkubacji	-64.4	139.7	199.7	5	< 0.001

W wyniku zaistniałego stresu gorąca w przeprowadzonym doświadczeniu najwyższy istotny statystycznie poziom ekspresji genu *Mh-hsp*6 badany w stadium jaja *M. hapla* wykazano w temperaturze 35°C po 1 (3,29 ± 0,07 R) godzinie inkubacji. Statystycznie istotny wzrost ekspresji w porównaniu do ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C wykazano także w temperaturze 35°C po 2 i 8 godzinach inkubacji, a także w 40°C po 1, 2 i 24 godzinach inkubacji. Najniższy istotny statystycznie poziom ekspresji genu *Mh-hsp*6 wykazano w temperaturze 10°C po 24 (0,11 ± 0,07 R) godzinach inkubacji. Również niższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*6 w porównaniu do ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej występował w 10°C w pozostałych czasach inkubacji oraz w 30°C i 35°C po 24 godzinach inkubacji. Dla ekspresji genu *Mh-hsp*6 w temperaturze 10°C widoczna była zależność. Zgodnie z tą zależnością ekspresja tego genu w temperaturze 10°C spadała wraz z wydłużaniem czasu inkubacji. W pozostałych wariantach eksperymentu (temperaturze sontrolnej 20°C (Tab. 8Z, Ryc. 18).



Ryc. 18. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp6* w stadium jaja *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 12, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.1.3.5. Ekspresja genu Mh-hsp60

Badanie genu *Mh-hsp*60 w stadium jaja *M. hapla* wykazało różnice w poziomie jego ekspresji w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 19). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 13 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*60 badanej w stadium jaja. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*60. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 9Z.

Tabela 13. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*60 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 60 ~ temperatura + czas inkubacji	33.7	10.9	0.0	25	0 9935
1	+ temperatura:czas inkubacji	55,7	10,9	0,0	23	0,7755
2	<i>Mh-hsp</i> 60 ~ temperatura + czas inkubacji	0,8	21,9	11,0	10	0,0040
3	<i>Mh-hsp</i> 60 ~ temperatura	-3,6	22,9	12,0	7	0,0025
4	<i>Mh-hsp</i> 60 ~ czas inkubacji	-11,0	32,9	22,0	5	<0,001

Najwyższy istotny statystycznie poziom ekspresji genu *Mh-hsp*60 badany w stadium jaja *M. hapla* wykazano na działanie stresu zimna wywołanego temperaturą 5°C po 8 (1,86 ± 0,11 R) godzinach inkubacji. Zauważalny istotny statystycznie wzrost ekspresji w porównaniu do ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C wykazano również w temperaturze 40°C po 24 godzinach inkubacji stadium jaja. Najniższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*60 odnotowano w temperaturze 10°C po 2 (0,80 ± 0,11 R) godzinach inkubacji. W pozostałych wariantach (temperatura/czas inkubacji) doświadczenia ekspresja genu *Mh-hsp*60 była zbliżona do poziomu jego ekspresji w temperaturze kontrolnej 20°C (Tab. 10Z, Ryc. 19).



Ryc. 19. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*60 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 13, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.1.3.6. Ekspresja genu Mh-dnj19

Doświadczenie dotyczące genu *Mh-dnj*19 wykazało różnice w poziomie jego ekspresji badanej w stadium jaja *M. hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 20). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 14 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-dnj*19 badanej w stadium jaja. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-dnj*19. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 11Z.

Tabela 14. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-dnj*19 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICe	df	waga
1	<i>Mh-dnj</i> 19 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	65,9	-53,5	0,0	25	0,944
2	<i>Mh-dnj</i> 19 ~ temperatura + czas inkubacji	35,7	-47,9	5,6	10	0,056
3	<i>Mh-dnj</i> 19 ~ temperatura	12,4	-9,1	44,4	7	<0,001
4	Mh-dnj19 ~ czas inkubacji	-4,7	20,3	73,8	5	<0,001

Stres zimna wywołany temperaturą 5°C po 8 (1,84 ± 0,07 R) godzinach inkubacji w stadium jaja *M. hapla* spowodował najwyższy istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *Mh-dnj*19 w tym doświadczeniu. Niewielki już wzrost, bądź zbliżony poziom ekspresji w porównaniu do ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C obserwowano w temperaturze 5°C po 1, 2 i 24 godzinach. Istotny statystycznie wzrost ekspresji wykazano także w 30°C po 8 godzinach; w 35°C po 2, 8 i 24 godzinach; oraz w 40°C po 2 i 8 godzinach inkubacji. Najniższy istotny statystycznie poziom ekspresji genu *Mh-dnj*19 wykazano w temperaturze 10°C po 1 (0,44 ± 0,07 R) godzinie inkubacji. Zauważalna była zależność poziomu ekspresji genu *Mh-dnj*19 od temperatury i czasu inkubacji. Ekspresja tego genu badana w temperaturach 10°C, 30°C, 35°C i 40°C rosła wraz z wydłużaniem czasu inkubacji od 1 do 8 godzin, następnie po 24 godzinach inkubacji ekspresja tego genu w każdej z wymienionych temperatur spadała (Tab. 12Z, Ryc. 20).



Ryc. 20. Zależność ekspresji genu *Mh-dnj*19 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 14, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.1.3.7. Ekspresja genu Mh-hsp43

Przeprowadzony eksperyment wykazał zależność pomiędzy ekspresją genu *Mh-hsp*43 a temperaturą i czasem inkubacji badanej w stadium jaja *M. hapla* (Ryc. 21). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 15 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*43 badanej w stadium jaja. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*43. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 13Z.

Tabela 15. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*43 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 43 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	11,7	54,9	0,0	25	1
2	<i>Mh-hsp</i> 43 ~ temperatura + czas inkubacji	-49,3	122,1	67,2	10	<0,001
3	<i>Mh-hsp</i> 43 ~ temperatura	-53,3	122,3	67,4	7	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 43 ~ czas inkubacji	-75,5	162,0	107,1	5	<0,001

W wykonanym doświadczeniu najwyższy istotny statystycznie poziom ekspresji genu *Mh-hsp*43 badany w stadium jaja *M. hapla* wykazano w temperaturze 35°C, która wywołała w badanym organizmie stres gorąca po 1 (3,20 ± 0,15 R) godzinie inkubacji. Wykazano zależność, zgodnie z którą ekspresja tego genu spadała w temperaturze 35°C wraz z wydłużaniem czasu inkubacji. Kolejną zależność wykazano w temperaturze 40°C. Wzrost ekspresji genu *Mh-hsp*43 obserwowano w temperaturze 40°C wraz z wydłużaniem czasu inkubacji. Kolejną zależności ekspresji po 24 (2,59 ± 0,15 R) godzinach inkubacji. Również w temperaturze 30°C wykazano zależność – ekspresja genu *Mh-hsp*43 spadała wraz z wydłużaniem czasu inkubacji od 1 do 8 godzin. Prawie trzykrotnie niższy w porównaniu do najwyższego odczytu, istotny statystycznie, poziom ekspresji genu *Mh-hsp*43 odnotowano w temperaturze 10°C po 8 (0,30 ± 0,15 R) godzinach inkubacji. Niski poziom ekspresji genu *Mh-hsp*43 występował także w temperaturze 5°C po 2 (0,36 ± 0,15 R) godzinach inkubacji. W pozostałych wariantach (temperatura/czas inkubacji) eksperymentu ekspresja genu *Mh-hsp*43 była zbliżona do jego ekspresji w temperaturze kontrolnej (Tab. 14Z, Ryc. 21).



Ryc. 21. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*43 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 15, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.1.3.8. Ekspresja genu Mh-hsp12.2

W tym doświadczeniu wykazano różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 badanej w stadium jaja *M. hapla* w zależności od temperatur i czasu inkubacji (Ryc. 22). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 16 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 badanej w stadium jaja. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*12.2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 15Z.

Tabela 16. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 12.2 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	52,2	-26,0	0,0	25	1
2	<i>Mh-hsp</i> 12.2 ~ temperatura + czas inkubacji	0,9	21,9	47,9	10	<0,001
3	Mh- $hsp$ 12.2 ~ temperatura	-11,1	37,9	63,9	7	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 12.2 ~ czas inkubacji	-38,6	88,1	114,1	5	<0,001

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że najwyższy istotny statystycznie poziom ekspresji genu *Mh-hsp*12.2, badany w stadium jaja *M. hapla*, zaobserwowano w temperaturze 35°C, po 1 (1,67 ± 0,08 R) godzinie inkubacji. Ekspresja tego genu w temperaturze 35°C spadała wraz z wydłużaniem czasu inkubacji. Również dla temperatury 30°C zachodzi analogiczna zależność jak w przypadku temperatury 35°C. Statystycznie istotny wzrost poziomu ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 odnotowano w temperaturze 5°C po 1 i 8 godzinach inkubacji w wyniku działania stresu zimna. Najniższy statystycznie istotny poziom ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 odnotowano w temperaturze 40°C po 24 (0,02 ± 0,08 R), następnie po 8 (0,26 ± 0,08 R) i po 2 (0,27 ± 0,08 R) godzinach inkubacji. Wykazano zależność, zgodnie z którą w temperaturze 40°C, wraz z wydłużaniem czasu inkubacji, spadała ekspresja genu *Mh-hsp*12.2. Niski poziom ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 występował także w temperaturze 5°C po 2 godzinach inkubacji oraz w 10°C po 1, 8 i 24 godzinach inkubacji. W pozostałych wariantach (temperatura/czas inkubacji) tego badania ekspresja genu *Mh-hsp*12.2 była zbliżona do poziomu ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C (Tab. 16Z, Ryc. 22).



Ryc. 22. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 16, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.1.4. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp u osobników w stadium J2

#### 4.1.4.1. Ekspresja genu Mh-hsp90

Badanie genu *Mh-hsp*90 w stadium J2 *M. hapla* wykazało różnice w poziomie jego ekspresji w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 23). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 17 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*90 badanej u osobników stadium J2. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*90. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 17Z.

Tabela 17. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*90 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICe	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 90 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	-209,5	533,1	0,0	37	1
2	<i>Mh-hsp</i> 90 ~ temperatura + czas inkubacji	-300,8	631,4	98,3	13	<0,001
3	<i>Mh-hsp</i> 90 ~ temperatura	-317,7	650,6	117,5	7	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 90 ~ czas inkubacji	-373,7	764,8	231,7	8	<0,001

W przeprowadzonym doświadczeniu ekspresja genu Mh-hsp90 osiągneła najwyższe wartości podczas inkubacji osobników stadium J2 M. hapla w czasie od 1 do 24 godzin. Najwyższy istotny statystycznie poziom ekspresji genu Mh-hsp90 badany u osobników w stadium J2 M. hapla występował w wyniku wywołanego stresu gorąca przez temperature  $35^{\circ}$ C po 2 ( $35,33 \pm 1,19$  R) godzinach inkubacji. Również bardzo wysoki poziom ekspresji tego genu występował w tej samej temperaturze po 1 ( $26,05 \pm 1,19$  R), 8 ( $28,13 \pm 1,19$  R) i 24 (18,43 ± 1,19 R) godzinach inkubacji. Widoczna była zależność, zgodnie z którą ekspresja genu Mh-hsp90 w temperaturze 35°C osiągnęła swoją maksymalną wartość po 2 godzinach inkubacji a po kolejnych 8, 24 i 336 godzinach inkubacji spadała. Niższy od powyżej wymienionych wartości poziom ekspresji odnotowano w temperaturach 40°C po 1 (6,10  $\pm$ 1,19 R), 2 (15,58  $\pm$  1,19 R) i 24 (8,02  $\pm$  1,19 R) godzinach inkubacji; także w temperaturze  $30^{\circ}$ C po 1 (6,72 ± 1,19 R), 2 (10,28 ± 1,19 R) i 24 (7,30 ± 1,19 R) godzinach inkubacji; oraz w temperaturze 10°C po 8 ( $6,09 \pm 1,19$  R) godzinach inkubacji. Najniższy poziom ekspresji genu Mh-hsp90 wykazano w temperaturze kontrolnej 20°C. Wzrost lub bliska wartość ekspresji w porównaniu do ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C obserwowano w pozostałych wariantach czasu inkubacji i temperatury dla tego eksperymentu (Tab. 18Z, Ryc. 23).



Ryc. 23. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*90 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 17, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.1.4.2. Ekspresja genu *Mh-hsp*1

Wykonane doświadczenie wykazało różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*1, badanej w stadium J2 *M. hapla*, w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 24). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 18 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*1 badanej u osobników w stadium J2. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*1. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 19Z.

Tabela 18. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*1 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 1 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	-183,1	480,4	0,0	37	1
2	$Mh$ - $hsp1 \sim$ temperatura	-381,4	778,0	297,6	7	<0,001
3	<i>Mh-hsp</i> 1 ~ temperatura + czas inkubacji	-374,7	779,3	299,0	13	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 1 ~ czas inkubacji	-421,8	861,1	380,7	8	<0,001

W doświadczeniu dotyczącym genu *Mh-hsp*1 najwyższy poziom ekspresji tego genu badany u osobników w stadium J2 *M. hapla* wykazano w temperaturze 40°C po 1 (61,78  $\pm$ 0,93 R) godzinie inkubacji na działanie stresu gorąca. W pozostałych czasach inkubacji w temperaturze 40°C poziom ekspresji genu *Mh-hsp*1 był znacznie niższy, ponieważ już po 2 godzinach inkubacji wynosił  $17,82 \pm 0,93$  R; po 8 godzinach  $7,99 \pm 0,93$  R; a po 24 godzinach  $6,46 \pm 0,93$  R. Dla ekspresji genu *Mh-hsp*1 w temperaturze 40°C zachodzi zależność. Otóż ekspresja badanego genu w temperaturze 40°C po osiągnieciu maksymalnej wartości po 1 godzinie inkubacji systematycznie spadała w kolejnych czasach inkubacji. Ponad trzydziestokrotnie niższy, ale równie wysoki poziom ekspresji tego genu występował w temperaturze 35°C po 1 (26,15  $\pm$  0,93 R), 2 (27,84  $\pm$  0,93 R), 8 (26,52  $\pm$  0,93 R), 24 (17,68  $\pm$  0,93 R) i 336 (18,12  $\pm$  0,93 R) godzinach inkubacji. Także w temperaturze 5°C, która wywołała w badanym organizmie stres zimna, we wszystkich czasach inkubacji obserwowano znaczny wzrost ekspresji genu *Mh-hsp*1 z jego najwyższą wartością po 336 ( $23,88 \pm 0.93$  R) godzinach inkubacji. W temperaturze 30°C również wykazano wzrost poziomu ekspresji genu *Mh-hsp*1, najwyższą jego wartość odnotowując po 2 (9,24  $\pm$  0,93 R) a najniższą po 336 (3,31 ± 0,93 R) godzinach inkubacji. Najniższy poziom ekspresji genu Mh-hsp1 wykazano w

temperaturze 10°C po 1344 (0,75  $\pm$  0,93 R) godzinach inkubacji. Ekspresja genu *Mh-hsp*1 w temperaturze 10°C w pozostałych czasach inkubacji była zbliżona do wartości ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C (Tab. 20Z, Ryc. 24).



Ryc. 24. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*1 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 18, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

### 4.1.4.3. Ekspresja genu Mh-hsp4

Przeprowadzone doświadczenie wykazało zależność pomiędzy temperaturą i czasem inkubacji a ekspresją genu *Mh-hsp*4 badaną w stadium J2 *M. hapla* (Ryc. 25). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 19 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*4 badanej u osobników w stadium J2. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*4. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 21Z.

Tabela 19. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp4* u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 4 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	18.6	77.0	0.0	37	1
2	<i>Mh-hsp</i> 4 ~ temperatura + czas inkubacji	-72.1	174.0	97.0	13	< 0.001
3	<i>Mh-hsp</i> 4 ~ temperatura	-104.4	223.9	146.9	7	< 0.001
4	<i>Mh-hsp</i> 4 ~ czas inkubacji	-125.1	267.6	190.6	8	< 0.001

W wykonanym doświadczeniu dotyczącym genu *Mh-hsp*4 najwyższy istotny statystycznie poziom jego ekspresji, badany u osobników w stadium J2 *M. hapla*, wykazano w temperaturze 35°C po 2 (4,59 ± 0,14 R) godzinach inkubacji w wyniku działania stresu gorąca. W pozostałych czasach inkubacji ekspresja tego genu w temperaturze 35°C była znacznie niższa i utrzymywała się na podobnym poziomie (od 2,57 ± 0,14 R do 2,18 ± 0,14 R). Także istotnie wysoki poziom ekspresji tego genu występował w temperaturze 40°C po 2 (3,55 ± 0,14 R) godzinach inkubacji, po czym w pozostałych czasach inkubacji uległ spadkowi. Istotny wzrost ekspresji genu *Mh-hsp*4 wykazano również w 30°C po 2 (3,23 ± 0,14 R) i 24 (2,42 ± 0,14 R) godzinach inkubacji. Najniższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*4 wykazano w temperaturze 5°C po 2 (0,44 ± 0,14 R) godzinach inkubacji. Ekspresja genu *Mh-hsp*4 w pozostałych wariantach doświadczenia (temperatura/czas inkubacji) była zbliżona do wartości ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C (Tab. 22Z, Ryc. 25).



Ryc. 25. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*4 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 19, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.1.4.4. Ekspresja genu Mh-hsp6

Badanie genu *Mh-hsp*6 w stadium J2 *M. hapla* wykazało różnice w poziomie jego ekspresji w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 26). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 20 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*6 badanej u osobników w stadium J2. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*6. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 23*Z*.

Tabela 20. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp6* u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 6 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	33,5	47,2	0,0	37	1
2	<i>Mh-hsp6</i> ~ temperatura + czas inkubacji	-86,2	202,2	155,0	13	<0,001
3	<i>Mh-hsp6</i> ~ temperatura	-109,7	234,5	187,3	7	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 6 ~ czas inkubacji	-148,7	314,9	267,6	8	<0,001

Ekspresja genu *Mh-hsp*6 osiągnęła najwyższą wartość u osobników w stadium J2 *M. hapla* w wyniku działania stresu gorąca w temperaturze 40°C po 2 (4,92 ± 0,13 R) godzinach inkubacji. W pozostałych czasach inkubacji ekspresja tego genu spadała. Niewiele niższy poziom ekspresji występował po 8 godzinach (4,24 ± 0,13 R), następnie po 1 godzinie (3,25 ± 0,13 R), aż do najniższej wartości po 24 godzinach inkubacji, która była zbliżona do ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C. Równie wysoki poziom ekspresji tego genu występował w temperaturze 35°C po 2 (3,17 ± 0,13 R), 8 (3,42 ± 0,13 R) i 336 (2,00 ± 0,13 R) godzinach inkubacji. Niewielki wzrost ekspresji badanego genu wykazano w 30°C po 2, 8 i 1008 godzinach inkubacji. Po 2 godzinach inkubacji wykazano zależność ekspresji badanego genu od wartości temperatury. Według tej zależności wraz ze wzrostem temperatury rosła ekspresja genu *Mh-hsp*6. Najniższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*6 wykazano w temperaturze 5°C po 8 (0,34 ± 0,13 R) godzinach inkubacji. W pozostałych wariantach doświadczenia (temperatura/czas inkubacji) ekspresja genu *Mh-hsp*6 była zbliżona do jego ekspresji w temperaturze kontrolnej (Tab. 24Z, Ryc. 26).



Ryc. 26. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*6 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 20, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.1.4.5. Ekspresja genu Mh-hsp60

W eksperymencie dotyczącym genu *Mh-hsp*60 wykazano zależność między jego ekspresją badaną w stadium J2 *M. hapla* a temperaturą i czasem inkubacji (Ryc. 27). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 21 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*60 badanej u osobników w stadium J2. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie czasu inkubacji i temperatury na ekspresję genu *Mh-hsp*60. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 25Z.

Tabela 21. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*60 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 60 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	-9,0	132,2	0,0	37	1
2	<i>Mh-hsp</i> 60 ~ temperatura	-107,2	229,6	97,4	7	<0,001
3	<i>Mh-hsp</i> 60 ~ temperatura + czas inkubacji	-101,5	232,9	100,7	13	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 60 ~ czas inkubacji	-149,0	315,5	183,4	8	<0,001

Wykonane doświadczenie wykazało, że najwyższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*60 badany u osobników w stadium J2 *M. hapla* występował w temperaturze 35°C po 1 (4,72 ± 0,19 R) godzinie inkubacji na działanie stresu gorąca. Następnie po 8 (4,07 ± 0,19 R) i 24 (2,78 ± 0,19 R) godzinach inkubacji w tej samej temperaturze również wykazano istotny wzrost ekspresji badanego genu. Najniższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*60 odnotowano w temperaturze 10°C po 2 (0,17 ± 0,19 R), następnie po 8 (0,20 ± 0,19 R), 1 (0,22 ± 0,19 R) i 336 (0,41 ± 0,19 R) godzinach inkubacji. W pozostałych wariantach eksperymentu (temperatura/czas inkubacji) ekspresja genu *Mh-hsp*60 była zbliżona do jego ekspresji w temperaturze kontrolnej (Tab. 26Z, Ryc. 27).



Ryc. 27. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*60 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 21, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.1.4.6. Ekspresja genu Mh-dnj19

Badanie genu *Mh-dnj*19 w stadium J2 *M. hapla* wykazało różnice w poziomie jego ekspresji w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 28). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 22 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-dnj*19 badanej u osobników w stadium J2. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-dnj*19. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 27Z.

Tabela 22. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-dnj*19 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

df	waga
37	1
7	<0,001
13	<0,001
8	<0,001
	df           37           7           13           8

W badaniu dotyczącym genu Mh-dnj19 wszystkie wartości ekspresji dla warunków eksperymentu temperatura/czas były wyższe od poziomu ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C. Najwyższy statystycznie istotny poziom ekspresji genu Mh-dnj19 badany u osobników w stadium J2 *M. hapla* wykazano w temperaturze 35°C po 2  $(5,47 \pm 0,20 \text{ R})$ godzinach inkubacji w wyniku działania stresu gorąca. Ekspresja tego genu w pozostałych czasach inkubacji w temperaturze 35°C była niższa. Kolejna wysoka wartość ekspresji genu *Mh-dnj*19 występowała w temperaturze 40°C po 8 (4,41 ± 0,20 R), 24 (4,15 ± 0,20 R) i 1  $(3,38 \pm 0,20 \text{ R})$  godzinie inkubacji. Również wysoki istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *Mh-dnj*19 odnotowano w temperaturze 30°C po 2 (3,99  $\pm$  0,20 R), następnie po 1008  $(3,51\pm 0,20 \text{ R}), 24 (2,83\pm 0,20 \text{ R}), 336 (2,52\pm 0,20 \text{ R}), 1 (2,21\pm 0,20 \text{ R}) \text{ i } 8 (1,94\pm 0,20 \text{ R})$ godzinach inkubacji. Istotny statystycznie wzrost ekspresji genu Mh-dnj19 wykazano także w temperaturze 10°C po 2 i 24 godzinach inkubacji oraz w temperaturze 5°C po 1 i 2 godzinach inkubacji. Najniższy poziom ekspresji genu *Mh-dnj*19 wykazano w temperaturze kontrolnej 20°C. Ekspresja genu Mh-dnj19 w pozostałych wariantach eksperymentu (temperatury/czas inkubacji) była zbliżona do ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej (Tab. 28Z, Ryc. 28).



Ryc. 28. Zależność ekspresji genu *Mh-dnj*19 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 22, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.
#### 4.1.4.7. Ekspresja genu *Mh-hsp*43

Badając gen *Mh-hsp*43 w stadium J2 *M. hapla* wykazano różnice w poziomie jego ekspresji w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 29). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 23 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*43 badanej u osobników w stadium J2. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*43. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 29Z.

Tabela 23. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*43 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 43 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	62,2	-10,1	0,0	37	1
2	Mh- $hsp$ 43 ~ temperatura	-80,0	175,1	185,2	7	<0,001
3	<i>Mh-hsp</i> 43 ~ temperatura + czas inkubacji	-73,4	176,6	186,8	13	<0,001
4	Mh-hsp43 ~ czas inkubacji	-89,5	196,4	206,5	8	<0,001

W wykonanym doświadczeniu najwyższy istotny statystycznie poziom ekspresji genu *Mh-hsp*43 u osobników w stadium J2 *M. hapla* wykazano w temperaturze 35°C po 1 (2,65 ± 1,10 R) godzinie inkubacji po zadziałaniu stresu gorąca. Ekspresja tego genu w pozostałych czasach inkubacji w temperaturze 35°C osiągała niższą wartość. Wysoki poziom ekspresji tego genu występował również w temperaturze 5°C po 2 (2,41 ± 1,10 R), 24 (2,61 ± 1,10 R), 336 (1,68 ± 1,10 R) i 1344 (1,60 ± 1,10 R) godzinach inkubacji w wyniku działania stresu zimna. Istotny statystycznie wzrost ekspresji badanego genu obserwowano także w temperaturze 10°C po 1 (1,57 ± 1,10 R) oraz w 30°C po 1 (1,65 ± 1,10 R) godzinie inkubacji. Najniższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*43 wykazano w temperaturze 10°C po 2 (0,30 ± 0,10 R) i po 1344 (0,39 ± 0,10 R) godzinach inkubacji w tej samej temperaturze. Niższy poziom ekspresji badanego genu w temperaturze 20°C wykazano także w temperaturze 5°C po 1008 i w 40°C po 2 godzinach inkubacji. W pozostałych wariantach tego doświadczenia (temperatura/czas inkubacji) ekspresja genu *Mh-hsp*43 była zbliżona do wartości jego ekspresji w temperaturze kontrolnej (Tab. 30Z, Ryc. 29).



Ryc. 29. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*43 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 23, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.1.4.8. Ekspresja genu Mh-hsp12.2

Doświadczenie wykazało zależność pomiędzy temperaturą i czasem inkubacji a ekspresją genu *Mh-hsp*12.2 badaną w stadium J2 *M. hapla* (Ryc. 30). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 24 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 badanej u osobników w stadium J2. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na ekspresję genu *Mh-hsp*12.2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 31Z.

Tabela 24. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte, jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wage Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	<i>Mh-hsp</i> 12.2 ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	83,2	-52,3	0,0	37	1
2	<i>Mh-hsp</i> 12.2 ~ temperatura + czas inkubacji	-17,0	63,9	116,2	13	<0,001
3	Mh-hsp12.2 ~ temperatura	-27,3	69,7	122,0	7	<0,001
4	<i>Mh-hsp</i> 12.2 ~ czas inkubacji	-42,5	102,4	154,7	8	<0,001

Ekspresja genu *Mh-hsp*12.2 badana u osobników w stadium J2 *M. hapla* osiągnęła najwyższą wartość w temperaturze 5°C po 1 (1,65  $\pm$  0,08 R) godzinie inkubacji w wyniku stresu zimna wywołanego tą temperaturą. Wartości ekspresji w pozostałych warunkach eksperymentu temperatura/czas były zbliżone lub niższe w porównaniu do poziomu ekspresji tego genu w temperaturze kontrolnej 20°C. Najniższy jednakowy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 wykazano w temperaturach 40°C po 8 godzinach inkubacji i w 5°C po 1344 (0,06  $\pm$  0,08 R) godzinach inkubacji (Tab. 32Z, Ryc. 30).



Ryc. 30. Zależność ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 24, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

### 4.1.5. Podsumowanie wyników badań ekspresji genów hsp

Badano wpływ temperatur stresowych (5°C – stres zimna, 35°C i 40°C – stres gorąca) i niestresowych (10°C, 20°C – temperatura kontrolna, 30°C) na ekspresję 8 genów *hsp* w stadium jaja i w stadium J2 *M. hapla.* W obu badanych stadiach rozwojowych wykazano wzrost poziomu transkrypcji wszystkich genów *hsp* na działanie stresu gorąca, za wyjątkiem genu *Mh-hsp*12.2 w stadium J2. Jedynie dwa geny *Mh-hsp*60 i *Mh-dnj*19 w obu badanych stadiach rozwojowych reagowały wzrostem ekspresji na temperatury wywołujące stres gorąca i zimna. Najwyższy wzrost ekspresji wywołany stresem gorąca obserwowany był dla genów *Mh-hsp*90 (Tab. 18Z, Ryc. 23) i *Mh-hsp*1 (Tab. 20Z, Ryc. 24) w stadium J2. W wyniku działania stresu zimna odnotowano wzrost ekspresji genów *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19 i *Mh-hsp*12.2 w obu badanych stadiach. Wykazano także brak reakcji genów *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*4 i *Mh-hsp*6 na stres zimna u obu stadiów *M. hapla*. Dla pozostałych genów tj. *Mh-hsp*1 i *Mh-hsp*43 odnotowano wzrost ekspresji wywołany stresem zimna tylko u osobników w stadium J2 *M. hapla* (Tab. 25).

Tabela 25. Wzrost poziomu ekspresji (+), lub brak reakcji (-) genów *hsp* na stres gorąca i zimna, badanych w stadium jaja i u osobników stadium J2 *M. hapla*, określony względem temperatury kontrolnej ( $20^{\circ}$ C).

Padany gan han	Stres	gorąca	Stres zimna			
Dauany gen <i>nsp</i>	Stadium jaja	Stadium J2	Stadium jaja	Stadium J2		
Mh-hsp90	+	+	-	-		
Mh-hsp1	+	+	-	+		
Mh-hsp4	+	+	-	-		
Mh-hsp6	+	+	-	-		
Mh-hsp60	+	+	+	+		
Mh-dnj19	+	+	+	+		
Mh-hsp43	+	+	-	+		
<i>Mh-hsp</i> 12.2	+	-	+	+		

W przeprowadzonych badaniach obserwowano także różnice w ekspresji genów *hsp* między badanymi stadiami. U większości badanych genów *hsp* (za wyjątkiem genów *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2) zawsze wyższy poziom ekspresji, bez względu na to czy wywołany był stresem gorąca czy zimna, występował w stadium J2 *M. hapla*.

## 4.2. Wpływ temperatury na stadium jaja oraz na parametry stanu fizjologicznego wylęgniętych z tych jaj stadiów J2

Z jaj inkubowanych w temperaturze 40°C nie wylęgły się osobniki stadium J2 *M. hapla*, dlatego też w przedstawionych wynikach badań nie uwzględniono wartości tej temperatury.

# 4.2.1. Zależność długości ciała osobników stadium J2 od temperatury i czasu inkubacji stadium jaja

Doświadczenie wykazało zależność pomiędzy temperaturą inkubacji stadium jaja *M. hapla* a długością ciała wylęgniętego z tych jaj osobników stadium J2 (Ryc. 31). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 26 jako najlepiej dopasowany

do danych objaśniających różnice w długości ciała osobników stadium J2 *M. hapla*. Model ten zakładał, że długość ciała była kształtowana wyłącznie przez temperaturę. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 33Z.

Tabela 26. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w długości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji stadium jaja. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	<b>A AICc</b>	df	waga
1	długość ciała ~ temperatura	-2283,2	4578,6	0,0	6	0,88
2	długość ciała ~ temperatura + czas inkubacji	-2282,2	4582,6	4,0	9	0,12
3	długość ciała ~ (temperatura + czas inkubacji) ^2	-2278,6	4600,8	22,2	21	<0,001
4	długość ciała ~ czas inkubacji	-2386,6	4783,2	204,6	5	<0,001

Największą długość ciała obserwowano u osobników stadium J2 *M. hapla* wylęgniętych z jaj inkubowanych w temperaturze 30°C po 24 (390,2 ± 2,0 µm) godzinach inkubacji oraz w pozostałych wariantach czasu inkubacji tej samej temperatury. Następnie największą długość ciała osiągnęły osobniki J2 wylęgnięte z jaj inkubowanych w temperaturze kontrolnej 20°C (386,9 ± 2,0 µm). W wariancie eksperymentu dotyczącego temperatury 35°C po 24 godzinach inkubacji stadium jaja zaobserwowano wylęgnięte osobniki stadium J2 o najmniejszej długości ciała (365,5 ± 2,0 µm). Dla temperatury 35°C w pozostałych wariantach czasowych inkubacji również obserwowano najmniejszą długość ciała osobników stadium J2 (Tab. 34Z, Ryc. 31).



Ryc. 31. Zależność długości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury. Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 26, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.2.2. Zależność szerokości ciała osobników stadium J2 od temperatury i czasu inkubacji stadium jaja

Oznaczono zależność pomiędzy temperaturą i czasem inkubacji stadium jaja *M. hapla* a szerokością ciała wylęgniętego z tych jaj osobników w stadium J2 (Ryc. 32). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 27 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w szerokości ciała osobników stadium J2 *M. hapla*. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na szerokość ciała osobników stadium J2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 35Z.

Tabela 27. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w szerokości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji stadium jaja. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICe	df	waga
1	szerokość ciała ~ (temperatura + czas inkubacji)^2	-417,1	877,8	0,0	21	1
2	szerokość ciała ~ temperatura + czas inkubacji	-482,2	982,8	104,9	9	<0,001
3	szerokość ciała ~ temperatura	-488,7	989,4	111,6	6	<0,001
4	szerokość ciała ~ czas inkubacji	-612,1	1234,3	356,5	5	<0,001

Największą szerokość ciała (15,6 ± 0,09 µm) osiągnęły osobniki stadium J2, które wylęgły się z jaj inkubowanych w temperaturze optymalnej (kontrolnej) 20°C. Spośród wszystkich wariantów eksperymentu najmniejszą średnią szerokość ciała (13,81 ± 0,09 µm) uzyskały osobniki J2, które wylęgły się z jaj inkubowanych w temperaturze 35°C po 24 godzinach ekspozycji. Także w pozostałych grupach czasowych eksperymentu, czyli po 1, 2 i 8 godzinach inkubacji w 35°C, szerokość ciała osobników J2 była najniższa. U osobników J2 wylęgniętych z jaj inkubowanych w temperaturze 5°C wraz z wydłużeniem czasu inkubacji od 1 do 24 godzin obserwowano zmniejszenie szerokości ciała od 15,48 ± 0,09 µm po 1 godzinie inkubacji do 14,73 ± 0,09 µm po 24 godzinach inkubacji. W temperaturze 10°C i 30°C wraz z wydłużeniem się czasu inkubacji wykazano wzrost szerokości ciała osobników J2, przy czym w wariancie 30°C po 24 (15,31 ± 0,09 µm) godzinach inkubacji obserwowany był niewielkie zmniejszenie szerokości ciała osobników stadium J2 w porównaniu do wariantu 30°C po 8 (15,35 ± 0,09 µm) godzinach inkubacji (Tab. 36Z, Ryc. 32).



Ryc 32. Zależność szerokości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele) stadium jaja. Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 27, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.2.3. Zależność masy ciała osobników stadium J2 od temperatury i czasu inkubacji stadium jaja

Badanie wykazało zależność pomiędzy temperaturą i czasem inkubacji stadium jaja *M. hapla* a masą ciała wylęgniętego z tych jaj osobników J2 (Ryc. 33). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 28 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w wartościach masy ciała stadium J2 *M. hapla*. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na masę ciała. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 37Z.

Tabela 28. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w wartościach masy ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji stadium jaja. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICe	df	waga
1	masa ciała ~ temperatura + czas inkubacji + temperatura:czas inkubacji	2430,0	-4816,3	0,0	21	1
2	masa ciała ~ temperatura + czas inkubacji	2383,7	-4749,1	67,2	9	<0,001
3	masa ciała ~ temperatura	2379,1	-4746,0	70,3	6	<0,001
4	masa ciała ~ czas inkubacji	2232,8	-4455,5	360,8	5	<0,001

Najwyższą masę ciała (0,059  $\pm$  0,0008 µg) osiągnęły osobniki J2, które wylęgły się z jaj inkubowanych w temperaturze optymalnej (kontrolnej) 20°C. Spośród wszystkich wariantów eksperymentu najniższą masę ciała (0,044  $\pm$  0,0008 µg) uzyskały osobniki J2, które wylęgły się z jaj inkubowanych w temperaturze stresowej 35°C po 24 godzinach ekspozycji. Także w pozostałych grupach czasowych eksperymentu, czyli po 1, 2 i 8 godzinach inkubacji w 35°C, średnia masa ciała osobników J2 była najniższa. U osobników J2 wylęgniętych z jaj inkubowanych w temperaturze 5°C wraz z wydłużeniem czasu inkubacji od 1 do 24 godzin obserwowany był redukcja masy ciała od 0,057  $\pm$  0,0008 µg po 1 godzinie inkubacji do 0,051  $\pm$  0,0008 µg po 24 godzinach inkubacji. W eksperymencie dotyczącym temperatury 10°C i 30°C zaobserwowano wzrost wartości średniej masy ciała osobników J2 wraz z wydłużeniem czasu inkubacji, przy czym w wariancie 30°C/8 godzin i 30°C/24 godziny nie było różnic w ich masie ciała (Tab. 38Z, Ryc. 33).



Ryc. 33. Zależność masy ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele) stadium jaja. Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 28, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.3. Wpływ temperatury na parametry stanu fizjologicznego osobników stadium J2

Najkrócej żyły osobniki stadium J2 *M. hapla* w temperaturze 40°C, wszystkie były martwe po 336 godzinach inkubacji, następne po 1008 godzinach w 35°C i kolejne po 1344 godzinach w 30°C. Przedstawione warianty eksperymentów, w których osobniki stadium J2

były martwe, nie były wykorzystywane do dalszych badań i oznaczone zostały w Tabelach jako "NA" (*not available*).

## 4.3.1. Zależność długości ciała od temperatury i czasu inkubacji stadium J2

W przeprowadzonym badaniu wykazano różnice w długości ciała w zależności do temperatury (Ryc. 34A) i czasu inkubacji (Ryc. 34B) osobników stadium J2 *M. hapla.* Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 29 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w długości ciała mierzonej u osobników stadium J2 *M. hapla.* Model ten zakładał addytywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na długość ciała osobników w stadium J2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 39Z.

Tabela 29. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w długości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	długość ciała ~ temperatura + czas inkubacji	-3414,7	6855,6	0,0	13	0,941
2	długość ciała ~ czas inkubacji	-3422,5	6861,2	5,5	8	0,059
3	długość ciała ~ temperatura	-3437,3	6888,7	33,0	7	<0,001
4	długość ciała ~ (temperatura + czas inkubacji)^2	-3413,5	6903,7	48,1	37	<0,001

Oznaczono zależność pomiędzy długością ciała a temperaturą i czasem inkubacji osobników stadium J2 *M. hapla*. Badając zależność długości ciała osobników J2 od temperatury wykazano, że największą istotną statystycznie długość ciała ( $390,2 \pm 0,43 \mu m$ ) nicienie osiągnęły w temperaturze  $30^{\circ}$ C, a najmniejszą również istotną statystycznie ( $388,0 \pm 0,40 \mu m$ ) w temperaturze stresowej 5°C (Tab. 40Z A; Ryc. 34A). Natomiast w zależności od czasu inkubacji największą długość ciała ( $391,6 \pm 0,63 \mu m$ ) osiągnęły po 1344 godzinach inkubacji, a najmniejszą ( $387,8 \pm 0,43 \mu m$ ) po 1 godzinie inkubacji. Widoczna była zależność, zgodnie z którą wraz z wydłużeniem się czasu inkubacji rośnie długość ciała osobników J2. Po 1-, 2-, 8- i 24-godzinnej inkubacji wzrost długości ciała był niewielki wynoszący od  $387,8 \pm 0,43 \mu m$  po 1 godzinie do  $388,9 \pm 0,43 \mu m$  po 24 godzinach inkubacji. Istotny statystycznie wzrost długości ciała osobników J2 obserwowano w pozostałych czasach inkubacji (Tab. 40Z B; Ryc. 34B).



Ryc. 34. Zależność długości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury (A) i czasu inkubacji (h – godzina) (B). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 29, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.3.2. Zależność szerokości ciała od temperatury i czasu inkubacji stadium J2

Przeprowadzone badanie wykazało różnice w szerokości ciała osobników stadium J2 *M. hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 35). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 30 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w szerokości ciała mierzonej u osobników J2 *M. hapla*. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na szerokość ciała osobników J2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 41Z.

Tabela 30. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w szerokości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	szerokość ciała ~ (temperatura + czas inkubacji)^2	-167,3	411,4	0,0	37	1
2	szerokość ciała ~ temperatura + czas inkubacji	-756,8	1539,9	1128,6	13	<0,001
3	szerokość ciała ~ czas inkubacji	-1217,3	2450,8	2039,5	8	<0,001
4	szerokość ciała ~ temperatura	-1687,9	3389,8	2978,4	7	<0,001

Wykazano zależność pomiędzy szerokością ciała osobników stadium J2 *M. hapla* a temperaturą i czasem inkubacji. Największą średnią szerokość ciała (15,9  $\pm$  0,05  $\mu$ m)

zmierzono u nicieni inkubowanych przez 1 godzinę w temperaturze 5°C. W każdym z przedziałów czasowych największą szerokość ciała posiadały osobniki J2 inkubowane w 5°C. Najmniejszą szerokość ciała (11,7  $\pm$  0,05 µm) obserwowano w temperaturze 30°C po 1008 godzinach inkubacji. W każdym z przedziałów czasowych najmniejszą szerokość ciała posiadały nicienie inkubowane w najwyższej temperaturze dla danego panelu. Zauważalna była zależność, zgodnie z którą wraz ze wzrostem temperatury (w obrębie każdego panelu) i wydłużaniem czasu inkubacji (między poszczególnymi panelami) szerokość ciała osobników J2 malała. Ta zależność dotyczyła także szerokości ciała nicieni inkubowanych w temperaturze kontrolnej (20°C) (Tab. 42Z; Ryc. 35).



Ryc. 35. Zależność szerokości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 30, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

### 4.3.3. Zależność masy ciała od temperatury i czasu inkubacji stadium J2

Wykonane doświadczenie wykazało różnice w wartościach masy ciała osobników stadium J2 *M. hapla* w zależności do temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 36). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 31 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w wartościach masy ciała mierzonej u osobników J2 *M. hapla*. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na

masę ciała osobników J2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 43Z.

Tabela 31. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w wartościach masy ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności do temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICe	df	waga
1	masa ciała ~ (temperatura + czas inkubacji)^2	5085,2	-10093,6	0,0	37	1
2	masa ciała ~ temperatura + czas inkubacji	4634,7	-9243,0	850,6	13	<0,001
3	masa ciała ~ czas inkubacji	4178,7	-8341,4	1752,3	8	<0,001
4	masa ciała ~ temperatura	3713,2	-7412,2	2681,4	7	<0,001

Wykazano zależność pomiędzy masą ciała osobników stadium J2 *M. hapla* a temperaturą i czasem inkubacji. Najwyższą masę ciała  $(0,0610 \pm 0,0004 \ \mu g)$  zmierzono u osobników J2 inkubowanych przez 1 godzinę w temperaturze stresowej 5°C. Dla każdego czasu inkubacji (panelu) najwyższą masę ciała posiadały nicienie inkubowane w 5°C. Najniższą o tej samej wartości masę ciała  $(0,0335 \pm 0,0004 \ \mu g)$  obserwowano w dwóch wariantach doświadczenia: w temperaturze 20°C (kontrola) po 1344 godzinach inkubacji oraz w temperaturze 30°C po 1008 godzinach inkubacji. W każdym zastosowanym czasie inkubacji najniższą masę ciała posiadały nicienie inkubowane w najwyższej temperaturze dla danego panelu. Zauważalna była zależność, według której wraz ze wzrostem temperatury (w każdym panelu) i wydłużaniem czasu inkubacji (między poszczególnymi panelami) masa ciała osobników J2 spadała. Ta zależność dotyczyła także masy ciała nicieni inkubowanych w temperaturze kontrolnej (20°C) (Tab. 44Z; Ryc. 36).



Ryc. 36. Zależność masy ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 31, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

## 4.3.4. Powierzchnia wybarwionych lipidów

Wykazano, że powierzchnia wybarwionych lipidów badana u osobników J2 *M. hapla* zmieniała się w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. od 37 do 44). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 32 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w wartościach powierzchni wybarwionych lipidów mierzonej u osobników J2 *M. hapla*. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury, czasu inkubacji i masy ciała na powierzchnię wybarwionych lipidów w stadium J2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 45Z.

Tabela 32. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w wartościach powierzchni wybarwionych lipidów u osobników J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury, czasu inkubacji i masy ciała. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + masa ciała) + temperatura:czas inkubacji + temperatura:masa ciała	-2695,2	5480,1	0,0	43	0,899
2	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + masa ciała)^2	-2691,6	5486,0	5,8	49	0,049
Dalsza cześć Tabeli na następnej stronie						

3	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + długość ciała + szerokość ciała) + temperatura:czas inkubacji + długość ciała:temperatura + szerokość ciała:temperatura	-2692,1	5487,0	6,8	49	0,029
4	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + długość ciała + szerokość ciała) + temperatura:czas inkubacji + szerokość ciała:temperatura + czas inkubacji:szerokość ciała + długość ciała:szerokość ciała	-2690,3	5487,8	7,7	51	0,019
5	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + długość ciała + szerokość ciała) + temperatura:czas inkubacji + długość ciała:temperatura + szerokość ciała:temperatura + czas inkubacji:szerokość ciała + długość ciała:szerokość ciała	-2686,6	5491,3	11,2	56	0,003
6	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + długość ciała + szerokość ciała)^2	-2684,5	5500,7	20,6	62	<0,001
7	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + masa ciała)^3	-2679,4	5515,6	35,4	73	<0,001
8	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + długość ciała + szerokość ciała)^3	-2655,8	5584,4	104,3	121	<0,001
9	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + długość ciała + szerokość ciała) + długość ciała:czas inkubacji + szerokość ciała:czas inkubacji + długość ciała:temperatura + szerokość ciała:temperatura	-2756,0	5588,7	108,6	37	<0,001
10	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + masa ciała) + masa ciała:czas inkubacji + masa ciała:temperatura	-2775,6	5602,4	122,3	25	<0,001
11	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + długość ciała + szerokość ciała) + długość ciała:czas inkubacji + szerokość ciała:czas inkubacji	-2844,4	5744,2	264,1	27	<0,001
12	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji + masa ciała) + masa ciała:czas inkubacji	-2865,2	5771,2	291,1	20	<0,001
13	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ temperatura + czas inkubacji + długość ciała + szerokość ciała	-2937,4	5905,2	425,1	15	<0,001
14	powierzchnia wybarwionych lipidów ~ temperatura + czas inkubacji + masa ciała	-2968,4	5965,2	485,0	14	<0,001

## 4.3.4.1. Zależność powierzchni wybarwionych lipidów od temperatury i czasu inkubacji stadium J2

Przeprowadzone badanie wykazało różnice w wartościach powierzchni wybarwionych lipidów w zależności od temperatury i czasu inkubacji osobników J2 *M. hapla* (Tab. 46Z; Ryc. 37). Wykonane fotografie (Ryc. od 38 do 43) pokazują zmiany wielkości obserwowanej powierzchni wybarwionych lipidów w ciele osobników J2 *M. hapla* na działanie różnych temperatur i czasów inkubacji. W początkowym okresie inkubacji (do 24 godzin) niezależnie od zastosowanej temperatury obserwuje się mniej lub bardziej zwarty obraz wybarwionych lipidów w ciele nicieni. Wybarwione na czerwono lipidy widoczne są na całej długości jelita. Największą powierzchnię wybarwionych lipidów (62,9 ± 1,02 %) zmierzono u osobników J2 inkubowanych przez 1 godzinę w temperaturze 10°C (Ryc. 37, 39). Najmniejszą mierzalną powierzchnię wybarwionych lipidów (1,14 ± 1,68 %) obserwowano w temperaturze kontrolnej (20°C) po 1344 godzinach inkubacji (Ryc. 37, 40). Najszybciej

powierzchnia wybarwionych lipidów malała u nicieni inkubowanych w temperaturze stresowej 40°C (Ryc. 37, 43). Redukcja powierzchni wybarwionych lipidów do wartości niemierzalnej nastąpił już po 336 godzinach inkubacji w 40°C, następnie w temperaturze 35°C po 1008 godzinach i w 30°C po 1344 godzinach inkubacji. Najwolniej powierzchnia lipidów malała w temperaturze stresowej 5°C (Ryc. 37, 38). Zauważalna była zależność, zgodnie z którą im wyższa temperatura i dłuższy był czas inkubacji osobników J2, tym bardziej malała powierzchnia wybarwionych lipidów (dotyczy szczególnie czasu inkubacji 336, 1008 i 1344 godziny) (Tab. 46Z; Ryc. 37). Obserwowano także prawidłowość, że powierzchnia lipidów malała najszybciej w odcinku początkowym jelita. Powierzchnia kropli lipidowych w przedniej części ciała malała aż do ich całkowitego zaniku. Następnie zmiany te zachodziły w kierunku ogona. Ostatnie wybarwione lipidy obserwowano w tylnej części ciała osobników J2 *M. hapla* – w części ogonowej (Ryc. od 38 do 43).



Ryc. 37. Zależność powierzchni wybarwionych lipidów u osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 32, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.









Ryc. 41. Osobniki stadium J2 *Meloidogyne hapla* z wybarwionymi na czerwono lipidami po uprzedniej inkubacji w temperaturze 30°C przez 1, 2, 8, 24, 336 i 1008h (godziny) (fot. Ł. Flis). Skala: 50,0 μm.



Ryc. 42. Osobniki stadium J2 *Meloidogyne hapla* z wybarwionymi na czerwono lipidami po uprzedniej inkubacji w temperaturze  $35^{\circ}$ C przez 1, 2, 8, 24 i 336h (godziny) (fot. Ł. Flis). Skala: 50,0 µm.



Ryc. 43. Osobniki stadium J2 *Meloidogyne hapla* z wybarwionymi na czerwono lipidami po uprzedniej inkubacji w temperaturze 35°C przez 1, 2, 8 i 24h (godziny) (fot. Ł. Flis). Skala: 50,0 μm.

## 4.3.4.2. Zależność powierzchni wybarwionych lipidów od temperatury i masy ciała stadium J2

Badanie powierzchni wybarwionych lipidów wykazało jej zróżnicowanie w zależności od temperatury i masy ciała osobników J2 *M. hapla* (Ryc. 44). Największą powierzchnię wybarwionych lipidów (49,69  $\pm$  2,43 %) zmierzono u osobników J2 o masie ciała 0,3 µg inkubowanych w temperaturze 10°C. Najmniejszą średnią wartość powierzchni wybarwionych lipidów (44,23  $\pm$  1,58 %) obserwowano u osobników J2 o masie ciała 0,07 µg w temperaturze 20°C. Natomiast najmniejszą powierzchnię wybarwionych lipidów, w każdym panelu dotyczącym masy ciała (oprócz panelu z masą ciała 0,03 µg), obserwowano w temperaturze 20°C (Tab. 47Z; Ryc. 44).



Ryc. 44. Zależność powierzchni wybarwionych lipidów u osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i masy ciała (poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 32, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania. Dla wartości temperatury 30°C, 35°C i 40°C oszacowania efektów dla tego modelu nie są możliwe.

## 4.3.5. Zależność masy lipidów od temperatury i czasu inkubacji stadium J2

Wykonane doświadczenie wykazało różnice w wartości masy lipidów badanej u osobników J2 *M. hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 45). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 33 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w wartości masy lipidów u osobników J2 *M. hapla*. Model ten zakładał łączne, interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na masę lipidów osobników J2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 48Z.

Tabela 33. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w wartości masy lipidów osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	LL	AICc	Δ AICc	df	waga
1	masa lipidów ~ (temperatura + czas inkubacji)^2	5226,6	-10379,2	0,0	37	1
2	masa lipidów ~ temperatura + czas inkubacji	5111,1	-10196,3	182,9	13	<0,001
3	masa lipidów ~ czas inkubacji	4121,8	-8227,6	2151,6	8	<0,001
4	masa lipidów ~ temperatura	3182,6	-6351,3	4027,9	7	<0,001

Wykazano zależność pomiędzy masą lipidów a temperaturą i czasem inkubacji osobników J2 *M. hapla*. Najwyższą średnią masę lipidów  $(0,037 \pm 0,0004 \mu g)$  wykazano u osobników J2, które inkubowano w temperaturze 5°C przez 1 godzinę. Spośród wszystkich wariantów eksperymentu najszybciej masa lipidów spadała u osobników J2 inkubowanych w temperaturach stresowych 40°C, a następnie w 35°C. Najwolniej masa lipidów spadała w temperaturze 5°C. Najmniejszą zmierzona masę lipidów ( $0.0004 \pm 0.0004 \mu g$ ) wykazano u osobników J2 inkubowanych w temperaturze 30°C przez 1008 godzin. Dla każdego badanego czasu inkubacji (poszczególne panele z Ryc. 45) najniższą masę lipidów stwierdzono u nicieni inkubowanych w najwyższej temperaturze dla danego panelu. Masa lipidów mierzona u osobników J2 w przedziale temperaturowym od 5°C do 30°C i czasie inkubacji dla paneli od 1 do 24 godzin nie uległa znacznym zmianom. Zaobserwowano znaczne obniżenie masy lipidów w temperaturach 35°C i 40°C i czasie inkubacji od 1 do 24 godzin. Wykazano również wyraźne obniżenie masy lipidów wraz ze wzrostem temperatury w czasie inkubacji 336, 1008 i 1344 godziny. Zauważalna była zależność, zgodnie z która wraz ze wzrostem temperatury (w obrębie każdego panelu) i wydłużaniem czasu inkubacji (między poszczególnymi panelami) masa lipidów u osobników J2 spadała. Ta zależność dotyczyła także masy lipidów nicieni inkubowanych w temperaturze kontrolnej (Tab. 49Z; Ryc. 45).



Ryc. 45. Zależność masy lipidów osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 33, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

#### 4.4. Wpływ temperatury na aktywność ruchową osobników stadium J2

### 4.4.1. Zależność aktywności ruchowej stadium J2 od temperatury i czasu inkubacji

Doświadczenie wykazało różnice w aktywności ruchowej badanej u osobników J2 *M. hapla* w zależności do temperatury i czasu inkubacji (Ryc. 46). Selekcja modeli z użyciem kryterium AICc wskazała model 1 z Tabeli 34 jako najlepiej dopasowany do danych objaśniających różnice w aktywności ruchowej mierzonej u osobników J2 *M. hapla*. Model ten zakładał interaktywne oddziaływanie temperatury i czasu inkubacji na aktywność ruchową osobników J2. Oszacowania parametrów modelu optymalnego przedstawiono w Tabeli 50Z.

Tabela 34. Selekcja modeli GLM objaśniających różnice w aktywności ruchowej osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji. Dla każdego modelu podano zmienne użyte jako predyktory, logarytm maksymalnej wiarygodności (LL), wartość kryterium informacyjnego Akaikego dla małych prób (AICc), różnicę wartości AICc danego modelu oraz modelu z minimalnym AICc w analizowanym zbiorze modeli ( $\Delta$  AICc), liczbę stopni swobody (df) oraz wagę Akaikego danego modelu (waga).

nr	Model (predyktory)	$\mathbf{L}\mathbf{L}$	AICc	Δ AICc	df	waga
1	aktywność ruchowa ~ (temperatura + czas inkubacji)^2	-1455,8	2955,2	0,0	21	1
2	aktywność ruchowa ~ temperatura + czas inkubacji	-1664,5	3347,3	392,1	9	<0,001
3	aktywność ruchowa ~ temperatura	-1819,2	3650,6	695,4	6	<0,001
4	aktywność ruchowa ~ czas inkubacji	-2665,9	5341,9	2386,7	5	<0,001

Badane osobniki J2 M. hapla, inkubowane w temperaturze stresowej 40°C, w każdym wariancie czasowym nie wykazywały aktywności ruchowej (były sparaliżowane) i nie były brane pod uwagę w opracowaniu statystycznym. Wykazano zależność pomiędzy aktywnością ruchową osobników J2 M. hapla a temperaturą i czasem inkubacji. Najniższą aktywność ruchowa  $(3,2 \pm 0.51 \text{ L/5min})$  osobników J2 obserwowano w temperaturze stresowej 5°C po 24 godzinach inkubacji, natomiast najwyższą  $(61,1 \pm 0.51 \text{ L/5min})$  w temperaturze 30°C po 1 godzinie ekspozycji. W temperaturach od 5°C do 20°C, w każdym wariancie czasu inkubacji widoczny był wzrost aktywności ruchowej osobników J2. W każdym wariancie eksperymentu (poszczególne panele) największe obniżenie aktywności ruchowej osobników J2 obserwowano w temperaturze stresowej 35°C w porównaniu do temperatury 30°C. W temperaturze kontrolnej 20°C aktywność ruchowa osobników J2 osiągnęła wartość najwyższą w dwóch wariantach eksperymentu: po 8 (53,9  $\pm$  0,51 L/5min) i 24 (54,3  $\pm$  0,51 L/5min) godzinach inkubacji. Zauważalna była zależność, według której aktywność ruchowa osobników J2 w temperaturach stresowych 5°C i 35°C była mniejsza w porównaniu do aktywności ruchowej tych osobników obserwowanej po zadziałaniu pozostałych badanych temperatur niestresowych (Tab. 51Z; Ryc. 46).



Ryc. 46. Zależność aktywności ruchowej osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* od temperatury i czasu inkubacji (h – godzina, poszczególne panele). Kontrola = temperatura 20°C. Przedstawiono uśrednione efekty (*marginal means*) oszacowane dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli (Tab. 34, model 1). Kropka oznacza wartość oszacowania, wąsy oznaczają 95% przedział ufności tego oszacowania.

### 5. Dyskusja

Dostępność pokarmu i temperatura to dwa czynniki środowiskowe, które istotnie wpływają na cechy historii życiowej organizmów (Klass, 1977; So i in., 2012; Ayub i in., 2013). W przeprowadzonych doświadczeniach dotyczących oddziaływania temperatury na stadium J2 *M. hapla* wykluczono czynnik dostępności pokarmu, ponieważ wszystkie badane nicienie były głodzone. Pierwsza część przeprowadzonych doświadczeń dotyczyła oddziaływania temperatury i czasu inkubacji na poziom ekspresji genów *hsp* badany w stadium jaja i w stadium J2. W drugiej części badano wybrane parametry kondycji (stanu fizjologicznego) u stadium J2 oraz u stadium J2 wylęgniętego z jaj uprzednio inkubowanych w różnych temperaturach. Oba stadia były poddane inkubacji w tych samych temperaturach i czasie jakich użyto w badaniach genów *hsp*.

Temperatura otoczenia wpływa na organizmy na wiele sposobów m.in. powodując wzrost lub redukcję tempa przebiegu procesów fizjologicznych (Brown i in., 2012), warunkując czas trwania cyklu rozwojowego (Olive, 1995), a nawet bezpośrednio wpływając na śmiertelność (Pauly, 1980). Nie wszystkie poddane badaniom stadia M. hapla przeżyły eksperymenty. Temperatury określone w przeprowadzonych na potrzeby niniejszego doktoratu badaniach, jako stresowe, czyli 35°C i 40°C okazały się być dla inkubowanych stadiów letalne (Daulton i Nusbaum, 1961; Thomason i Lear, 1961; Kinloch i Allen, 1972). Stadium jaja nie przeżyło inkubacji w temperaturze 40°C – z jaj inkubowanych w tej temperaturze nie wyległy się osobniki stadium J2. Również temperatury 35°C i 40°C były letalne dla stadiów J2. Pierwsze nieżywe osobniki J2 zaobserwowano w temperaturze 40°C już po 336 godzinach inkubacji. Następne osobniki po 1008 godzinach w 35°C, a kolejne po 1344 godzinach w 30°C. Temperatura 30°C określona została w niniejszej pracy jako niestresowa, a mimo to po 8 tygodniach inkubacji nicienie były martwe. Przyczyną tak wysokiej śmiertelności stadium J2 mogły być grzyby, których rozwojowi w szalce z nicieniami mogła sprzyjać odpowiednia temperatura i czas inkubacji (Hussain i in., 2017) lub wyczerpanie się zapasów energii zmagazynowanych w organizmie osobników J2 w postaci obojetnych lipidów (Welte i Gould, 2017).

## 5.1. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp

W wyniku działania czynnika stresowego (biotycznego lub abiotycznego) w komórkach organizmu zachodzą zmiany metaboliczne. Odpowiedzią organizmu na bodźce stresowe jest m.in. wzrost ekspresji genów szoku termicznego w komórkach, a następnie synteza białek szoku termicznego nazywanych także białkami opiekuńczymi (Feder i

Hofmann, 1999). Czynnikiem stresowym w przeprowadzonych w tej pracy badaniach ekspresji genów *hsp* była temperatura. Dwa stadia rozwojowe – stadium jaja i stadium J2 *M. hapla* poddano inkubacji w temperaturach stresowych, które według literatury wpływały w istotny sposób na zahamowanie rozwoju tego nicienia. Były to temperatury 5°C (tzw. stres zimna) (Vrain i Barker, 1978; Charchar i Santo, 2001; Gulyas i Powell, 2022) oraz 35°C i 40°C (tzw. stres gorąca) (Thomason i Lear, 1961; Kinloch i Allen, 1972; Treinin i in., 2003). W celu wykazania różnic w ekspresji genów *hsp*, oprócz temperatur stresowych obydwa stadia inkubowano również w temperaturach niestresowych, takich jak 10°C, 20°C (kontrola) i 30°C (Thomason i Lear, 1961; Inserra i in., 1983).

#### Ekspresja genu Mh-hsp90

Najczęściej badanym genem szoku termicznego u nicieni jest gen hsp90 (Him i in., 2009; Gillan i Devaney, 2014). Jego ekspresja w obu badanych stadiach była najwyższa w wyniku działania stresu goraca wywołanego temperaturami 35°C i 40°C. Badanie genu Mhhsp90 w obu stadiach rozwojowych wykazało jego znacznie wyższą ekspresję w stadium J2 M. hapla. Najwyższy poziom ekspresji genu Mh-hsp90 w stadium jaja odnotowano po 2 godzinach inkubacji w temperaturze  $35^{\circ}$ C (4,96 ± 0,21 R) (Tab. 2Z, Ryc. 15). W tych samych warunkach temperatury i czasu inkubacji najwyższy poziom ekspresji tego genu wykazano również u osobników stadium J2 (35,33 ± 1,19 R) (Tab. 18Z, Ryc. 23). W wyżej wymienionych warunkach eksperymentu ekspresja badanego genu w stadium J2 była ponad ośmiokrotnie wyższa od ekspresji tego genu w stadium jaja. W dostępnej literaturze brak jest analogicznych badań, które można porównać z otrzymanymi w tej pracy wynikami. Wu i in. (2019) badali jedynie wpływ temperatur stresowych 4°C i 40°C na ekspresję genu *Mh-hsp*90 w stadium J2 M. hapla. Wykazali znaczący wzrost ekspresji w temperaturze 40°C, który był ponad 6-krotnie wyższy od ekspresji tego genu w temperaturze 4°C. Jak już wcześniej wykazano w tej pracy najwyższa ekspresja genu Mh-hsp90 występowała w temperaturze 35°C, ale w temperaturze 40°C po 2 godzinach inkubacji ekspresja tego genu była również wysoka ( $15,58 \pm 1,19$  R). Natomiast najniższą temperaturą, w której badano poziom ekspresji genu *Mh-hsp*90, była temperatura 5°C. W tej temperaturze nie wykazano istotnego wzrostu ekspresji badanego genu. Zarówno w badaniach dotyczących tej pracy, jak i w doświadczeniu wykonanym przez Wu i in. (2019) znacznie wyższy poziom ekspresji genu Mh-hsp90 obserwowano w temperaturach 35°C i 40°C w porównaniu do temperatur 4°C i 5°C. Wzrost ekspresji tego genu w temperaturach 35°C i 40°C świadczy o tym, że ten gen silniej reaguje na stres goraça, niż na stres zimna wywołany temperaturami 4°C i 5°C.

Poziom ekspresji genu hsp90 na działanie różnych temperatur badano również u M. artiellia (De Luca i in., 2009). De Luca i in. (2009) badali wpływ temperatur 5°C i 30°C na ekspresję genu Mt-hsp90 w stadium jaja i stadium J2 M. artiellia po 1, 2, 8 i 24 godzinach inkubacji. W wyniku ekspozycji na zimno w temperaturze 5°C ekspresja genu Mt-hsp90 w stadium jaja była wyższa od ekspresji tego genu badanego w stadium J2 M. artiellia bez względu na czas inkubacji. Natomiast w niniejszej rozprawie w tej samej temperaturze nie wykazano istotnej zmiany ekspresji genu Mh-hsp90 w obu badanych stadiach M. hapla w porównaniu do temperatury kontrolnej 20°C (Tab. 2Z, Ryc. 15; Tab. 18Z, Ryc. 23). Badanie genu Mt-hsp90 u M. artiellia w temperaturze 30°C we wszystkich czasach inkubacji wykazało wyższy poziom ekspresji tego genu w stadium J2 w porównaniu do ekspresji mierzonej w stadium jaja (De Luca i in., 2009). W badaniach wykonanych w niniejszej pracy również poziom ekspresji genu Mh-hsp90 w tej samej temperaturze w każdym z czasów inkubacji był wyższy w stadium J2 niż w stadium jaja *M. hapla*. Warto także odnotować, że poziom ekspresji obu porównywanych genów u obu gatunków Meloidogyne był znacznie wyższy w temperaturze 30°C niż w 5°C. Pozwala to na stwierdzenie, że u tych gatunków badany gen silniej reaguje na stres goraça, niż na stres zimna.

Kolejnym gatunkiem guzaka, u którego badano poziom ekspresji genu *hsp*90 w wyniku działania temperatur, był *M. incognita* (Bai i in., 2014). Poziom ekspresji genu *Mi-hsp*90 badany był w stadium J2 *M. incognita* w temperaturach 4°C i 39°C. Badania wykazały najwyższy wzrost ekspresji tego genu w temperaturze 39°C po 6 godzinach inkubacji, a najniższy w 4°C. Zarówno w prezentowanych w tej pracy badaniach, jak i w badaniach przeprowadzonych przez De Luca i in. (2009) oraz Bai i in. (2014) widoczna była zależność, zgodnie z którą ekspresja genu *hsp*90 była zawsze znacznie wyższa w temperaturach wywołujących stres gorąca u poddanych eksperymentom stadiów *Meloidogyne*.

## Ekspresja genu Mh-hsp1

Badanie genu *Mh-hsp*1 przeprowadzone na stadium jaja i osobnikach stadium J2 *M. hapla* wykazało różnice w ekspresji tego genu między badanymi stadiami. Poziom ekspresji genu *Mh-hsp*1 w stadium jaja wzrastał jedynie w wyniku działania stresu gorąca wywołanego temperaturą 35°C, do maksymalnej wartości 4,40 ± 0,13 R po 1 godzinie inkubacji (Tab. 4Z, Ryc. 16). Obserwowany w stadium J2 najwyższy poziom ekspresji genu *Mh-hsp*1 wykazano w temperaturze 40°C po 1 godzinie inkubacji i wynosił 61,78 ± 0,93 R (Tab. 20Z, Ryc. 24). Odpowiedź tego genu na stres gorąca w stadium J2 była 14-krotnie wyższa, niż wykazana w stadium jaja. Ponadto badanie genu *Mh-hsp*1 w stadium J2 wykazało wzrost jego ekspresji w

temperaturze 5°C na działanie stresu zimna, czego nie obserwowano w stadium jaja. W dostępnej literaturze brak jest informacji o podobnych badaniach prowadzonych na genie hsp1 u M. hapla, a także rodzaju Meloidogyne. Podobne badania prowadzono jednak u dwóch gatunków nicieni z rodzaju *Globodera* Skarbilovich, 1959 należących tak samo jak guzaki do grupy endopasożytów osiadłych (Eves-Van den Akker i in., 2016). U Globodera rostochiensis (Wollenweber, 1923) Behrens, 1975 i G. pallida (Stone, 1973) Behrens, 1975 wykazano zmiany w ekspresji genu hsp1 podczas ekspozycji na różne temperatury. Ekspresja genu Gro-hsp-1 u G. rostochiensis wzrosła ponad 8-krotnie a genu Gpa-hsp-1 u G. pallida ponad 6-krotnie po 1 godzinnej inkubacji stadiów J2 w temperaturze 30°C w porównaniu do temperatury 20°C (Jones i in., 2018). W wykonanych w tej rozprawie badaniach wykazano także prawie 7-krotny wzrost ekspresji genu *Mh-hsp*1w stadiach J2 po 1-godzinnnej inkubacji  $(6,79 \pm 0.93 \text{ R})$  w temperaturze 30°C w porównaniu do temperatury kontrolnej. Również w pozostałych czasach inkubacji w 30°C widoczny był wzrost ekspresji tego genu w porównaniu do temperatury kontrolnej. Wykazano istotny wzrost ekspresji genu Mh-hsp1 w wyniku działania stresu zimna wywołanego temperatura 5°C w każdym z badanych czasów. Również u G. pallida odnotowano niewielki wzrost ekspresji tego genu na działanie temperatury 15°C (Jones i in., 2018). Porównanie genu hsp1 w obu doświadczeniach pozwala stwierdzić, że ekspresja badanego genu u trzech różnych gatunków nicieni wzrasta w wyniku działania temperatur wywołujących stres gorąca, a u dwóch gatunków, tj. M. hapla i G. *pallida*, wzrasta także na działanie niższych temperatur wywołujących stres zimna.

Badania dotyczące genu *hsp*1 prowadzono również na nicieniu *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner i Buhrer, 1934) Nickle, 1970, który jest pasożytem drzew iglastych. W tym doświadczeniu wszystkie stadia rozwojowe tego nicienia poddano inkubacji w temperaturze 4°C. Badania wykazały wyraźny wzrost ekspresji genu *hsp*1 w wyniku działania stresu zimna (Huang i in., 2010). Z opisanego powyżej eksperymentu wynika, że gen *hsp*1, tak samo jak w przeprowadzonych w niniejszej rozprawie badaniach (dotyczy stadium J2 *M. hapla*), reaguje wzrostem ekspresji na stres zimna.

Inne badania dotyczące genu *hsp*1 prowadzono także na bakteriożernym wolnożyjącym nicieniu *C. elegans* (dziki szczep N2). Po 2, 4 i 6 godzinach inkubacji nicieni w temperaturze 33°C obserwowano odpowiednio 7-, 2,6- i 3-krotny wzrost ekspresji genu *hsp*1 w porównaniu do wartości ekspresji tego genu u nicieni niepoddanych stresowi gorąca (Zhang i in., 2013). Również inne badania na *C. elegans* (dziki szczep N2) wykazały wzrost ekspresji genu *hsp*1 po 1-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C w porównaniu do poziomu ekspresji tego genu u nicieni inkubowanych w 20°C (Sandner i in., 2020). Jak

wynika z przytoczonych powyżej badań nie tylko u badanego w niniejszej pracy gatunku *M. hapla*, ale także u gatunku *C. elegans*, obserwowany był wzrost ekspresji genu *hsp*1 na działanie stresu gorąca.

## Ekspresja genu Mh-hsp4

Eksperyment dotyczący ekspresji genu Mh-hsp4 wykazał najwyższy poziom ekspresji tego genu w temperaturze 35°C po 2 godzinach inkubacji zarówno w stadium jaja (2,02 ± 0,11 R) (Tab. 6Z, Ryc. 17), jak i w stadium J2 (4,59 ± 0,14 R) *M. hapla* (Tab. 22Z, Ryc. 25). Ekspresja genu Mh-hsp4 rosła w obu stadiach rozwojowych tylko na działanie stresu gorąca, przy czym najwyższa jej wartość była ponad 2-krotnie wyższa w stadium J2. Przegląd dostępnej literatury wykazał, że wpływ temperatury na ekspresję genu Mh-hsp4 u M. hapla nie był dotychczas badany. Wiekszość dostępnych badań dotyczacych tej tematyki poświęcona jest eksperymentom na C. elegans. Także metodyka wykonanych badań różni się od tej stosowanej w eksperymentach przeprowadzonych w tej rozprawie. Rodrigues i in. (2011) wykazali wzrost ekspresji genu *hsp*4 u dorosłych stadiów *C. elegans* (dziki szczep N2) w wyniku działania temperatury 33°C. Ekspresja tego genu rosła podczas inkubacji w czasie od 0,25 godziny przez 0,5 godziny, aż do osiągnięcia najwyższej wartości po 1-godzinnej inkubacji. Następnie ekspresja badanego genu spadła po 1,5 godzinie inkubacji (Rodrigues i in., 2011). Również badania, które przeprowadzili Shen i in. (2001), wykazały wzrost ekspresji genu *hsp*4 po 1-godzinnej inkubacji wszystkich stadiów rozwojowych *C. elegans* w temperaturze 30°C. W tej samej temperaturze przeprowadzono także inne badania, które wykazały prawie 2-krotny wzrost ekspresji genu hsp4 u dojrzałych osobników C. elegans w porównaniu do ekspresji tego genu u nicieni niepoddanych stresowi gorąca (Yoneda i in., 2004). W kolejnych badaniach odnotowano wzrost ekspresji genu hsp4 po inkubacji dojrzałych osobników C. elegans (dziki szczep N2) w temperaturze 35°C w czasie od 1 do 7 dni. Ekspresja tego genu rosła stopniowo do 5 dnia inkubacji, osiągając wartość maksymalną, po czym w 7 dniu jej wartość wyraźnie spadła. Ponadto badania te wykazały, że ekspresja genu hsp4 nie rośnie na działanie stresu zimna wywołanego temperaturą 4°C (Dues i in., 2016). Przytoczone powyżej badania potwierdzają, że ekspresja badanego w tej rozprawie genu Mh-hsp4 u obu stadiów M. hapla rośnie w wyniku działania stresu goraca. Można zauważyć, że ekspresja tego genu, tak samo jak w badaniach Rodrigues i in. (2011) i Dues i in. (2016), w początkowym etapie działania stresu gorąca intensywnie rośnie, a po osiągnięciu pewnego maksimum - jej poziom spada (dotyczy stadium J2 M. hapla). Ponadto w wykonanych w niniejszej pracy badaniach, jak i w badaniach Dues i in. (2016), badany gen nie reagował na stres zimna.

### Ekspresja genu Mh-hsp6

Wykonane przez autora tej pracy badania dotyczące genu Mh-hsp6 wykazały najwyższy wzrost ekspresji tego genu w stadium jaja w 35°C po 1 godzinie ekspozycji (3.29  $\pm$  0,07 R) (Tab. 8Z, Ryc. 18), a w stadium J2 w temperaturze 40°C po 2 godzinach inkubacji  $(4,92 \pm 0,13 \text{ R})$  (Tab. 24Z, Ryc. 26). Badania wykazały, że ekspresja tego genu rosła tylko w wyniku działania stresu gorąca i osiągnęła wyższe wartości w stadium J2 M. hapla. Przegląd dostępnej literatury nie wykazał podobnych badań prowadzonych na nicieniach z rodzaju Meloidogyne. Jedyne opisane w literaturze, podobne doświadczenia dotyczyły C. elegans. Badania przeprowadzone przez Labbadia i Morimoto (2015) w pierwszym dniu eksperymentu wykazały ponad 2-krotny wzrost ekspresji genu hsp6 u dojrzałych osobników C. elegans (dziki szczep N2) w wyniku 30-minutowej inkubacji w temperaturze 33°C w porównaniu do ekspresji tego genu u nicieni niepoddanych stresowi gorąca. W drugim dniu doświadczenia odnotowano już tylko niewielki wzrost ekspresji badanego genu w porównaniu do kontroli (Labbadia i Morimoto, 2015). W kolejnym podobnym badaniu dojrzałe osobniki C. elegans (dziki szczep N2) poddawane były codziennie 30-minutowej inkubacji w temperaturze 33°C. Najwyższy poziom ekspresji tego genu odnotowano w pierwszym dniu działania stresu goraça. Po drugim dniu działania tego stresu ekspresja spadła o połowe, a następnie nieznacznie wrosła w 4 i 7 dniu badania (Labbadia i in., 2017). Natomiast badania wykonane przez Prithika i in. (2016) wykazały u dojrzałych osobników C. elegans (dziki szczep N2) najwyższy wzrost ekspresji genu hsp6 po 12 godzinach trwania eksperymentu, w którym nicienie były podawane działaniu temperatur w ciągłym cyklu 35°C przez 2 godziny, a następnie 20°C przez 4 godziny. Tak wyniki badań otrzymane w niniejszej pracy, jak i te opisane powyżej, potwierdzają, że ekspresja genu hsp6 rośnie w wyniku działania stresu goraça. Natomiast ekspresja tego genu nie rośnie na działanie stresu zimna, co potwierdzają badania wykonane przez Dues i in. (2016). Powyższe badania, a także eksperymenty wykonane w tej pracy dowodzą, że gen Mh-hsp6 reaguje najwyższym wzrostem ekspresji w początkowym etapie ekspozycji na stres gorąca. W przypadku wykonanych w tej rozprawie badań najwyższy wzrost ekspresji badanego genu obserwowano po 8 godzinach inkubacji stadium J2, natomiast już po 24 godzinach ekspozycji ekspresja genu Mh-hsp6 była znacznie niższa.

#### Ekspresja genu Mh-hsp60

Badania genu Mh-hsp60 wykazały najwyższy poziom jego ekspresji w stadium jaja w temperaturze 5°C po 8 godzinach inkubacji  $(1,86 \pm 0,11 \text{ R})$  (Tab. 10Z, Ryc. 19), a w stadium J2 w temperaturze 35°C po 1 godzinie inkubacji  $(4,72 \pm 0,19 \text{ R})$  (Tab. 26Z, Ryc. 27). Wykonane w tej pracy badania wykazały, że ekspresja genu Mh-hsp60 rośnie w obu badanych stadiach M. hapla zarówno w wyniku ekspozycji na stres gorąca, jak i zimna. Przegląd dostępnej literatury nie wykazał podobnych eksperymentów prowadzonych na nicieniach z rodzaju Meloidogyne. Podobne badania, ale różniące się zastosowaną metodologia, wykonywane były na nicieniach bakteriożernych C. elegans. Wykazano w stadium L4 C. elegans (dziki szczep N2) prawie 3-krotny wzrost ekspresji genu hsp60 w wyniku 30-minutowej inkubacji w temperaturze 35°C w porównaniu do ekspresji tego genu u nicieni niepoddanych stresowi gorąca (Shi i in., 2023). Kolejne badania, prowadzone na dojrzałych nicieniach C. elegans (dziki szczep N2), wykazały ponad 2-krotny wzrost ekspresji genu hsp60 po inkubacji tych organizmów w temperaturze 35°C (Lu i in., 2020). U innego gatunku nicienia, Plectus acuminatus Bastian, 1865, badano białko Hsp60. Samice tego gatunku inkubowano przez 1 godzinę w 37°C i wykazano wzrost ekspresji białka Hsp60 spowodowanej działaniem stresu gorąca (Kammenga i in., 1998). Brak jest natomiast badań dotyczących wpływu stresu zimna na ekspresję genu hsp60 u C. elegans. Badania nad wpływem stresu zimna na ekspresję genu hsp60 prowadzono na innych grupach zwierzat. Przeprowadzone badania na dojrzałych osobnikach gatunku owada Lissorhoptrus oryzophilus Kuschel (Coleoptera: Curculionidae) po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 0°C wykazały znaczny wzrost ekspresji genu hsp60 w porównaniu do owadów inkubowanych w temperaturze 25°C (Yang i in., 2018). Opisane powyżej doświadczenia dotyczące wzrostu ekspresji genu hsp60 u C. elegans i P. acuminatus w wyniku działania stresu gorąca potwierdzają wyniki badań otrzymanych w niniejszej pracy. Uzyskane wyniki dotyczące wzrostu ekspresji genu Mh-hsp60 u obu stadiów M. hapla podczas działania stresu zimna wymagają przeprowadzenia dodatkowych doświadczeń w celu dokładniejszego zbadania reakcji tego genu na niskie temperatury stresowe.

## Ekspresja genu Mh-dnj19

Przeprowadzone w tej pracy badania, dotyczące genu *Mh-dnj*19, wykazały wzrost jego ekspresji w obu badanych stadiach *M. hapla* na działanie stresu gorąca oraz zimna. Najwyższy wzrost ekspresji w stadium jaja wykazano w temperaturze 5°C po 8 (1,84  $\pm$  0,07 R) godzinach inkubacji (Tab. 12Z, Ryc. 20), a w stadium J2 w 35°C po 2 (5,47  $\pm$  0,20 R)

godzinach inkubacji (Tab. 28Z, Ryc. 28). W dostępnej literaturze brak jest podobnych badań na gatunku *M. hapla* oraz na innych gatunkach nicieni z rodzaju *Meloidogyne*. Nieliczne badania dotyczące genu *dnj*19 przeprowadzono także na *C. elegans*. Wpływ stresu gorąca na poziom ekspresji genu *dnj*19 badano u 4- i 10-dniowych nicieni *C. elegans* (dziki szczep N2) w wyniku 1-godzinnej ekspozycji na temperaturę 35°C. Badania te wykazały 2-krotny wzrost ekspresji genu *dnj*19 u 4-dniowych nicieni w porównaniu do nicieni niepoddanych stresowi gorąca. Poziom ekspresji badanego genu u 10-dniowych *C. elegans* był już znacznie niższy, niż u nicieni 4-dniowych (Kirstein i in., 2017). Wzrost ekspresji genu *dnj*19 podczas działania stresu gorąca w doświadczeniu Kirstein i in. (2017) potwierdza otrzymane w tej rozprawie wyniki badań, w których u obu badanych stadiów *M. hapla* wykazano również wzrost ekspresji genu *Mh-dnj*19 w temperaturze wywołującej stres gorąca. Ze względu na brak dostępnych badań dotyczących wpływu stresu zimna na ekspresję genu *dnj*19 u innych nicieni porównanie ich z wykonanymi w tej pracy badaniami było niemożliwe i wymaga dalszych szczegółowych eksperymentów.

#### Ekspresja genu Mh-hsp43

Badania dotyczące genu Mh-hsp43 wykazały wzrost jego ekspresji w wyniku ekspozycji stadium jaja *M. hapla* na stres gorąca, a w przypadku stadium J2 – na stres gorąca oraz zimna. Najwyższy wzrost ekspresji genu Mh-hsp43 w stadium jaja wykazano w temperaturze 35°C, po 1 godzinie inkubacji  $(3,20 \pm 0,15 \text{ R})$  (Tab. 14Z, Ryc. 21). Najwyższy poziom ekspresji tego genu w tych samych warunkach temperatury i czasu inkubacji odnotowano także w stadium J2  $(2,65 \pm 1,10 \text{ R})$  (Tab. 30Z, Ryc. 29). Przegląd dostępnej literatury wskazuje na brak analogicznych lub podobnych badań prowadzonych na *M. hapla*, a także na nicieniach z rodzaju *Meloidogyne*. Podobne badania prowadzono natomiast na C. *elegans*. Badania, jakie wykonano na tym modelowym organizmie wykazały, wzrost ekspresji genu hsp43 w wyniku inkubacji w temperaturze 37°C przez 2,5 godziny (Fu i in., 2020). Również badania na nicieniu B. xylophilus wykazały wzrost ekspresji genu hsp43 podczas 4godzinnej inkubacji w temperaturze 30°C w porównaniu do ekspresji tego genu badanej u nicieni inkubowanych w temperaturze 20°C (Wang i in., 2016). Opisane powyżej doświadczenia potwierdzają otrzymane w niniejszej pracy wyniki badań dotyczące wzrostu ekspresji genu Mh-hsp43 podczas działania stresu gorąca u obu badanych stadiów M. hapla. Brak dostępnych badań na temat wpływu stresu zimna na ekspresję genu hsp43 u C. elegans uniemożliwia porównanie uzyskanych w tej rozprawie wyników dotyczących wzrostu ekspresji genu *Mh-hsp*43 w stadium J2 *M. hapla* w temperaturze 5°C.

#### Ekspresja genu Mh-hsp12.2

Badanie genu Mh-hsp12.2 w stadium jaja i w stadium J2 M. hapla wykazało wzrost jego ekspresji w wyniku działania stresu gorąca i stresu zimna. W stadium jaja wykazano najwyższy wzrost ekspresji badanego genu w temperaturze 35°C po 1 godzinie inkubacji  $(1,67 \pm 0.08 \text{ R})$  (Tab. 16Z, Ryc. 22). Wzrost ekspresji tego genu obserwowano również w temperaturze 5°C. Jedyny wzrost ekspresji genu Mh-hsp12.2 w stadium J2 wykazano w temperaturze 5°C po 1 godzinie inkubacji  $(1,65 \pm 0,08 \text{ R})$  na działanie stresu zimna (Tab. 32Z, Ryc. 30). Przegląd dostępnej literatury nie wykazał podobnych badań prowadzonych na nicieniach z rodzaju Meloidogyne. Badania dotyczące genu hsp12.2 prowadzono natomiast na bakteriożernym nicieniu C. elegans. Sánchez-Blanco i in., (2014) wykazali wzrost ekspresji genu hsp12.2 w stadium jaja C. elegans na działanie stresu gorąca. Natomiast Douglas i in. (2015) nie obserwowali w swoich badaniach wzrostu ekspresji tego genu u dojrzałych osobników C. elegans (dziki szczep N2) na działanie stresu gorąca. Inne badania wykazały niewielki wzrost ekspresji genu hsp12.2 w stadium L3 C. elegans w wyniku działania stresu zimna i brak ekspresji tego genu na działanie stresu goraca (Krause, 2013). Również w wynikach badań dotyczących tej rozprawy można zauważyć różnice w ekspresji genu Mhhsp12.2 pomiędzy badanymi stadiami. W stadium J2 obserwowano niewielki wzrost ekspresji badanego genu tylko na działanie temperatury 5°C po 1 godzinie inkubacji, a w stadium jaja wykazano wzrost ekspresji tego genu zarówno w warunkach na stresu gorąca jak i stresu zimna. Podsumowując powyższe badania i te otrzymane w niniejszej rozprawie można stwierdzić, że poziom ekspresji genu hsp12.2 różni się w zależności od stadium rozwojowego, u którego jest mierzony.

## 5.2. Wpływ temperatury na stadium jaja oraz na parametry stanu fizjologicznego wylęgniętych z tych jaj stadiów J2

Po zapłodnieniu samica *M. hapla* składa jaja do utworzonego w tylnej części jej ciała galaretowatego worka jajowego (Moens i in., 2009). Stadium jaja zamknięte w galaretowatym woreczku tworzącym złoże jajowe jest zdolne do przetrwania niesprzyjających warunków w glebie podczas okresu zimowego (Bleve-Zacheo i in., 2007; Wu i in., 2018). Jedno z wykonanych w niniejszej pracy doświadczeń dotyczyło badania wpływu temperatury na stadium jaja *M. hapla*. Stadium jaja było inkubowane w różnych temperaturach i czasie. Po tej ekspozycji dalszy rozwój stadium jaja przebiegał w temperaturze 20°C aż do wylęgu osobników stadium J2. Następnie u tych osobników były mierzone parametry stanu fizjologicznego (kondycji), czyli długość, szerokość i masa ciała. Przeprowadzone badania

wykazały zależność pomiędzy temperaturą i czasem inkubacji jaj a długością (Tab. 34Z, Ryc. 31), szerokością (Tab. 36Z, Ryc. 32) i masą ciała wylęgniętych z tych jaj osobników J2 (Tab. 38Z, Ryc. 33).

Porównanie otrzymanych w tej pracy wyników badań nie było możliwe ze wzgledu na brak doniesień o podobnych badaniach. Większość opisanych tam badań prowadzonych na stadium jaja u nicieni należacych do rodzaju *Meloidogyne* dotyczyła głównie wpływu różnych temperatur na tempo i przebieg embriogenezy. Badania wykazały, że wyższe temperatury znacznie skracały czas rozwoju embrionalnego u takich gatunków guzaków jak M. hapla, M. chitwoodi, M. fallax, M. incognita, M. javanica czy M. konaensis Eisenback, Bernard i Schmitt, 1995 (Bird, 1972; Vrain i Barker, 1978; Inserra i in., 1983; Zhang i Schmitt, 1995; Mahmud, 2014; Sumita i Das, 2016). Prowadzono liczne badania w celu określenia optymalnej temperatury dla rozwoju stadium jaja *M. hapla* do momentu wylegu osobników stadium J2. Wykazano, że jest to zakres temperatur od 20°C do 30°C (Bird i Wallace, 1965; Vrain i Barker, 1978; Inserra i in., 1983; Charchar i Santo, 2001). Wykonane w tej rozprawie badania wykazały, że największą długość ciała osiagneły osobniki J2 wylegnięte z jaj inkubowanych właśnie w temperaturze 30°C, a następnie w 20°C (Tab. 34Z, Ryc. 31). Natomiast największą szerokość ciała (Tab. 36Z, Ryc. 32) i masę ciała (Tab. 38Z, Ryc. 33) uzyskały osobniki J2 wylęgnięte z jaj inkubowanych w temperaturze 20°C. Wyznaczony w wyniku wielu badań optymalny zakres temperatur dla rozwoju stadium jaja M. hapla, mieszczący się w przedziale od 20°C do 30°C, jest również zakresem temperatur, w których wykazano (w tej rozprawie) najwyższe wartości badanych parametrów u osobników J2 wylegnietych z jaj inkubowanych właśnie w tych temperaturach. Można przypuszczać, że ten zakres temperatur jest również optymalny dla rozwoju jaj badanej w tej rozprawie krajowej populacji M. hapla.

Charchar i Santo (2001) w swoich badaniach wykazali, że w temperaturze 6°C nastąpiło zatrzymanie rozwoju embrionalnego stadium jaja *M. hapla*, który przebiegał tylko do stadium gastruli. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej rozprawie w temperaturze 5°C po 8 i 24 godzinach inkubacji zarówno długość, szerokość, jak i masa ciała wylęgniętych z jaj osobników J2 były jednymi z najniższych wartości, jakie odnotowano spośród pozostałych badanych temperatur. Jak wykazali Charchar i Santo (2001) temperatura 6°C hamuje rozwój embrionalny stadium jaja, co przypuszczalnie może też być przyczyną uzyskania niskich wartości parametrów stanu fizjologicznego u badanych w tej pracy osobników J2 wylęgniętych z jaj inkubowanych w 5°C.

101

W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach wykazano, że temperaturą działającą letalnie na stadium jaja *M. hapla* jest 40°C, ponieważ z jaj inkubowanych w tej temperaturze nie rozwinęły i nie wyległy się osobniki stadium J2. Daulton i Nusbaum (1961) w swoich badaniach wykazali, że temperatury 36°C i 40°C działały letalnie na stadium jaja *M. hapla*. Inne badania wykazały, że z jaj *M. hapla* inkubowanych przez 6 dni w temperaturze 35°C nie wylęgły się osobniki J2 (Bird i Wallace, 1965). W przeprowadzonych w tej rozprawie doświadczeniach temperatura 35°C również istotnie oddziaływała na badane parametry stanu fizjologicznego (kondycji). Najmniejsza długość ciała występowała u osobników J2 wylęgniętych z jaj inkubowanych w temperaturze 35°C bez względu na czas inkubacji (Tab. 34Z, Ryc. 31). Badając szerokość ciała wykazano najmniejszą wartość tego parametru także w temperaturze 35°C po 24 godzinach ekspozycji (Tab. 36Z, Ryc. 32). Jeśli chodzi o masę ciała, tutaj również najmniejsza jej wartość występowała u osobników J2 wylegnietych z jaj inkubowanych w temperaturze 35°C po 24 godzinach ekspozycji (Tab. 38Z, Ryc. 33). Z uwagi na powyżej opisane badania i te wykonane w niniejszej pracy można stwierdzić, że temperatury 5°C i 35°C, w których inkubowano stadium jaja, działały ograniczająco na wartości parametrów mierzonych u wylegniętych osobników J2 M. hapla.

#### 5.3. Wpływ temperatury na parametry stanu fizjologicznego osobników stadium J2

Wielkość ciała to jedna z najważniejszych cech wszystkich organizmów w świecie żywym. Jest ona wiarygodnym predyktorem ich fizjologicznych wskaźników i cech historii życia (Rao, 2021). Badanie długości ciała stadium J2 M. hapla, po uprzedniej inkubacji w różnym czasie i temperaturach (bez uwzględnienia temperatury jako zmiennej niezależnej), wykazało zależność, polegającą na tym, że wraz z wydłużaniem czasu inkubacji rośnie długość ciała tych nicieni (Tab. 40Z B; Ryc. 34B). Dowiedziono, że największą długość ciała  $(391.6 \pm 0.63 \ \mu\text{m})$  nicienie osiągneły po 1344 godzinach inkubacji, a najmniejsza  $(387.8 \pm$ 0,43 µm) po 1 godzinie. W dostępnej literaturze brak jest informacji o podobnych badaniach prowadzonych na stadium J2 M. hapla. Badano natomiast zależność długości ciała od czasu inkubacji (w stałej temperaturze 28°C) u osobników J2 M. incognita i M. exigua (Rocha i in., 2015; Shivakumara i in., 2018). U obu tych gatunków wykazano wzrost długości ciała, który był najbardziej widoczny po ostatnim, 10 dniu inkubacji w badaniach Shivakumara i in. (2018) i 12 dniu inkubacji nicieni w eksperymencie Rocha i in. (2015). Podobne wyniki badań otrzymano badając wpływ czasu inkubacji na długość ciała u modelowego organizmu bakteriożernego nicienia C. elegans (Filina i in., 2022). Zarówno w badaniach wykonanych w tej pracy jak i przytoczonych eksperymentach (Rocha i in., 2015; Shivakumara i in., 2018;
Filina i in., 2022), zauważalna była zależność, według której długość ciała osobników J2 rośnie wraz z wydłużaniem czasu inkubacji.

Kolejnym badanym w tej rozprawie czynnikiem, od którego zależna była długość ciała osobników stadium J2, to temperatura inkubacji. Wykazano, że największą długość ciała  $(390.2 \pm 0.43 \ \mu\text{m})$  nicienie osiągnęły w temperaturze 30°C, a najmniejszą  $(388.0 \pm 0.40 \ \mu\text{m})$ w temperaturze 5°C (Tab. 40Z A; Ryc. 34A). Badania dotyczące wpływu temperatury na cykl rozwojowy wykazały, że optymalną dla przebiegu cyklu rozwojowego M. hapla jest temperatura 30°C (Charchar i Santo, 2009). Właśnie w tej temperaturze maksymalną długość ciała osiągnęły badane w tej rozprawie stadia J2 M. hapla. Można więc stwierdzić, że temperaturą optymalną do wzrostu stadium J2 M. hapla w warunkach głodzenia jest temperatura 30°C. Najmniejszą średnią długość ciała u osobników J2 wykazano w temperaturze 5°C. Te temperature, na podstawie dostępnych badań, określono w tej pracy jako temperaturę stresową (stres zimna), ponieważ wpływa ona na zahamowanie badź upośledzenie cyklu rozwojowego M. hapla (Vrain i in., 1978; Vrain i Barker, 1978; Charchar i Santo, 2001; Charchar i Santo, 2009). Po inkubacji w temperaturach 35°C i 40°C obserwowano redukcję długości ciała w porównaniu do optymalnej długości ciała osiągniętej przez nicienie w temperaturze 30°C. Temperatury 35°C i wyższe wywołują stres gorąca u badanych organizmów i tak samo jak w przypadku temperatury 5°C powoduje zahamowanie cyklu rozwojowego M. hapla (Daulton i Nusbaum, 1961; Thomason i Lear, 1961; Kinloch i Allen, 1972). Osobniki stadium J2 inkubowane w temperaturach 35°C i 40°C miały jednak większą długość ciała w porównaniu do nicieni inkubowanych w temperaturze 5°C. Można więc stwierdzić, że spośród badanych temperatur stresowych na zahamowanie wzrostu ciała osobników J2 najbardziej oddziaływała temperatura 5°C.

Większość organizmów zmiennocieplnych rośnie wolniej w chłodniejszym środowisku, ale dojrzewając w tym środowisku osiąga większe rozmiary ciała. Taka prawidłowość nazywana jest regułą zależności wielkości ciała od temperatury otoczenia (TSR) (Atkinson, 1994; Angilletta i Dunham, 2003). Ponad 80% badanych gatunków zmiennocieplnych podlega regule TSR (Atkinson, 1994). Wiele badań dotyczących reguły TSR prowadzono na *C. elegans* (Van Voorhies, 1996; Gutteling i in., 2007; Kammenga i in., 2007; So i in., 2012; Cedergreen i in., 2016; Cradeur, 2019; Maulana i in., 2022), który jest jednym z najczęściej wykorzystywanych organizmów modelowych (Meneely i in., 2019). Osobniki *C. elegans* w stadium młodocianym hodowane w temperaturze 10°C rosły wolniej w porównaniu do tych hodowanych w temperaturze 25°C. Natomiast już dojrzałe osobniki *C. elegans*, wyhodowane w 10°C wykazywały o 33% większe rozmiary ciała w porównaniu z

nicieniami rosnącymi w 25°C (Van Voorhies, 1996). Interesujące badania dotyczące nicieni wolnożyjących, takich jak *Plectus acuminatus* Bastian, 1865, *P. aquatilis* Andrássy, 1985, *P. opisthocirculus* Andrássy, 1952, *Plectus* cf. *velox* Bastian, 1865 i *Acrobeloides nanus* (De Man, 1880) Anderson, 1968, również wykazały istotny wpływ temperatury na tempo ich wzrostu i wielkość ciała osobników dojrzałych. Tempo wzrostu tych organizmów, rozwijających się w temperaturach 10°C i 15°C, było niższe (za wyjątkiem *Plectus* cf. *velox*) niż w temperaturach 20°C i 25°C. Mimo wolniejszego wzrostu stadiów młodocianych w temperaturach niższych (10°C, 15°C) dojrzałe osobniki osiągały większą długość ciała w tych temperaturach (Majdi i in., 2019). Otrzymane w tej rozprawie wyniki są również zgodne z regułą TSR. Wykazano najmniejszą średnią długość ciała u osobników młodocianych w stadium J2 *M. hapla* inkubowanych w temperaturze 5°C, a największą w temperaturze 30°C (Tab. 40Z A; Ryc. 34A). Jednak nie można jednoznacznie stwierdzić, że ta reguła ma pełne zastosowanie dla *M. hapla*, ponieważ badania wykonane w tej pracy obejmują tylko jedno stadium rozwojowe, a reguła ta dotyczy wpływu temperatury na cały przebieg cyklu rozwojowego aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej.

Wykonując pomiary szerokości ciała głodzonego stadium J2 M. hapla w wyniku ekspozycji na różne temperatury i czas zaobserwowano zależność, polegającą na tym, że wraz ze wzrostem temperatury i wydłużaniem czasu inkubacji malała szerokość ciała osobników J2. Największą szerokość ciała ( $15,9 \pm 0,05 \mu m$ ) zmierzono u nicieni inkubowanych przez 1 godzinę w temperaturze 5°C oraz w pozostałych czasach inkubacji tej temperatury, a najmniejszą szerokość ciała (11,7  $\pm$  0,05 µm) obserwowano w dwóch temperaturach: 20°C po 1344 godzinach inkubacji i 30°C po 1008 godzinach inkubacji (Tab. 42Z; Ryc. 35). W dostępnej literaturze brak jest informacji o podobnych badaniach prowadzonych na stadium J2 M. hapla. Badano natomiast zależność szerokości ciała od czasu inkubacji u głodzonych osobników J2 M. incognita i M. exigua (Rocha i in., 2015; Shivakumara i in., 2018). W badaniach prowadzonych przez Rocha i in. (2015) wykazano największą redukcję szerokości ciała po ostatnim, 12 dniu inkubacji w 28°C u osobników J2 obu gatunków. Badania prowadzone przez Shivakumara i in. (2018) wykazały także największą redukcję szerokości ciała u stadium J2 M. incognita w ostatnim, 10 dniu inkubacji. Rozpatrując zależność szerokości ciała osobników J2 od temperatury w niniejszej pracy wykazano największą wartość tego parametru w 5°C, a najmniejszą w 20°C i 30°C, czyli odwrotnie niż w przypadku długości ciała. Doucet i in. (2001) wykazali w swoich badaniach, że największą szerokość ciała samice P. vulnus osiągnęły w najniższej badanej temperaturze  $16^{\circ}C$  (23,0 ± 1,57  $\mu$ m), a najmniejszą w temperaturze 21°C (21,0 ± 1,92  $\mu$ m) (Doucet i in., 2001).

Przytoczone wyniki eksperymentów są spójne z wynikami badań otrzymanych w niniejszej rozprawie i pozwalają stwierdzić, że szerokość ciała osobników stadium J2 *M. hapla* była zależna zarówno od wartości temperatury, jak i czasu inkubacji.

U wielu taksonów wielkość ciała jest skorelowana z masa ciała (Rao, 2021). W przeprowadzonych w tej pracy badaniach masa ciała osobników J2 M. hapla wyliczona została na podstawie zmodyfikowanego wzoru Andrássy'ego (1956). Wykazano, że wraz ze wzrostem temperatury i wydłużaniem czasu inkubacji masa ciała stadium J2 malała (Tab. 44Z; Ryc. 36). W dostępnej literaturze brak jest doniesień o analogicznych badaniach dotyczących zależności masy ciała stadium J2 M. hapla od temperatury i czasu inkubacji. Najbardziej zbliżone badania dotyczyły zależności wartości masy ciała osobników J2 M. incognita i M. exigua od czasu inkubacji, badanej w stałej temperaturze otoczenia (Rocha i in., 2015; Shivakumara i in., 2018). W pracy Rocha i in. (2015) wykazano brak zmian w masie ciała głodzonych osobników J2 M. incognita pomiędzy 0 (do 24 godzin od wylegu) a 12 dniem inkubacji. Zaobserwowano natomiast redukcję masy ciała osobników J2 M. exigua. Masa ciała tego gatunku na początku inkubacji (0 dzień) wynosiła 0,030 µg i spadła do 0,028 μg po 12 dniach głodzenia (Rocha i in., 2015). Badano także inną populację *M. incognita*, gdzie stadia J2 poddano głodzeniu i inkubowano przez 10 dni. Dowiedziono, że masa ciała osobników J2 spadła w wyniku inkubacji z 0,039 µg (0 dzień) do 0,036 µg po 10 dniach głodzenia (Shivakumara i in., 2018). Zarówno w badaniach wykonanych w tej rozprawie jak i opisanych powyżej, widoczna była ta sama zależność, zgodnie z którą wraz z wydłużaniem czasu inkubacji spada masa ciała głodzonych osobników J2. Istotne jest również to, że ta zależność dotyczy trzech różnych gatunków nicieni należących do tego samego rodzaju Meloidogyne.

Jedyne dostępne badania dotyczące oddziaływania temperatury na masę ciała *M. hapla* wykonali Bird i Wallace (1965). Wykazali zależność masy ciała od temperatury badając samice *M. hapla* i *M. javanica* hodowane na roślinach pomidora. Nicienie obu gatunków hodowano w trzech zakresach temperatur 15-20°C, 20-25°C i 25-30°C przez 28 dni. Zaobserwowano spowolniony rozwój oraz brak różnic w masie ciała samic obu gatunków hodowanych w temperaturze od 15 do 20°C. Masa ciała samic *M. hapla* rozwijających się na korzeniach pomidora w temperaturze od 20 do 25°C była dwukrotnie wyższa niż samic *M. javanica*. W przedziale temperaturowym 25-30°C po 14 dniach wzrostu na korzeniach pomidora stwierdzono intensywniejszy rozwój i wyższą masę ciała u samic *M. javanica* (Bird i Wallace, 1965; Evans i Perry, 2009). Widoczne są wyraźne rozbieżności wyników otrzymanych w niniejszej pracy w porównaniu do opisanego eksperymentu. Za rozbieżności

te może odpowiadać fakt, że w rozprawie badano wpływ temperatury na masę ciała osobników J2 bez obecności rośliny żywicielskiej a w doświadczeniu Bird i Wallace (1965) nicienie mogły się rozwijać do stadium dojrzałego na korzeniach pomidora. Jednakże przedstawione wyniki obu badań pozawalają stwierdzić, że masa ciała nicieni badanych w tych doświadczeniach zależna była od temperatury.

Badania opisujące zależność masy ciała od temperatury prowadzono także na nicieniach bakteriożernych takich jak A. nanus (Majdi i in., 2019) i C. elegans (Gutteling i in., 2007; Cradeur, 2019). U A. nanus badano wpływ temperatur 20°C, 25°C i 30°C na masę ciała wszystkich osobników w populacji i wykazano najwyższą masę ciała nicieni w temperaturze 20°C, a najniższą w 30°C (Majdi i in., 2019). Gutteling i in. (2007) badali wpływ temperatury 12°C i 24°C na mase ciała dojrzałego stadium C. elegans (szczep N2). Wykazali, że masa ciała jego stadium dojrzałego, rozwijającego się w temperaturze 12°C, była wyższa, niż masa ciała nicieni rozwijających się w temperaturze 24°C. Z kolei Cradeur (2019) badał oddziaływanie temperatur 16°C i 27°C na masę ciała i masę złożonych jaj przez cztery szczepy C. elegans. Obliczył całkowitą biomase jaj i osobników badanych szczepów, wykazując, że jest wyraźnie wyższa u nicieni hodowanych w temperaturze 16°C w porównaniu do zmierzonej całkowitej biomasy nicieni rozwijających się w temperaturze 27°C. Opisane powyżej badania są potwierdzeniem reguły TSR (Atkinson, 1994). Wspólnym mianownikiem łączącym wykonane w tej pracy badania (Tab. 44Z; Ryc. 36) z tymi przytoczonymi powyżej dotyczącymi C. elegans, jest wykazanie zależności masy ciała badanych nicieni od temperatury środowiska. Dokładniejsze porównania są niemożliwe ze względu na różnice w przebiegu wykonanych w tej rozprawie i opisanych eksperymentów.

W warunkach niedoboru składników odżywczych w organizmie dochodzi do aktywacji procesów metabolicznych, mających na celu pozyskanie energii ze zgromadzonych w organizmie zapasów (Lu i in., 2022). Zapasy energii magazynowane są w organizmie w postaci lipidów obojętnych, takich jak trójglicerydy i estry steroli, i przechowywane w wewnątrzkomórkowych organellach nazywanych kroplami lipidowymi. Organella te występują powszechnie u zwierząt, roślin, grzybów, a nawet bakterii (Welte i Gould, 2017). U nicieni należących do gatunków wolno żyjących, entomopatogenicznych i fitofagicznych, lipidy syntezowane są w trakcie dojrzewania embrionalnego i są stopniowo uwalniane podczas wyczerpywania się pokarmu (Shivakumara i in., 2018). Nicienie fitofagiczne z rodzaju *Meloidogyne* w stadium J2 występują poza rośliną żywicielską i nie odżywiają się, a energię pozyskują hydrolizując własne lipidy zgromadzone w organizmach (Lu i in., 2022).

106

W przeprowadzonych w tej pracy eksperymentach ilość lipidów w organizmach głodzonych stadiów J2 M. hapla, inkubowanych w różnych temperaturach i czasie, mierzona była jako powierzchnia wybarwionych lipidów (Andrássy, 1956) oraz jako masa lipidów (Rocha i in., 2015). Badając powierzchnię wybarwionych lipidów wykazano zależność polegającą na tym, że im wyższa temperatura i dłuższy czas inkubacji tym bardziej malała powierzchnia wybarwionych lipidów w ciałach stadium J2 (dotyczy to szczególnie czasu inkubacji 336, 1008 i 1344 godziny) (Tab. 46Z; Ryc. od 37 do 43). Brak jest analogicznych badań prowadzonych na stadium J2 M. hapla, opisujących zależność powierzchni wybarwionych lipidów od temperatury i czasu inkubacji. Podobne badania prowadzono na gatunkach M. chitwoodi i M. fallax, gdzie stadium J2 inkubowano w temperaturach 4°C, 10°C i 20°C przez 6 i 12 tygodni (Das i in., 2011). Po 6 tygodniach inkubacji największą powierzchnie wybarwionych lipidów wykazano u osobników obu gatunków inkubowanych w temperaturze 4°C, a najniższą w 20°C. Po 12 tygodniach inkubacji również największą powierzchnię wybarwionych lipidów posiadały osobniki J2 obu gatunków inkubowane w temperaturze 4°C a najniższa w 20°C (Das i in., 2011). Bardzo zbliżone do wykazanych przez Das i in. (2011) wyników otrzymano w niniejszej pracy – po 6 tygodniach inkubacji (1008 godzinach) największą powierzchnię lipidów obserwowano w najniższej badanej temperaturze 5°C ( $16,40 \pm 0,60$  %), a najmniejszą powierzchnię w najwyższej temperaturze 30°C (1,49 ± 1,80 %). Również po 8 tygodniach inkubacji (1344 godzinach) największa powierzchnia lipidów występowała u stadiów J2 M. hapla inkubowanych w temperaturze 5°C  $(11,02 \pm 0.92 \%)$ , a najmniejszą powierzchnię odnotowano w temperaturze 20°C  $(1,14 \pm 1.68)$ %). Wyraźne podobieństwo otrzymanych wyników badań przez Das i in. (2011) do wyników otrzymanych w tej pracy jest potwierdzeniem opisanej zależności, według której powierzchnia wybarwionych lipidów zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury i wydłużaniem czasu inkubacji stadium J2 M. hapla (Tab. 46Z; Ryc. od 37 do 43).

Prowadzono również podobne jak w tej rozprawie badania dotyczące zależności powierzchni wybarwionych lipidów od czasu inkubacji z zastosowaniem stałej temperatury podczas prowadzenia doświadczeń. Te badania prowadzono na trzech gatunkach guzaków: *M. incognita, M. exigua* i *M. javanica* (Campos i in., 2006; Rocha i in., 2010; Rocha i in., 2015; Shivakumara i in., 2018). U wszystkich trzech gatunków *Meloidogyne* wykazano zmniejszanie się powierzchni wybarwionych lipidów wraz z wydłużaniem czasu inkubacji badanych stadiów J2. Analogiczne badania prowadzono na dwóch gatunkach nicieni cystowych *G. pallida* i *G. rostochiensis*, w których również stwierdzono zmniejszanie się powierzchni wybarwionych lipidów wraz z wydłużeniem się czasu inkubacji osobników

stadium J2 (Robinson i in., 1987). Przytoczone wyniki badań są również zgodne z wynikami badań w tej pracy, w których także wykazano zmniejszanie się powierzchni wybarwionych lipidów wraz z wydłużaniem czasu inkubacji badanych stadiów J2 *M. hapla* (Tab. 46Z; Ryc. od 37 do 43).

Zależność powierzchni wybarwionych lipidów od różnych temperatur i czasów inkubacji badano także u nicieni entomopatogenicznych takich jak Heterorhabditis sp. CCA, Heterorhabditis sp. JPM4, Heterorhabditis sp. PI, Steinernema carpocapsae (Weiser, 1955) i Steinernema riobrave Cabanillas, Poinar i Raulston, 1994 (Andaló i in., 2011). Nicienie w stadium J1 były głodzone i inkubowane w temperaturach 8°C, 16°C, 20°C, 24°C i 28°C przez 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 i 180 dni. Badania wykazały, że u wszystkich gatunków w najniższej temperaturze (8°C) zmniejszanie się wybarwionej powierzchni lipidów następowało najwolniej. Po 180 dniach inkubacji w temperaturze 8°C powierzchnia wybarwionych lipidów była największa w porównaniu do pozostałych badanych temperatur. Również u wszystkich gatunków ale za to najszybciej powierzchnia wybarwionych lipidów, malała w temperaturze najwyższej 28°C, u niektórych gatunków osiągając nawet wartość 0,0 ± 0,0 już w 120 dniu inkubacji (Andaló i in., 2011). Wyniki badań otrzymane przez Andaló i in. (2011), mimo, że dotyczą nicieni entomopatogenicznych, są potwierdzeniem wykazanej w tej pracy zależności polegającej na tym, że powierzchnia wybarwionych lipidów malała wraz ze wzrostem temperatury i wydłużaniem czasu inkubacji stadium J2 M. hapla (Tab. 46Z; Ryc. od 37 do 43).

Oprócz wykonania pomiarów powierzchni wybarwionych lipidów wykonano w tej rozprawie dokumentację fotograficzną mierzonych osobników J2 *M. hapla* inkubowanych w różnych temperaturach i czasach (Ryc. od 38 do 43). Zarówno przeprowadzone obserwacje mikroskopowe, jak i analiza wykonanych fotografii, wykazały prawidłowość, według której powierzchnia wybarwionych lipidów najpierw malała w przedniej części ciała, tj. na początku jelita, aż do całkowitego jej zaniku w kierunku ogona. Takie same obserwacje wybarwionych powierzchni lipidów wykonano u osobników J2 *M. chitwoodi, M. fallax* i *M. javanica*, u których również wykazano stopniowe zanikanie powierzchni wybarwionych lipidów w kierunku od przedniej do tylnej części ciała badanych nicieni (Campos i in., 2006, Das i in., 2011).

W tej rozprawie badano także zależność pomiędzy powierzchnią wybarwionych lipidów a temperaturą i masą ciała stadium J2 *M. hapla*. Wykazano, że najmniejszą powierzchnię wybarwionych lipidów w każdym panelu dotyczącym masy ciała (oprócz panelu z masą ciała 0.03 µg) obserwowano w temperaturze 20°C (Tab. 47Z; Ryc. 44). Brak

jest podobnych badań umożliwiających porównanie uzyskanych wyników. Dostępne są jedynie badania, w których w stałej temperaturze, podczas 10- i 12-dniowej, inkubacji mierzono masę ciała i powierzchnię wybarwionych lipidów u stadium J2 *M. incognita* i *M. exigua* (Rocha i in., 2015; Shivakumara i in., 2018). U *M. exigua* (Rocha i in., 2015) i *M. incognita* (Shivakumara i in., 2018) obserwowano zarówno redukcję powierzchni lipidów, jak i masy ciała stadium J2 pomiędzy 0 a 10 i 12 dniem inkubacji. Ze względu na inny przebieg doświadczenia, np. brak zmiennej niezależnej, jaką jest temperatura, nie było możliwe porównanie otrzymanych w tej pracy wyników z wynikami opisanych powyżej badań.

Masa lipidów u osobników J2 *M. hapla* liczona była na podstawie powierzchni wybarwionych lipidów oraz długości i szerokości ciała poszczególnych nicieni inkubowanych w różnych temperaturach i czasie (Rocha i in., 2015). Badania wykazały redukcję masy lipidów, która następowała wraz ze wzrostem temperatury i wydłużaniem czasu inkubacji stadium J2 (Tab. 49Z; Ryc. 45). W dostępnej literaturze nie znaleziono analogicznych badań stadium J2 *M. hapla* dotyczących zależności masy lipidów od temperatury i czasu inkubacji. Podobne badania dotyczyły jedynie zależności masy lipidów od czasu inkubacji u głodzonych osobników J2 *M. incognita* i *M. exigua* (Rocha i in., 2015; Shivakumara i in., 2018). U dwóch różnych populacji *M. incognita* wykazano redukcję masy lipidów wraz z wydłużaniem czasu inkubacji od 0 do 10 i 12 dnia (Rocha i in., 2015; Shivakumara i in., 2018). Takie same wyniki badań otrzymano dla *M. exigua*, gdzie również obserwowano redukcję masy lipidów między 0 a 12 dniem inkubacji (Rocha i in., 2015). Zarówno w tej rozprawie, jak i przedstawionych powyżej badaniach widoczna była zależność, według której wraz z wydłużaniem czasu inkubacji maleje masa lipidów u osobników J2 należących do trzech gatunków guzaków.

## 5.4. Wpływ temperatury na aktywność ruchową osobników stadium J2

Przed wniknięciem do korzeni rośliny żywicielskiej osobniki stadium J2 *Meloidogyne* migrują w przestrzeniach między cząstkami gleby, gdzie podlegają zmiennym warunkom środowiska (Wallace, 1968; Prot, 1980). Temperatura jest jednym z głównych czynników abiotycznych środowiska wpływających na aktywność ruchową stadium J2 *Meloidogyne* (Wallace, 1966; Prot i Van Gundy, 1981). W literaturze istnieje wiele badań dotyczących aktywności ruchowej gatunków należących do rodzaju *Meloidogyne*, takich jak *M. chitwoodi* (Pinkerton i in., 1987; Khan i in., 2014), *M. fallax* (Khan i in., 2014), *M. incognita* (Prot i Van Gundy, 1981; Tsai, 2008; Boroş i in., 2018), *M. javanica* (Bird i Wallace, 1965; Boroş i in., 2018), *M. floridensis* Handoo et al. 2004 (Leitão i in., 2021) czy *M. minor* Karssen et al. 2004

(Morris i in., 2011). Badania aktywności ruchowej wykonywane były zwykle na dwóch lub więcej gatunkach w celu porównania ich aktywności ruchowej w tych samych temperaturach (Bird i Wallace, 1965; Prot i Van Gundy, 1981; Khan i in., 2014; Boroș i in., 2018). W tym celu do badań używano gatunków występujących powszechnie w regionach subtropikalnych lub tropikalnych, takich jak *M. javanica czy M. incognita*, w zestawieniu na przykład z występującym w strefie klimatu umiarkowanego *M. hapla*. Ogólne wnioski z obserwacji tych gatunków dowodzą, że optimum aktywności ruchowej guzaków, pochodzących z cieplejszej strefy klimatycznej, zachodzi w temperaturze wyższej, niż optimum aktywności ruchowej występującego w klimacie umiarkowanym guzaka północnego (Bird i Wallace, 1965; Prot i Van Gundy, 1981; Boroș i in., 2018).

Jedno z przeprowadzonych w niniejszej rozprawie doświadczeń dotyczyło określenia aktywności ruchowej osobników stadium J2 M. hapla w wyniku działania różnych temperatur i czasów inkubacji. W wykonanym doświadczeniu w temperaturze 40°C już po pierwszej godzinie inkubacji wykazano brak aktywności ruchowej stadium J2 M. hapla. Zaistniały paraliż obserwowano również w badaniach dotyczących *M. incognita*, gdzie osobniki stadium J2 poddano inkubacji w temperaturze 40°C (Tsai, 2008). Wykonane badania w tej rozprawie wykazały najmniejszą aktywność ruchową osobników J2 w temperaturach 5°C i 35°C, a największą w 20°C oraz w 30°C, w zależności od czasu inkubacji (Tab. 51Z; Ryc. 46). Obserwacje aktywności ruchowej stadium J2 M. hapla zostały również opisane w literaturze, ale wykonano je innymi metodami niż te, które zastosowano w niniejszej pracy (Bird i Wallace, 1965; Belder i Jansen, 1994: Boros i in., 2018). Bird i Wallace (1965) przeprowadzili badania aktywności ruchowej stadium J2 M. hapla inkubując w tym celu osobniki w stadium J2 przez 20 godzin w temperaturach 15°C, 20°C, 25°C, 30°C i 35°C. Wyniki, jakie otrzymali, były podobne do obserwacji w tej rozprawie: największą aktywność ruchowa osobniki J2 wykazywały w temperaturze 20°C, a najmniejszą w 35°C. Boros i in. (2018) także badali wpływ temperatur 4°C, 10°C i 20°C na aktywność ruchową stadium J2 M. hapla po 2, 4, 6, 8, 10 i 12 tygodniach inkubacji. Mimo okresów inkubacji stadium J2 znacznie dłuższych niż te zastosowane w niniejszej rozprawie, wyniki jakie otrzymali, są zbieżne z obserwacjami opisanymi w tym doktoracie. Boros i in. (2018) wykazali, że najmniejsza aktywność ruchowa osobników J2 M. hapla występowała w temperaturze 4°C, następnie w 10°C, a najwyższa w 20°C. Belder i Jansen (1994) także badali aktywność ruchową osobników J2 M. hapla inkubowanych w temperaturach 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C i 35°C. Ich obserwacje wskazują, że największą aktywność ruchową osobniki stadium J2 wykazywały w temperaturze 25°C, następnie w temperaturze 20°C i 30°C, a

najmniejszą w temperaturze 5°C. Badania przeprowadzone przez Belder i Jansen (1994) również są spójne z wynikami badań otrzymanymi w tej pracy.

Zarówno wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy, jak i te przedstawione powyżej pozwalają stwierdzić, że aktywność ruchowa stadium J2 *M. hapla* jest zależna od temperatury środowiska. Najniższa aktywność ruchowa stadium J2 *M. hapla* występuje w temperaturach stresowych 5°C i 35°C, a maksymalna w temperaturach 20°C i 30°C (Tab. 51Z; Ryc. 46).

#### 5.5. Podsumowanie dyskusji

Przeprowadzone w niniejszej rozprawie badania dotyczyły wpływu różnych temperatur i czasów inkubacji na stadium jaja i stadium J2 M. hapla. Obydwa stadia rozwojowe inkubowano w temperaturach 5°C, 10°C, 20°C, 30°C, 35°C i 40°C w czasie: 1, 2, 8 i 24 godziny. Stadium J2 inkubowano dodatkowo przez 336, 1008 i 1344 godziny. Na podstawie badań dostępnych w literaturze wyznaczono temperatury stresowe 5°C – tzw. stres zimna (Vrain i Barker, 1978; Charchar i Santo, 2001), 35°C i 40°C – tzw. stres goraca (Thomason i Lear, 1961; Kinloch i Allen, 1972), a także temperatury niestresowe. Temperatury niestresowe to temperatury od 10°C do 30°C, w których rozwój M. hapla przebiega normalnie, ale w różnym tempie (Thomason i Lear, 1961; Inserra i in., 1983). Wyznaczono również temperaturę kontrolną 20°C dla wszystkich doświadczeń, uważaną za optymalną dla rozwoju M. hapla (Bird i Wallace, 1965; Kinloch i Allen, 1972). Zaprojektowane badania miały na celu sprawdzenie oddziaływania temperatur stresowych i niestresowych na oba stadia rozwojowe *M. hapla*. Wykonane badania można podzielić na dwie części. Pierwsza cześć badań prowadzona była na poziomie molekularnym i dotyczyła określenia zmian ekspresji wybranych genów hsp w stadium jaja i stadium J2 na działanie ww. temperatur i czasów inkubacji. W drugiej części badano fizjologiczną odpowiedź obydwu stadiów rozwojowych na te same temperatury i czas inkubacji. W tym celu wyznaczone zostały parametry kondycji (stanu fizjologicznego), takie jak długość, szerokość i masa ciała, masa lipidów i powierzchnia wybarwionych lipidów. Badana była także aktywność ruchowa osobników w stadium J2.

Zarówno z wykonanych w tej pracy badań, jak i tych dostępnych w literaturze, wynika, że temperatura wpływa na wszystkie poziomy organizacji biologicznej organizmu *M. hapla.* Wraz ze wzrostem temperatury wyższa energia kinetyczna reakcji biochemicznych przyspiesza tempo procesów metabolicznych, a niska temperatura spowalnia te procesy, wpływając na fizjologię i zachowanie poszczególnych organizmów (Johnston i Dunn, 1987;

111

Angilletta, 2009). W konsekwencji wzrost i rozwój organizmów napędzane są przez metabolizm (Zuo i in., 2012). Takie procesy metaboliczne zachodziły także w badanych w tej rozprawie stadiach rozwojowych *M. hapla*. Badania dowodzą, że do rozległej denaturacji białek dochodzi nawet przy łagodnym szoku gorąca już w temperaturze 37°C, a denaturacja istotnych dla funkcjonowania komórki białek może doprowadzić do jej śmierci (Lepock i in., 1993). W badaniach w tej pracy inkubacji w temperaturze stresowej 40°C nie przeżyło stadium jaja, a stadium J2 nie przeżyło w temperaturze 35°C i 40°C. Przyczyną tego mogła być denaturacja białek (enzymów) istotnych dla przeżycia tych organizmów, a tym samym nieodwracalne upośledzenie procesów metabolicznych prowadzących do śmierci całego organizmu lub zaburzenia integracji czynności błon komórkowych (Lepock i in., 1993; Schmidt-Nielsen, 2008).

"Z pomoca" zdenaturowanym enzymom przychodza białka szoku termicznego, które uczestniczą w ponownym fałdowaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek, przywracając im natywną strukturę i przyczyniając się w ten sposób do utrzymania homeostazy komórki (Shan i in., 2020). W tej rozprawie na podstawie sekwencji genów szoku termicznego C. elegans zidentyfikowano ortologi tych genów w genomie *M. hapla* (Tab. 7). Do badań wybrano geny szoku termicznego Mh-hsp90 (rodzina białek Hsp90), Mh-hsp1, Mh-hsp4, Mh-hsp6 (rodzina białek Hsp70), Mh-hsp60 (rodzina białek Hsp60), Mh-dnj19 (rodzina białek Hsp40), Mhhsp43 i Mh-hsp12.2 (rodzina małych białek sHsps) należące do różnych rodzin białek Hsp oraz najczęściej badane u C. elegans. W obu badanych stadiach rozwojowych wykazano wzrost ekspresji wszystkich genów hsp w wyniku działania stresu gorąca, za wyjątkiem genu Mh-hsp12.2 w stadium J2. Na działanie stresu zimna nie odnotowano reakcji genów Mhhsp90, Mh-hsp4 i Mh-hsp6 u obu stadiów M. hapla (Tab. 25). Porównanie badań wykonanych w niniejszej rozprawie z tymi dostępnymi w literaturze potwierdziło prawidłowość otrzymanych w tej pracy wyników dotyczących ekspresji badanych genów hsp w wyniku działania temperatur stresowych (patrz rozdział 5.1. Profilowanie ekspresji wybranych genów hsp).

Spośród wszystkich badanych genów *hsp* najwyższy wzrost ekspresji wywołany stresem gorąca i zimna obserwowano w stadium J2 w genie *Mh-hsp*1 (Tab. 20Z, Ryc. 24), natomiast tylko stresem gorąca – w genie *Mh-hsp*90 (Tab. 18Z, Ryc. 23). Kodowane przez te geny białka Hsp90 i Hsp70 są głównymi białkami opiekuńczymi w cytosolu komórek eukariotycznych. Biorą one istotny udział w kontroli jakości białek poprzez zapobieganie ich agregacji, katalizowaniu fałdowania nowo syntezowanych białek i promowaniu degradacji białek zdenaturowanych (Itoh i Tashima, 1991; Kubota, 2009; Hartl i in., 2011).

Obserwowany, w tej rozprawie, bardzo wysoki wzrost ekspresji tych genów, potwierdza ich ochronną funkcję w organizmie stadium J2 *M. hapla*, na działanie stresu termicznego. Nie tylko badania w tej rozprawie, lecz także inne badania dotyczące trzech gatunków *Meloidogyne M. artiellia, M. incognita* i *M. hapla*, wykazały, że zmiany w środowisku tych nicieni powodowały również zmiany w ekspresji genu *hsp*90. Znaczący wzrost ekspresji tego genu zaobserwowano podczas działania stresu termicznego (stres gorąca i zimna), stresu wywołanego metalami ciężkimi i związkami nieorganicznymi (De Luca i in., 2009; Bai i in., 2014; Wu i in., 2019; Dobosz i in., 2023). Wyraźny wzrost ekspresji genu *hsp*90 w wyniku działania różnych stresorów środowiskowych sugeruje, że gen ten może być wykorzystany jako potencjalny bioindykator wpływu środowiska na organizm nicieni z rodzaju *Meloidogyne* (Bai i in., 2014; Dobosz i in., 2023).

Spośród badanych genów Mh-hsp1, Mh-hsp4 i Mh-hsp6 kodujących białka należące do rodzinny Hsp70 (Heschl i Baillie, 1990), największy i utrzymujący się stale na wysokim poziomie wzrost ekspresji obserwowano w genie Mh-hsp1 w stadium J2 na działanie stresu goraca i zimna (Tab. 20Z, Ryc. 24). Badania wykazały, że to właśnie białka Hsp70 odgrywaja decydującą rolę w nabywaniu termotolerancji, czyli odporności komórki na działanie wysokiej, często letalnej temperatury. Trwale odporne komórki na stres termiczny wykazują stały wysoki poziom białek Hsp (Cymerys i Niemiałtowski, 2004). Ponadto stwierdzono, że u C. elegans ilość transkryptów genu hsp70A (synonim hsp1(Zhang i in., 2013)) wzrasta kilkukrotnie w odpowiedzi na szok termiczny i jest przede wszystkim odpowiedzialna za zwiększoną termotolerancję tego organizmu (Snutch i in., 1988). Prawdopodobnie także u M. hapla gen Mh-hsp1 jest odpowiedzialny za nabywanie termotolerancji w organizmie badanego stadium J2. Z drugiej strony badania dotyczące genu Mh-hsp1 u M. hapla wykazały wzrost ekspresji tego genu w wyniku działania dyfuzatu z nasion Vicia sativa L. (Dobosz i in., 2023). Badania nad tym genem u C. elegans dowiodły także jego istotnego udziału we wczesnym rozwoju stadium młodocianego oraz regulacji długości życia tego nicienia (Morley i Morimoto, 2004; Craig, 2018; Papsdorf i in., 2019). Wykazano także, że nadekspresja hspl prowadzi do upośledzenia aktywności ruchowej C. elegans (Papsdorf i in., 2014). Dlatego też Bai i in. (2014) oraz Dobosz i in. (2023) stwierdzili, że białko Hsp90 jako potencjalny bioindykator powinno być stosowane jednocześnie z Hsp70, aby pełniej odzwierciedlać wpływ środowiska na organizm guzaków.

Badania nad genem *Mh-hsp*4 wykazały wzrost ekspresji tego genu wskutek działania stresu gorąca w obu stadiach rozwojowych *M. hapla* (Tab. 6Z, Ryc. 17; Tab. 22Z, Ryc. 25). Oprócz aktywacji w wyniku szoku termicznego, gen *hsp*4 reguluje szlak odpowiedzi na stres,

aktywowany przez zwiększone nieprawidłowo sfałdowane lub niesfałdowane białka w retikulum endoplazmatycznym, co stanowi tzw. odpowiedź na białka niesfałdowane w retikulum endoplazmatycznym (*endoplasmic reticulum unfolded protein response*, ER-UPR) (Dues i in., 2016). Wzrost ekspresji genu *hsp*4 obserwowano u *C. elegans* na działanie różnych substancji chemicznych, w tym substancji toksycznych, antybiotyków czy ekstraktów roślinnych (Ray i in., 2015; Ito i in., 2021; Joshi i in., 2021; Soo i in., 2021; Khan i in., 2023). Wyciszenie tego genu u *C. elegans* spowodowało upośledzenie hydrolizy lipidów podczas głodzenia, czego efektem było obniżenie aktywności ruchowej i przeżywalności tych nicieni. Wynika z tego, że gen *hsp*4 jest niezbędny w przebiegu hydrolizy lipidów podczas głodzenia *C. elegans*, co oddziałuje na aktywność ruchową i długość życia tych organizmów (Jo i in., 2009).

W wyniku działania stresu gorąca obserwowano także wzrost ekspresji genu *Mh-hsp6* u obu badanych stadiów *M. hapla* (Tab. 8Z, Ryc. 18; Tab. 24Z, Ryc. 26). Ekspresja tego genu zachodzi w mitochondriach nie tylko na działanie stresu gorąca, ale również konstytutywnie (Heschl i Baillie, 1990). Wraz z *hsp*60 gen ten bierze udział w regulacji szlaku mitochondrialnej odpowiedzi na niesfałdowane białka (mitoUPR) (Yoneda i in., 2004; Dues i in., 2016; Jeong i in., 2017). Wzrost ekspresji genu *hsp6* u *C. elegans* obserwowano wskutek działania herbicydu, antybiotyków, światła białego, ekstraktów roślinnych, czy obecności bakterii (Liu i in., 2014; De Magalhaes Filho i in., 2018; Soo i in., 2021; Khan i in., 2023). Wyciszenie tego genu (RNAi) u *C. elegans* powodowało zwiększoną śmiertelność zarodków, zatrzymanie rozwoju stadium młodocianego i bezpłodność u tych nicieni (Kamath i in., 2003; Simmer i in., 2003). U dojrzałych osobników *C. elegans* zaś wyciszenie genu *hsp6* powodowało obniżenie aktywności ruchowej i redukcję długości życia (Kimura i in., 2007). Badania dowiodły również, że wyciszenie genu *hsp6* miało wpływ na syntezę i skład lipidów w organizmie *C. elegans* (Kim i in., 2016).

Badana u obu stadiów *M. hapla* ekspresja genu *Mh-hsp*60 rosła w wyniku działania stresu gorąca w stadium jaja i stadium J2 oraz stresu zimna tylko w stadium jaja (Tab. 10Z, Ryc. 19; Tab. 26Z, Ryc. 27). Białka Hsp60 i Hsp70 są uważane za podstawowe białka opiekuńcze w komórce. Rola opiekuńcza tego białka polega m.in. na regulacji procesów takich jak termotolerancja, apoptoza, odpowiedź immunologiczna, czy rozwój embrionalny (Malik i Lone, 2021). Hsp60 występuje głównie w mitochondriach, natomiast niewielka jego frakcja znajdowana jest w cytosolu i na powierzchni komórki (Choi i in., 2015). Wykazano także obecność tego białka w kroplach lipidowych u *C. elegans* (Zhang i in., 2012). Wzrost ekspresji genu *hsp*60 u *C. elegans* obserwowano w reakcji na działanie światła białego,

ekstraktów roślinnych, czy obecności miedzi w środowisku (Luo i in., 2011; De Magalhaes Filho i in., 2018; Govindan i in., 2018). Badania wykazały, że wyciszenie genu *hsp*60 istotnie zmniejszało przeżywalność *C. elegans* w warunkach stresu gorąca (37°C) oraz powodowało paraliż tych nicieni (Fitzenberger, 2012; Regitz i in., 2014).

Badania dotyczące genu *Mh-dnj*19 wykazały wzrost ekspresji tego genu u obu badanych stadiów *M. hapla* na działanie stresu gorąca oraz stresu zimna (Tab. 12Z, Ryc. 20; Tab. 28Z, Ryc. 28). Ekspresja genu *dnj*19 u *C. elegans* rosła w wyniku ekspozycji na skrajne temperatury oraz dehydratację (Mulvihill, 2014; Hughes i in., 2019). Gen *dnj*19 koduje białko należące do rodziny Hsp40 (Schmauder i in., 2021). Białko to powiązane jest z regulacją aktywności ruchowej *C. elegans*, a także z utrzymaniem homeostazy białek cytoplazmatycznych oraz struktury i integralności mitochondriów (Munoz-Lobato i in., 2014; Takayanagi-Kiya i Jin, 2016). Wyciszenie m.in. genu *dnj*19 (RNAi) wpływało na aktywność ruchową *C. elegans* po potraktowaniu tych organizmów kwasem kynureninowym (Joshi i in., 2021).

Ostatnimi badanymi genami hsp były geny Mh-hsp43 i Mh-hsp12.2. Gen Mh-hsp43 wykazał wzrost ekspresji w stadium jaja M. hapla w odpowiedzi na działanie stresu gorąca, a w stadium J2 na stres goraça oraz zimna (Tab. 14Z, Ryc. 21; Tab. 30Z, Ryc. 29). Badanie genu Mh-hsp12.2 w stadium jaja wykazało wzrost jego ekspresji w wyniku działania stresu gorąca i stresu zimna, a w stadium J2 – stresu zimna (Tab. 16Z, Ryc. 22; Tab. 32Z, Ryc. 30). Oba geny kodują białka należące do grupy tzw. małych białek szoku termicznego (sHsps) (Fu i in., 2020). Białka sHsps ulegają ekspresji w wielu typach tkanek większości organizmów w odpowiedzi na różne stresory, w tym stres cieplny, chemiczny i fizjologiczny. Indukcja sHsps jest niezbędnym endogennym mechanizmem ochronnym, zwiększającym stabilność komórek i rozwijającym termotolerancję w warunkach stresu termicznego. Biorą one udział w utrzymaniu homeostazy komórkowej poprzez promowanie przeżycia komórek i zapobieganie procesom apoptozy w różnych typach komórek (Shehata i in., 2020). U M. hapla wykazano także wzrost ekspresji genu Mh-hsp43 na dyfuzat z nasion Vicia sativa L. (Dobosz i in., 2023). U C. elegans ekspresję genu hsp43 obserwowano we wszystkich stadiach rozwojowych (Ding i Candido, 2000). Ekspresja tego genu u C. elegans rosła w wyniku dehydratacji (Mulvihill, 2014). Białko Hsp43 ulega ekspresji w hipodermie C. elegans i pełni istotną funkcję w odporności tego nicienia na stres cieplny (Liu i in., 2018; Fu i in., 2020). Wykazano, że Hsp43 u C. elegans jest niezbędne do funkcjonowania komórek, a wyciszenie jego ekspresji u dorosłych osobników zmniejszało ich przeżywalność (Koyuncu i in., 2021). Białko kodowane przez gen hsp12.2 należy do najmniejszych opisanych sHsps. Najwyższą

konstytutywną ekspresję tych białek wykazano w stadium L1 oraz w sromie i spermatece u dorosłych *C. elegans* (Fleckenstein, 2014). Badania dowiodły, że białko Hsp12.2 wykazuje aktywność katalityczną w dojrzałym stadium *C. elegans*, natomiast w stadiach od L1 do stadium dojrzałego bierze udział w procesach metabolicznych, procesach układu odpornościowego, czy odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce (Zaidi, 2016). Ekspresja tego białka nie rosła w wyniku działania stresu oksydacyjnego, stresu osmotycznego oraz stresu związanego z metalami ciężkimi (Krause, 2013).

Ekspresja genów hsp mierzona w tych samych warunkach temperatury i czasu inkubacji różniła się między badanymi stadiami rozwojowymi M. hapla. W prawie wszystkich genach hsp (za wyjątkiem genów Mh-hsp43 i Mh-hsp12.2) obserwowano zawsze wyższy poziom ekspresji w stadium J2 w porównaniu do ekspresji tych genów w stadium jaja. Również badania przeprowadzone przez De Luca i in. (2009) wykazały różnice w ekspresji genu Mt-hsp90 między stadium jaja i stadium J2 M. artiellia w wyniku działania temperatur 5°C i 30°C. Badana w temperaturze 5°C ekspresja genu Mt-hsp90 była wyższa w stadium jaja w porównaniu do ekspresji tego genu w stadium J2. Natomiast ekspresja tego genu w temperaturze 30°C była wyższa w stadium J2, niż w stadium jaja (De Luca i in., 2009). Badania dotyczące innego gatunku guzaka M. incognita wykazały, że w warunkach niestresowych konstytutywna ekspresja genu hsp90 była wyższa w stadium jaja, niż w stadium J2 (Lourenço-Tessutti i in., 2015). Również badania genów daf21 (hsp90) i hsp12.2 u C. elegans wykazały zróżnicowaną konstytutywną jego ekspresję w każdym z badanych stadiów rozwojowych tego nicienia (Krause, 2013). Być może w badanych w tej rozprawie stadiach rozwojowych także występują różnice w konstytutywnej ekspresji genów hsp, a inkubacja obu stadiów w temperaturach stresowych pogłębia te różnice. Kolejną przyczyną niższej ekspresji genów hsp w stadium jaja M. hapla może być to, że jest ono mniej wrażliwe na abiotyczne czynniki środowiska, w tym stres goraca i zimna. Vrain i in. (1978) wykazali, że stadium jaja oraz rozwijające się wewnątrz jaja stadium J1, są mniej wrażliwe na działanie niskich temperatur, niż stadium J2. Osłona jajowa składająca się z trzech warstw zewnętrznej otoczki witeliny, środkowej chityny i wewnętrznej warstwy lipidowej (Curtis i in., 2009) – prawdopodobnie tworzy izolacyjną barierę ochronną nie tylko fizyczną, ale także termiczną. Ponadto jaja składne są przez samicę do galaretowatego woreczka, tworząc tzw. złoże jajowe. Ta galaretowata masa utrzymuje jaja razem i chroni je przed ekstremalnymi warunkami środowiska, w tym także przed ekstremalnymi temperaturami (Sharon i Spiegel, 1993).

W wykonanych w tej rozprawie badaniach najwyższa ekspresja badanych genów *hsp* obserwowana była najczęściej po 1, 2, 8 i 24 godzinach inkubacji w temperaturze stresowej. Następnie obserwowana była tendencja spadkowa ekspresji badanych genów wraz z wydłużaniem czasu inkubacji, co dotyczy bardziej stadium J2, inkubowanego o wiele dłużej, bo przez 1344 godziny (8 tygodni). Badania przeprowadzone na *C. elegans* dowiodły również, że poziom ekspresji genów *dnj*12, *dnj*19 i *dnj*13 po działaniu stresu gorąca u osobników 10-dniowych był już znacznie niższy niż u nicieni 4-dniowych (Kirstein i in., 2017). Także u 1-dniowych dojrzałych *C. elegans* ekspresja genów *hsp*70, *hsp*16.2 i *hsp*16.11 na działanie stresu gorąca była znacznie wyższa, niż ekspresja badana w 4 i 7 dniu (Ben-Zvi i in., 2009). Przyczyną spadku ekspresji badanych genów mogą być uszkodzenia białek związane ze starzeniem się komórek u badanego stadium J2 *M. hapla*, ponieważ u *C. elegans* zaobserwowano w wyniku starzenia tego organizmu nieprawidłowe fałdowanie i utratę funkcji różnych białek wrażliwych na temperaturę (Ben-Zvi i in., 2009).

Podczas prowadzenia wszystkich badań stadia J2 były głodzone, a energię do utrzymania procesów metabolicznych czerpały z lipidów zgromadzonych podczas rozwoju embrionalnego (Rocha i in., 2015; Lu i in., 2022). Badania w tej rozprawie wykazały tendencję spadkową – zarówno masy lipidów (Tab. 49Z; Ryc. 45), jak i powierzchni wybarwionych lipidów w stadium J2 (Tab. 46Z; Ryc. 37) – wraz ze wzrostem temperatury i wydłużaniem czasu jego inkubacji. Prawdopodobnie wraz ze wzrostem temperatury rosło tempo metabolizmu lipidów, ponieważ zwiększało się zapotrzebowanie na zgromadzoną w nich energię (Schulte, 2015; Yoon i in., 2022). To wyjaśnia fakt, że najwolniej ilość lipidów malała w temperaturze 5°C, w której tempo metabolizmu było prawdopodobnie znacznie niższe, niż w temperaturach 35°C i 40°C, gdzie obserwowano najszybszą redukcję ilości lipidów. Również według badań dostępnych w literaturze organizmy, w tym nicienie inkubowane w niskiej temperaturze, posiadają więcej zgromadzonych lipidów, niż te trzymane w wysokiej temperaturze (Andaló i in., 2011; Das i in., 2011; Lee i in., 2019; Zeis i in., 2019).

Wielkość ciała stadium J2 w badaniach wykonanych w tej rozprawie definiowana była za pomocą wymiarów długości i szerokości ciała. Na podstawie długości i szerokości ciała wyliczona została masa ciała stadium J2 (Andrássy,1956). Wielkość ciała u wielu taksonów jest skorelowana z masą ciała (Rao, 2021), dlatego też wszystkie te parametry stanu fizjologicznego omówiono razem. Badania wykazały, że długość ciała stadium J2 *M. hapla* rosła wraz z upływem czasu inkubacji (Tab. 40Z B; Ryc. 34B), osiągając najwyższą wartość w temperaturze 30°C a najniższą w 5°C (Tab. 40Z A; Ryc. 34A). Jednocześnie szerokość

ciała (Tab. 42Z; Ryc. 35) oraz masa ciała (Tab. 44Z; Ryc. 36) stadium J2 zmniejszały się wraz z upływem czasu i wzrostem temperatury inkubacji. Redukcja masy i zmniejszanie się szerokości ciała u głodzonych stadiów J2 mogą mieć związek z utratą lipidów, ponieważ wykazano w tej pracy redukcje ilości lipidów wraz ze wzrostem temperatury i wydłużeniem się czasu inkubacji. Być może podczas wzrostu długości ciała osobniki J2 traciły masę w wyniku zużywania lipidów, co skutkowało spadkiem ich masy i zmniejszeniem szerokości ciała tych nicieni. Jest to tym bardziej prawdopodobne, że całkowita zawartość lipidów w ciele m.in. nicieni pasożytów roślin może stanowić nawet 67% suchej masy tych organizmów (Wright i Perry, 2006). Dlatego też redukcja ilości lipidów mogła w znacznym stopniu obniżyć masę ciała badanych osobników J2. Dostępne badania wykazały także, że wzrost i rozwój organizmu napędzane są przez metabolizm. W tolerowanym przez organizm zmiennocieplny zakresie temperatur tempo metabolizmu wzrasta w przybliżeniu wykładniczo wraz ze wzrostem temperatury (Zuo i in., 2012), a spadek temperatury powoduje obniżenie poziomu metabolizmu u tych organizmów (Glazier, 2018). Wpływ temperatury na wielkość ciała wyjaśnia już wcześniej wspomniana i omówiona reguła zależności wielkości ciała od temperatury otoczenia (TSR) zgodnie, z którą organizmy zmiennocieplne zwykle rosną wolniej w chłodniejszym środowisku, ale dojrzewając osiągają większe rozmiary ciała (Atkinson, 1994; Angilletta i in., 2004; Forster i in., 2011). Również przeprowadzone w tej rozprawie badaniach potwierdzają regułę TSR. Prawdopodobnie niska stresowa temperatura 5°C spowodowała obniżenie tempa procesów metabolicznych, które wpłynęły na zahamowanie przyrostu osobników J2 na długość, natomiast wzrost tempa tych procesów w niestresowej temperaturze 30°C skutkował osiągnięciem maksymalnej długości ciała u tych nicieni (Tab. 40Z A; Ryc. 34A). Jednak, jak już wcześniej wspomniano, reguła TSR w przeprowadzonych w tej pracy badaniach ma tylko częściowe zastosowanie, ponieważ dotyczyły one tylko jednego stadium rozwojowego.

Podwyższone temperatury są często związane z wyższą aktywnością metaboliczną oraz z szybkim wzrostem i rozwojem organizmów zmiennocieplnych (Clarke, 2006; Angilletta, 2009). Także cechy behawioralne takie jak poruszanie się są zależne od temperatury (Pétavy i in., 2001; Fischer i Karl, 2010). W wynikach badań w tej rozprawie widoczna była także zależność aktywności ruchowej od temperatury. Wykazano, że aktywność ruchowa osobników J2 *M. hapla* była najniższa w temperaturach stresowych 5°C i 35°C, a najwyższa w temperaturach niestresowych 20°C i 30°C (Tab. 51Z; Ryc. 46). Natomiast osobniki stadium J2 *M. hapla* inkubowane w temperaturze stresowej 40°C nie były aktywne ruchowo. Można przypuszczać, że temperatury stresowe 5°C, 35°C i 40°C, tak jak w

przypadku omówionych powyżej parametrów stanu fizjologicznego, spowalniały tempo metabolizmu, czego skutkiem było obniżenie lub zahamowanie aktywności ruchowej tych nicieni. Badając aktywność ruchową *C. elegans* stwierdzono, że gdy tempo jego metabolizmu było wysokie, to nicień ten był również bardziej aktywny ruchowo (Parida i in., 2014). Wykazano też, że wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się liniowo aktywność ruchowa *C. elegans* aż do osiągnięcia letalnego poziomu temperatury około 25°C (Anderson i in., 2007). Badania dowodzą, że aktywność ruchowa nicieni skorelowana jest także z zawartością lipidów w organizmie. Dla przykładu redukcja lipidów w organizmie nicieni skutkowała utratą ruchliwości i infekcyjności odpowiednio o 34% u nicieni entomopatogenicznych (Fitters i Griffin, 2004; Andaló i in., 2011), 65% dla nicieni cystowych (Robinson i in., 1987) i 50% u guzaków (Christophers i in., 1997).

Z wykonanych w tej rozprawie badań można także wywnioskować, że w temperaturach stresowych 35°C i 40°C zarówno najszybciej malała ilość lipidów, jak i spadała aktywność ruchowa stadiów J2 *M. hapla.* Lu i in., (2022) badali molekularny mechanizm hydrolizy lipidów, który jest wymagany do utrzymania aktywności ruchowej osobników J2 *M. incognita*, gdy znajdują się one poza roślinami żywicielskimi. Wykazali, że zablokowanie procesów hydrolizy lipidów zmniejszyło zarówno długość życia, jak i aktywność ruchową stadiów J2. Co ważniejsze, zaburzenie przebiegu hydrolizy lipidów spowodowało zmniejszenie infekcyjności osobników J2 w korzeniach pomidorów. To odkrycie sugeruje potencjalnie nowe strategie ograniczania lub zwalczania guzaków (Lu i in., 2022). Optymalne temperatury aktywności ruchowej nicieni różnią się znacznie zależnie od gatunku i wynikają z ekologicznego przystosowania tych organizmów do środowiska (Robinson i Perry, 2006). Mając na uwadze te różnice zasadne było określenie w badaniach w tej rozprawie optymalnych zakresów temperatur dla aktywności ruchowej stadium J2 *M. hapla*.

Badane były również parametry stanu fizjologicznego u osobników stadium J2 wylęgniętego z jaj inkubowanych w różnych czasach oraz temperaturach stresowych i niestresowych. Wykazano, że temperatura stresowa 40°C letalnie działała na stadium jaja. Najmniejsza długość ciała występowała u osobników J2 wylęgniętych z jaj inkubowanych w temperaturze 35°C, następnie w 5°C, zaś największą długość obserwowano w temperaturze 30°C (Tab. 34Z, Ryc. 31). Szerokość ciała była najmniejsza w temperaturze stresowej 35°C, a największa w temperaturze kontrolnej 20°C (Tab. 36Z, Ryc. 32). Również najmniejsza wartość masy ciała występowała u osobników J2 wylęgniętych z jaj inkubowanych w temperaturze stresowej 35°C, a najwyższa w temperaturze kontrolnej 20°C (Tab. 38Z, Ryc. 33). Jak w przypadku parametrów badanych u osobników J2 (opisanych powyżej), tak i w przypadku tych badań prawdopodobnie na długość, szerokość i masę ciała nicieni wpływ miało tempo metabolizmu. Badania wykazały, że podczas rozwoju organizmów zmiennocieplnych rozmiary ciała i tempo metabolizmu są podatne na zmiany temperatury (Abram i in., 2017). Inne badania dowodzą, że na rozwój embrionalny i postembrionalny nicieni wpływ ma m.in. temperatura otoczenia (Lee i Atkinson, 1976; Begasse i in., 2015). Możliwe, że podczas inkubacji stadium jaja w temperaturach stresowych 5°C i 35°C doszło do spadku tempa metabolizmu, co spowodowało, że wielkość ciała wylęgniętych z tych jaj osobników J2 była mniejsza w porównaniu do wielkości ciała osobników J2 wylęgniętych z jaj inkubowanych w temperaturach niestresowych. Przemawia za tym fakt, że zmiany temperatury podczas rozwoju embrionalnego wpływają m.in. na wielkość ciała organizmów zmiennocieplnych (Takatsu i in., 2022). Także badania dotyczące guzaków wykazały, że tempo rozwoju embrionalnego i postembrionalnego są silnie uzależnione od temperatury i różnią się w zależności od gatunku *Meloidogyne* (Maleita i in., 2012).

Wyniki powyżej omówionych badań parametrów stanu fizjologicznego, aktywności ruchowej oraz eksperymentów dotyczących ekspresji genów hsp potwierdziły, że wyznaczone temperatury stresowe negatywnie oddziaływały na organizmy badanych stadiów rozwojowych w porównaniu do temperatur określonych jako niestresowe (Ryc. 12). Wyznaczenie zakresów temperatur stresowych i niestresowych było konieczne, ponieważ dla populacji *M. hapla* pochodzącej ze strefy klimatu umiarkowanego Europy, w tym z terenu Polski, takie badania nie były wykonywane. Wykonanie jedynie przeglądu literatury w celu wyznaczenia tych zakresów nie byłoby rzetelne, ponieważ badania wykazały, że w obrębie jednego gatunku mogą występować różne termotypy, czyli populacje, które inaczej reagują na tę samą temperaturę (Bergeson, 1959; Lee i Atkinson, 1976; Stephan i Trudgill, 1982; Stephan, 1983; Karssen i Moens, 2006). Poznanie zakresów temperatur stresowych i niestresowych wpływających na organizm stadium J2 M. hapla daje w dalszej perspektywie możliwość opracowania skuteczniejszych metod zwalczania tego pasożyta, z wykorzystaniem metod opierających się na letalnym działaniu temperatury na te zwierzęta. Do metod już opracowanych zaliczyć można obróbkę cieplną materiału sadzeniowego i solaryzację gleby. Obróbka cieplna materiału sadzeniowego (np. cebul) polega np. na traktowaniu gorącą wodą materiału rozmnożeniowego, który nie jest wrażliwy na wysoką temperaturę. Stosuje się także, zazwyczaj w szklarniach, parowanie gleby w przypadku upraw o wysokiej zawartości kompostu (Karssen i Moens, 2006; Wesemael i Moens, 2008). Natomiast solaryzacja gleby to termiczna metoda dezynfekcji gleby, która polega na ściółkowaniu gleby folią polietylenową podczas gorących pór roku (Katan i in. 1976). Metoda ta wymaga długich okresów intensywnego nasłonecznienia i stosowana jest tylko w regionach, w których wystarczająca ilość energii słonecznej jest dostępna przez długi czas, np. w krajach klimatu śródziemnomorskiego (Wesemael i in., 2011). Możliwe, że w wyniku zmian klimatycznych i coraz gorętszych miesięcy letnich w Europie (King i Karoly, 2017) również ta metoda będzie skuteczna w zwalczaniu *M. hapla* w strefie klimatu umiarkowanego. Poznanie zakresów temperatur stresowych daje możliwość dostosowania istniejących, lub opracowania nowych metod zwalczania nicieni fitofagicznych lub zaplanowania upraw tak, aby wykonać niezbędne zabiegi rolne w temperaturach, w których np. stadium inwazyjne J2 *M. hapla* nie będzie aktywne ruchowo i nie będzie w stanie infekować korzeni roślin uprawnych.

Uzyskane wyniki badań dotyczące genów hsp można również wykorzystać w opracowaniu metod ograniczenia szkodliwości M. hapla w uprawach roślin. Od lat prowadzone są badania nad biotechnologicznymi metodami zwalczania nicieni fitofagicznych, do których należy m.in. "wyciszanie" ekspresji genu bezpośrednio w organizmie nicienia (Nsengimana i in., 2013; Ajjappala i in., 2015), lub pośrednio poprzez wprowadzenie zmian w ekspresji genów gospodarza (Gleason i in., 2008, Huang i in., 2014, Dutta i in., 2015). Wyciszanie genu polega na zmniejszeniu lub zahamowaniu jego ekspresji (Shah i in., 2012). W badaniach prowadzonych na nicieniach pasożytach roślin, wyciszenie genu 16D10 powodowało m.in. zatrzymanie rozwoju komórek olbrzymich w roślinie żywicielskiej (Huang i in. 2006). Wyłączenie działania ekspresji genu Rpn7 powodowało ograniczenie ruchliwości stadium J2, a tym samym jego infekcyjności (Niu i in., 2012). Wyciszenie genu gr-ams-1 skutkowało zaburzeniami w lokalizacji korzeni rośliny żywicielskiej przez stadium inwazyjne J2 (Chen i in., 2005). Badania wykazały także, że wyciszenie (RNAi) Hsp90 zmniejszyło zdolność do rozmnażania M. incognita (Lourenço-Tessutti i in., 2015). Jak już wspomniano wcześniej w tym rozdziale, również badane geny hsp odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu organizmów nicieni z rodzaju Meloidogyne oraz u często badanego modelowego C. elegans. Dlatego też wyciszanie poszczególnych genów hsp może się przyczynić do obniżenia zdolności adaptacyjnych guzaków, co może być nowym kierunkiem w zwalczaniu tego pasożyta roślin. W oparciu o otrzymane wyniki zasadne jest podjęcie tego typu badań również nad wyciszaniem genów hsp u M. hapla.

W Europie wpływ szkodliwości nicieni z rodzaju *Meloidogyne* na uprawy różni się wyraźnie między południową częścią kontynentu, gdzie występuje klimat podzwrotnikowy, a północną częścią z klimatem umiarkowanym (Wesemael i in., 2011). Badania wykazały, że wiele organizmów reaguje na ocieplenie klimatu, zmieniając swój geograficzny zasięg występowania. W okresie ostatnich 25 lat zarówno gatunki kręgowców, jak i bezkręgowców przemieszczały się w kierunku wyższych szerokości geograficznych. Przypuszczalnie powodem tego było ocieplenie klimatu, a co za tym idzie rozszerzenie optimów termicznych tych zwierząt na tereny, na których dotąd nie występowały (Hickling i in., 2006; Chen i in., 2011). Z tego samego powodu tropikalne gatunki *Meloidogyne* mogą przemieszczać się na północ Europy i wraz z guzakami ze strefy umiarkowanej klimatu rozmnażać się bardziej intensywnie, wydając więcej pokoleń w sezonie wegetacyjnym, niż dotychczas. Wtedy opracowanie skutecznych metod zwalczenia tych pasożytów roślin może stać się priorytetem. Z powodu przyszłych zagrożeń, które mogą pojawić się wraz ze zmianami klimatu, ciągłe badania i zgromadzona wiedza o gatunkach *Meloidogyne* z południowej i północnej części Europy będą pomocne w opracowaniu skutecznych metod zwalczenia tych pasożytow rośline ze zmianami klimatu, ciągłe badania i zgromadzona wiedza o gatunkach *Meloidogyne* z południowej i północnej części Europy będą pomocne w opracowaniu skutecznych metod zwalczenia tych pasożytow rośline ze zmianami klimatu, ciągłe badania i zgromadzona wiedza o gatunkach *Meloidogyne* z południowej i północnej części Europy będą pomocne w opracowaniu skutecznych metod zwalczenia tej grupy nicieni (Wesemael i in., 2011).

# 6. Podsumowanie

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że:

- W odpowiedzi na temperatury środowiska zewnętrznego, w stadium jaja i w stadium J2 *M. hapla* zachodzą zmiany na poziomie molekularnym i fizjologicznym, w tym temperatura 40°C jest letalna dla stadium jaja, natomiast stadium J2 nie przeżywa inkubacji w temperaturach 35°C i 40°C.
- 2. U obu badanych stadiów rozwojowych wykazano wzrost transkrypcji prawie wszystkich genów *hsp* (oprócz ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 w stadium J2) na działanie stresu gorąca.
- Najwyższy wzrost ekspresji wywołany stresem gorąca ma miejsce w genach *Mh-hsp*90 i *Mh-hsp*1 w stadium J2.
- 4. W stadium J2 zawsze indukowany jest wyższy poziom ekspresji genów *hsp* (oprócz genów *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2) niż w stadium jaja, zarówno po ekspozycji na warunki stresu gorąca bądź na warunki stresu zimna.
- Jedynie dwa geny *hsp*, *Mh-hsp*60 i *Mh-dnj*19, w obu stadiach *M. hapla* reagują wzrostem transkrypcji na temperatury zewnętrzne wywołujące stres gorąca (35°C i 40°C) i zimna (5°C).
- 6. W warunkach działania stresu zimna w stadium jaja i w stadium J2 *M. hapla* zachodzi wzrost ekspresji jedynie trzech genów *hsp*, tj. *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19 i *Mh-hsp*12.2.
- 7. Geny *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*4 i *Mh-hsp*6 nie wykazują reakcji na stres zimna zarówno w stadium jaja jak i w stadium J2 *M. hapla*.
- 8. Najwyższe wartości parametrów kondycji (długość, szerokość i masa ciała) charakteryzują osobniki J2 wylęgnięte z jaj uprzednio inkubowanych w temperaturach 20°C i 30°C, natomiast najniższe wartości tych parametrów występują u osobników J2 wylęgniętych z jaj uprzednio inkubowanych w temperaturach stresowych 5°C i 35°C.
- Temperatury stresowe, tj. 5°C, 35°C i 40°C wraz z wydłużaniem czasu inkubacji istotnie wpływały na obniżanie u osobników J2 wartości następujących parametrów kondycji: długości, szerokości i masy ciała oraz masy i powierzchni wybarwionych lipidów.
- Obserwacje mikroskopowe i analiza wykonanej dokumentacji fotograficznej wykazały prawidłowość, że zanikanie powierzchni wybarwionych lipidów u osobników J2 następowało od przedniej części jelita do części ogonowej ciała nicienia.
- 11. U osobników stadium J2 najsłabsza aktywność ruchowa występuje w warunkach działania temperatur stresowych, tj. 5°C i 35°C, natomiast najsilniejsza aktywność ruchowa charakteryzuje osobniki w warunkach działania temperatur niestresowych, tj. 20°C i 30°C.

 Optymalnymi temperaturami do rozwoju jaj i osobników stadium J2 *M. hapla*, pozyskanych z gleb strefy klimatu umiarkowanego są temperatury w przedziale od 20°C do 30°C.

## 7. Wnioski

Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej dotyczące reakcji organizmu nicienia *Meloidogyne hapla* na zmiany temperatury środowiska zewnętrznego pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

I. W warunkach ekspozycji na pewne temperatury, w jajach jak również u osobników stadium J2 *M. hapla*, zachodzą zmiany na poziomie molekularnym i fizjologicznym.

II. Badane geny *Mh-hsp*90, *Mh-hsp*1, *Mh-hsp*4, *Mh-hsp*6, *Mh-hsp*60, *Mh-dnj*19, *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2 w stadium jaja i stadium J2 *M. hapla*, wykazują zróżnicowany poziom ekspresji na temperatury, w tym temperatury stresowe.

III. Zmiany poziomu ekspresji większości genów *hsp* (oprócz genów *Mh-hsp*43 i *Mh-hsp*12.2) podczas inkubacji w temperaturach stresowych są wyższe w stadium J2, niż w stadium jaja *M. hapla* – co sugeruje, że stadium jaja jest mniej wrażliwe na temperatury stresowe.

IV. Uzyskane wyniki sugerują, że geny *Mh-hsp*90 i *Mh-hsp*1 mogą być stosowane jako bioindykatory wpływu środowiska zewnętrznego na organizm nicieni z rodzaju *Meloidogyne*. Natomiast gen *Mh-hsp*1 może uczestniczyć w nabywaniu termotolerancji przez organizm stadium J2 *M. hapla*.

V. Ekspozycja jaj *M. hapla* na temperatury stresowe ma negatywny wpływ na parametry kondycji wylęgających się z nich osobników stadium J2.

VI. Wydłużenie czasu ekspozycji osobników stadium J2 *M. hapla* na temperatury stresowe ma niekorzystny wpływ na parametry kondycji oraz na aktywność ruchową badaną u tych nicieni.

VII. Temperatury w przedziale od 20°C do 30°C stanowią optimum temperaturowe dla rozwoju stadium jaja jak i osobników w stadium J2 *M. hapla*, pozyskanych z gleb strefy klimatu umiarkowanego.

## 8. Literatura

- Abad P., Castagnone-Sereno P., Rosso M. N., Engler J. A., Favery B. 2009. Invasion, feeding and development. W: Perry R. N., Moens M., Starr J. L. (red.). Root-knot nematodes. CABI Head Office, s. 164–181.
- Abram P. K., Boivin G., Moiroux J., Brodeur J. 2017. Behavioural effects of temperature on ectothermic animals: unifying thermal physiology and behavioural plasticity. *Biological Reviews* 92: 1859–1876. https://doi.org/10.1111/brv.12312
- Adhikari B. N., Adams B. J. 2011. Molecular analyses of desiccation survival in Antarctic nematodes. W: Perry R. N., Wharton D. A. (red.). Molecular and physiological basis of nematode survival. CAB International, s. 205–232.
- Afzal S., Nesar H., Imran Z., Ahmad W. 2021. Altitudinal gradient affect abundance, diversity and metabolic footprint of soil nematodes in Banihal-Pass of Pir-Panjal mountain range. *Scientific Reports* 11(1): 16214. https://doi.org/10.1038/s41598-021-95651-x
- Ajjappala H., Chung H. Y., Sim J. S., Choi I., Hahn B. S. 2015. Disruption of prefoldin-2 protein synthesis in root-knot nematodes via host-mediated gene silencing efficiently reduces nematode numbers and thus protects plants. *Planta* 241: 773–787.
- Al-Whaibi M. H. 2011. Plant heat-shock proteins: a mini review. *Journal of King Saud University Science* 23: 139–150. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2010.06.022
- An L., Fu X., Chen J., Ma J. 2023. Application of *Caenorhabditis elegans* in lipid metabolism research. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 1173. https://doi.org/10.3390/ijms24021173
- Andaló V., Moino A., Maximiniano C., Campos V. P., Mendonça L. A. 2011. Influence of temperature and duration of storage on the lipid reserves of entomopathogenic nematodes. *Revista Colombiana de Entomología* 37(2): 203–209.
- Anderson J. L., Albergotti L., Proulx S., Peden C., Huey R., Phillips P. C. 2007. Thermal preference of *Caenorhabditis elegans:* a null model and empirical tests. *The Journal of Experimental Biology* 210: 2107–3116.
- Anderson R. V., Coleman D. C. 1982. Nematode temperature responses: a niche dimension in populations of bacterial-feeding nematodes. *Journal of Nematology* 14: 69–76.
- Andrássy I. 1956. Die Rauminhalts-und Gewichtsbestimmung der Fadenwürmer (Nematoden). *Acta Zoologica* 2: 1–15.

- Angilletta M. J. 2009. Thermal adaptation: A theoretical and empirical synthesis. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198570875.001
- Angilletta M. J., Dunham A. E. 2003. The temperature-size rule in ectotherms: simple evolutionary explanations may not be general. *American Naturalist* 162(3): 332–342. https://doi.org/10.1086/377187
- Angilletta M. J., Steury T. D., Sears M. W. 2004. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integrative and Comparative Biology* 44: 498–509.
- Arya R., Mallik M., Lakhota S. C. 2007. Heat shock genes integrating cell survival and death. *Journal of Biosciences* 32(3): 595–610. https://doi.org/10.1007/s12038-007-00593
- Atkinson D. 1994. Temperature and organism size a biological law for ectotherms? Advances in Ecological Research 25: 1–58. http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60212-3
- Atkinson D., Ciotti B. J., Montagnes D. J. 2003. Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% degrees C(-1). *Proceedings of the Royal Society B* 270(1533): 2605–2611. http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2003.2538
- Avila D. S., Benedetto A., Au C., Bornhorst J., Aschner M. 2016. Involvement of heat shock proteins on Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Pharmacology and Toxicology* 17(54): 1–9. https://doi.org/10.1186/s40360-016-0097-2
- Ayub F., Seychelles L., Strauch O., Wittke M., Ehlers R. U. 2013. Monoxenic liquid culture with *Escherichia coli* of the free-living nematode *Panagrolaimus* sp. (strain NFS 24-5), a potential live food candidate for marine fish and shrimp larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 8049–8055.
- Bacaj T., Shaham S. 2007. Temporal control of cell-specific transgene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176: 2651–2655. https://doi.org/10.1534/genetics.107.074369
- Bai C., Duan Y., Chen L., Liu Y., Zheng Y., Wang Y., Zhu X. 2014. Gene cloning and gene expression of Hsp90 from *Meloidogyne incognita* under the temperature and heavy metal stress. *International Journal of Agriculture and Biology* 16: 451–460.
- Barker K. R., Koenning S. R. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review of Phytopathology* 36: 165–205.
- Bar-Lavan Y., Shemesh N., Dror S., Ofir R., Yeger-Lotem E., Ben-Zvi A. 2016. A differentiation transcription factor establishes muscle-specific proteostasis in

Caenorhabditis elegans. PLoS Genet 12(12): 1–27. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.10065311

- Bar-On Y. M., Phillipsb R., Miloa R. 2018. The biomass distribution on Earth. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115(25): 6506–6511. https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115
- Begasse M. L., Leaver M., Vazquez F., Grill S. W., Hyman A. A. 2015. Temperature dependence of cell division timing accounts for a shift in the thermal limits of *C. elegans* and *C. briggsae*. *Cell Reports* 10(5): 647–653. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.006
- Belair G. 1992. Effects of cropping sequences on population densities of *Meloidogyne hapla* and carrot yield in organic soil. *Journal of Nematology* 24: 450–456.
- Belder E. D., Jansen E. 1994. The influence of temperature, nutrition, light and the growth time of the mycelium on capture and infection of *Meloidogyne hapla* by *Arthrobotrys oligospora*. *Fundamental and Applied Nematology* 17(1): 57–66.
- Ben-Zvi A., Miller E. A., Morimoto R. I. 2009. Collapse of proteostasis represents an early molecular event in *Caenorhabditis elegans* aging. *Proceedings of the National Academy* of Sciences 106(35): 14914–9. https://doi.org/10.1073/pnas.0902882106
- Bergeson G. B. 1959. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. *Nematologica* 4: 344–354.
- Berkeley M. J. 1855. Vibrio forming cysts on the roots of cucumbers. *Gardeners Chronicle* April 7<sup>th</sup>: 220.
- Biecek P. 2013. Analiza danych z programem R. Modele liniowe z efektami stałymi, losowymi i mieszanymi. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, Polska.
- Bird A. F. 1972. Influence of temperature on embryogenesis in *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 4: 206–2013.
- Bird A. F., Wallace H. R. 1965. The influence of temperature on *Meloidogyne hapla* and *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 11: 581–589.
- Bleve-Zacheo T., Melillo M. T., Castagnone-Sereno P. 2007. The contribution of biotechnology to root-knot nematode control in tomato plants. *Pest Technology* 1: 1–16.
- Bolz D. D., Tenor J. L., Aballay A. 2010. A conserved PMK-1/p38 MAPK is required in *Caenorhabditis elegans* tissue-specific immune response to *Yersinia pestis* infection. *Journal of Biological Chemistry* 285: 10832–40. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091629

- Boroş L., Şesan E. T., Dobrin I., Iacomi B. 2018. Observations on the influence of temperature of second stage juveniles (*Meloidogyne* spp.) in the absence of the host plant. *Sciendo* 1: 17–21. https://doi.org/10.2478/alife-2018-0003
- Brinkman H., Goossens J. 1994. Het noordelijk worteklnobbelaalteje *Meloidogyne hapla* bij Hosta – sorten. *Gewasbescherming* 25: 79–82.
- Brown J. H., Sibly R. M., Kodric-Brown A. 2012. Introduction: Metabolism as the Basis for a Theoretical Unification of Ecology. W: Sibly R. M., Brown J. H., Kodric-Brown A. (red.). Metabolic Ecology: A Scaling Approach. Wiley-Blackwell, Chichester, s. 1–6.
- Brzeski M. W. 1993. Nematologia rolnicza. Wydawnictwo SGGW.
- Brzeski M. W., Sandner H. 1974. Zarys nematologii. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, Polska.
- Bubner B., Baldwin I. T. 2004. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Reports* 23: 263–271. https://doi.org/10.1007/s00299-004-0859-y
- Buchsbaum R., Buchsbaum M., Pearse J., Pearse V. 1987. Animals without backbones. University of Chicago Press.
- Burnham K. P., Anderson D. R. 2002. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. Springer Science, Business Media, New York.
- Burr A. H. J., Robinson A. F. 2004. Locomotion behaviour. W: Gaugler R., Bilgrami A. L. (red.). Nematode behaviour. CAB International, Wallingford, s. 25–62.
- CABI 2021. *Meloidogyne hapla* (root knot nematode). Head Office, Wallingford, UK. https://doi.org/10.1079/cabicompendium.33244
- Campos H. D., Campos V. P., Pozza E. A. 2006. Effect of timing and temperature of incubation of second stage juveniles (J2) on body lipid content and parasitism of *Meloidogyne javanica* in soybean. *Fitopatologia Brasileira* 31(4): 387–393.
- Cao D. S., Froehlich J. E., Zhang H., Cheng C. L. 2003. The chlorate-resistant and photomorphogenesis-defective mutant *cr88* encodes a chloroplast-targeted HSP90. *The Plant Journal* 33: 107–118. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.016011.x
- Cao Z., Hao Y., Fung W. C., Lee Y. Y., Wang P., Li X., Xie K., Lam W. J., Qiu Y., Tang B. Z., Shui G., Liu P., Qu J., Kang B.-H., Mak H. Y. 2019. Dietary fatty acids promote lipid droplet diversity through seipin enrichment in an ER subdomain. *Nature Communications* 10: 2902. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10835-4

- Carra S., Alberti S., Arrigo P. A. i in. 2017. The growing world of small heat shock proteins: from structure to functions. *Cell Stress Chaperones* 22: 601–611. https://doi.org/10.1007/s12192-017-0787-8
- Castagnone-Sereno P. 2006. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root-knot nematodes. *Heredity* 96(4): 282–289.
- Cedergreen N., Nørhave N. J., Svendsen C., Spurgeon D. J. 2016. Variable temperature stress in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Maupas) and its implications for sensitivity to an additional chemical stressor. *PLoS ONE* 11(1): e0140277. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140277
- Charchar J. M., Santo G. S. 2001. Effect of temperature on the embryogenic development and hatching of *Meloidogyne chiwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla. Nematologia Brasileira* 25(1): 71–77.
- Charchar J. M., Santo G. S. 2009. Effect of soil temperature on the life cycle of *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla* on russet burbank potato. *Nematologia Brasileira* 33(2): 154–161.
- Chen I. C., Hill J. K., Ohlemuller R., Roy D. B., Thomas C. D. 2011. Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science* 333(6045): 1024–1026.
- Chen Q., Rehman S., Smant G., Jones J. T. 2005. Functional analysis of pathogenicity proteins of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* using RNAi. MPMI 18: 621–625.
- Chen W., Lin H. R., Wei C. M., Luo X. H., Sun M. L., Yang Z. Z., Chen X. Y., Wang H. B. 2018. Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from Ab-induced toxicity. *Biogerontology* 19: 47–65. https://doi.org/10.1007/s10522-017-9738-0
- Chen W., Sudji I. R., Wang E., Joubert E., Van Wyk B. E., Wink M. 2013. Ameliorative effect of aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on acute oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine* 20: 380–386. http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2012.10.006
- Chitwood B. G. 1949. Root-knot nematodes. Part 1. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 16: 90–114.
- Chitwood D. J. 1998. Biosynthesis. W: Perry R. N., Wright D. J. (red.). The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. CABI Wallingford, s. 303– 330.

- Chitwood D. J. 2003. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agriculture Research Service. *Pest Management Science* 59: 748–753.
- Choi B., Choi C., Park E. K., Lee D. H., Kang D. J., Lee J. Y., Yeom J. Y., Jung Y., Kim J., Lee S., Kang S. W. 2015. Cytosolic Hsp60 orchestrates the survival and inflammatory responses of vascular smooth muscle cells in injured aortic vessels. *Cardiovascular Research* 106: 498–508. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv130
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162(1): 156–159. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021
- Christophers A. E. P., Patel M. N., Benson J. A., Saka V. W., Evans A. A. F. Wright D. J. 1997. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. *Nematologica* 43: 117–120. https://doi.org/10.1163/004725997X00089
- Chughtai A. A., Kassak F., Kostrouchov M., Novotny J. P., Krause M. W., Saudek V., Kostrouch Z., Kostrouchova M. 2015. Perilipin-related protein regulates lipid metabolism in *C. elegans*. *PeerJ Life and Environment* 3: e1213. https://doi.org/10.7717/peerj.1213
- Ciesielska A., Sikorski M. M. 2008. Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym do walidacji eksperymentu mikromacierzowego. *Biotechnologia* 4(83): 88–100.
- Clarke A. 2006. Temperature and the metabolic theory of ecology. *Functional Ecology* 20: 405–412. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01109.x
- Cradeur M. N. 2019. An analysis of the temperature size rule in ectotherms. A thesis submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree. Praca magisterska. University of California San Diego.
- Craig E. A. 2018. Hsp70 at the membrane: driving protein translocation. *BMC Biology* 16: 11. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0474-3
- Cranfield C. G., Dawe A., Karloukovski V., Dunin–Borkowski R. E., de Pomerai D., Dobson J. 2004. Biogenic magnetite in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the Royal Society B* 271(6): S436–S439. https://doi.org/10.1098/rsbl.2004.0209
- Creagh E. M., Sheehan D., Cotter T. G. 2000. Heat shock proteins modulators of apoptosis in tumor cells. *Leukemia* 14: 1161–1173.
- Croll N. A. 1970. The behaviour of nematodes: their activity, senses and responses. St. Martin's Press, New York.

- Croll N. A. 1972. Energy utilization of infective *Ancylostoma tubaeformae* larvae. *Parasitology* 64: 355–365.
- Croll N. A., Sukhdeo M. V. K. 1981. Hierarchies in nematode behavior. W: Zuckerman B. M. Rohde R. A. (red.). Plant Parasitic Nematodes Vol. III. Academic Press, New York. s. 227–251.
- Crombie T. A., Tang L., Choe P. K., Julian D. 2016. Inhibition of the oxidative stress response by heat stress in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Biology* 219: 2201–2211. http://dx.doi.org/10.1242/jeb.135327
- Curtis R. H., Robinson A. F., Perry R. N. 2009. Hatch and host location. W: Perry R. N., Moens M., Starr J. L. (red.). Root-knot nematodes. CABI Head Office, s.139–162.
- Cymerys J., Niemiałtowski M. 2004. Białka szoku cieplnego molekularne perpetuum mobile. *Postępy Biologii Komórki* 31(2): 332–339.
- Dao D. F. 1970. Climatic influence on the distribution pattern of plant parasitic and soil inhibiting nematodes. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 70: 1–180.
- Das S., Wesemael W. M. L., Perry R. N. 2011. Effect of temperature and time on the survival and energy reserves of juveniles of *Meloidogne* spp. *Agricultural Science Research Journal* 1(5): 102–112.
- Daulton R. A. C., Nusbaum C. J. 1961. The effect of soil temperature on the survival of the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne hapla*. *Nematologica* 6: 280–294.
- Dautova M. 2001. Population and molecular genetics of root-knot nematodes. Praca doktorska. Wageningen University and Research Centre, The Netherlands.
- Davide R. G., Triantaphyllou A. C. 1968. Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes. *Nematologica* 14: 37–46.
- Dawe A. S., Nylund R., Leszczynski D., Kuster N., Reader T., De Pomerai D. I. 2008. Continuous wave and simulated GSM exposure at 1.8 W/kg and 1.8 GHz do not induce *hsp16-1* heat-shock gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Bioelectromagnetics* 29(2): 92–99. https://doi.org/10.1002/bem.20366
- De Goede R. G. M., Verschoor B. C., Georgieva S. S. 1993. Nematode distribution, trophic structure and biomass in a primary succession of blown-out areas in a drift sand landscape. *Fundamental and Applied Nematology* 16(6): 525–538.
- De Luca F., Di Vito M., Fanelli E., Reyes A., Greco N., De Giorgi C. 2009. Characterization of the heat shock protein 90 gene in the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*

and its expression as related to different developmental stages and temperature. *Gene* 440: 16–22. https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.03.020

- De Magalhaes Filho C. D., Henriquez B., Seah N. E., Evans R. M., Lapierre L. R., Dillin A. 2018. Visible light reduces *C. elegans* longevity. *Nature Communications* 9(1): 927. https://doi.org/10.1038/s41467-018-02934-5
- Decraemer W., Hunt D. J. 2006. Structure and classification. W: Perry R. N., Moens M. (red.). Plant nematology. CABI Publishing, s. 3–32.
- Devaney E. 2011. Thermobiotic survival. W: Perry R. N., Wharton D. A. (red.). Molecular and physiological basis of nematode survival. CAB International, s. 233–255.
- Díaz-Manzano F. E., Olmo R., Cabrera J., Barcala M., Escobar C., Fenoll C. 2016. Long-term in vitro system for maintenance and amplification of root-knot nematodes in *Cucumis sativus* roots. *Frontiers* in *Plant Science* 7: 124. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00124
- Ding L., Candido E. P. 2000. HSP43, a small heat-shock protein localized to specific cells of the vulva and spermatheca in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal* 349: 409–412.
- Dinh H. K., Stavchansky S., Schuschereba S. T., Stuck B. E., Bowman P. D. 2002. Cytoprotection against thermal injury: evaluation of herbimycin a by cell viability and cDNA arrays. *The Pharmacogenomics Journal* 2: 318–326.
- 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
- Dobosz R., Obrępalska-Stęplowska A., Nowaczyk K., Kornobis S. 2008. Diagnostyka nicieni – pasożytów roślin objętych regulacjami prawnymi. Instrukcja rozpoznawania gatunków z rodzaju Meloidogyne. Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Poznań 1–24.
- Doucet M., Lax P., Di Rienzo J. A., Pinochet J., Baujard P. 2001. Temperature-induced morphometric variability in an isolate of *Pratylenchus vulnus* Allen & Jensen, 1951 (Nematoda: Tylenchida). *Nematology* 3: 1–8.
- Douglas P. M., Baird N. A., Simic M. S., Uhlein S., McCormick M. A., Wolff S. C., Kennedy B. K., Dillin A. 2015. Heterotypic signals from neural HSF-1 separate thermotolerance from longevity. *Cell Report* 12(7): 1196–1204. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.026

- Doyle S. M., Hoskins J. R., Kravats A. N., Heffner A. L., Garikapati S., Wickner S. 2019. Intermolecular interactions between Hsp90 and Hsp70. *Journal of Molecular Biology* 431(15): 2729–2746. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.026
- Dues D. J., Andrews E. K., Schaar C. E., Bergsma A. L., Senchuk M. M., Van Raamsdonk J. M. 2016. Aging causes decreased resistance to multiple stresses and a failure to activate specific stress response pathways. *Aging* 8(4): 777–795. https://doi.org/10.18632/aging.100939
- Dusenbery D. B., Anderson G. L., Anderson E. A. 1978. Thermal acclimation more extensive for behavioral parameters than for oxygen consumption in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology Part A* 206: 191–197.
- Dutta T. K., Papolu P. K., Banakar P., Choudhary D., Sirohi A., Rao U. 2015. Tomato transgenic plants expressing hairpin construct of a nematode protease gene conferred enhanced resistance to root-knot nematodes. *Frontiers in Microbiology* 6(260): 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00260
- Eckl J., Sima S., Marcus K., Lindemann C., Richter K. 2017. Hsp90-downregulation influences the heat-shock response, innate immune response and onset of oocyte development in nematodes. *PLoS ONE* 12(10): 1–27. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186386
- Eisenback J. D., Holland L. A., Schroeder J., Thomas S. H., Beacham J. M., Hanson S. F., Paes-Takahashi V. S., Vieira P. 2019. *Meloidogyne aegracyperi* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing yellow and purple nutsedge in New Mexico. *Journal of Nematology* 51: 1–16. https://doi.org/10.21307/jofnem-2019-071
- Eisenback J. D., Hunt D. J. 2009. General morphology. W: Perry R. N., Moens M., Starr J. L. (red.). Root-knot nematodes. CABI Head Office, s.18–50.
- Eisenback J. D., Triantaphyllou H. H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. W: Nickle W. R. (red.). Manual of agricultural nematology. New York, s. 281–286.
- Evans A. A. F., Fisher J. M. 1970. Some factors affecting the number and size of nematodes in populations of *Aphelenchus avenae*. *Nematologica* 16: 295–304.
- Evans A. A. F., Perry R. N. 2009. Survival mechanisms. W: Perry R. N., Moens M., Starr J. L. (red.). Root-knot nematodes. CABI Head Office, s. 201–220.
- Eves-Van den Akker S., Laetsch D. R., Thorpe P. i in. 2016. The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitism and virulence. *Genome Biology* 17: 124. https://doi.org/10.1186/s13059-016-0985-1

- Ewalt K. L., Hendrick J. P., Houry W. A., Hartl F. U. 1997. *In vivo* observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90: 491–500. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80509-7
- Ewing D. A., Blok V., Kettle H. 2021. A process-based, stage-structured model of potato cyst nematode population dynamics: Effects of temperature and resistance. *Journal of Theoretical Biology* 522: 110701. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110701
- Ezemaduka A. N., Wang Y., Li X. 2017. Expression of CeHSP17 protein in response to heat shock and heavy metal ions. *Journal of Nematology* 49(3): 334–340.
- Falsone S. F., Gesslbauer B., Tirk F., Piccinini A-M., Kungl A. J. 2005. A proteomic snapshot of the human heat shock protein 90 interactome. *FEBS Letters* 579: 6350–6354. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.020
- Fanelli E., Troccoli A., Tarasco E., De Luca F. 2021. Molecular characterization and functional analysis of the Hb-hsp90-1 gene in relation to temperature changes in *Heterorhabditis bacteriophora*. *Frontiers in Physiology* 12: 615653. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.615653
- Feder M. E., Hofmann G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61: 243– 282. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.243
- Feleciano D. R., Juenemann K., Iburg M., Brás I.C., Holmberg C.I., Kirstein J. 2019. Crosstalk between chaperone-mediated protein disaggregation and proteolytic pathways in aging and disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 11: 1–16. https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00009
- Filina O., Demirbas B., Haagmans R., Van Zon J. S. 2022. Temporal scaling in C. elegans larval development. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 119(11): e2123110119. https://doi.org/10.1073/pnas.2123110119
- Fischer K., Karl I. 2010. Exploring plastic and genetic responses to temperature variation using copper butterflies. *Climate Research* 43: 17–30. https://doi.org/10.3354/ cr00892
- Fitters P. F. L., Griffin C. T. 2004. Spontaneous and induced activity of *Heterorhabditis megidis* infective juveniles during storage. *Nematology* 6: 911–917.
- Fitters P. F. L., Meijer E. M. J., Wright D. J., Griffin C. T. 1997. Estimation of lipid reserves in unstained living and dead nematodes by image analysis. *Journal of Nematology* 29: 160–167.

- Fitzenberger E. 2012. Molecular mechanisms underlying the prevention of glucose-induced life span reduction by the polyphenol quercetin in the *mev-1* mutant of *Caenorhabditis elegans*. Praca doktorska. Biologie und Chemie an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Fleckenstein T. T. 2014. Sip1, a unique small heat shock protein of the nematode *Caenorhabditis elegans* - a structural and functional characterization. Praca doktorska. Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München.
- Flis Ł., Dobosz R., Winiszewska G., Rybarczyk-Mydłowska K., Malewski T., Wasilewska-Nascimento B., Silva G. D. 2018. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato in Cape Verde. *Plant Disease* 102(1): 253. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1020-PDN
- Forge T. A., MacGuidwin A. E. 1992. Impact of thermal history on *Meloidogyne hapla* second stage juveniles to external freezing. *Journal of Nematology* 24: 262–268.
- Forster J., Hirst A. G., Atkinson D. 2011. How do organisms change size with changing temperature? The importance of reproductive method and ontogenetic timing. *Functional Ecology* 25: 1024–1031.
- Fowler S. D., Greenspan P. 1985. Application of nile red, a fluorescent hydrophobic probe for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33: 833–836.
- Fox J., Weisberg S. 2019. An R companion to applied regression. Sage Publishers, Thousand Oaks, California.
- Frumkin A., Dror S., Pokrzywa W., Bar-Lavan Y., Karady I., Hoppe K., Ben-Zvi A. 2014.
  Challenging muscle homeostasis uncovers novel chaperone interactions in *Caenorhabditis elegans. Frontiers in Molecular Bioscience* 21(1): 1–12. https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.0002
- Fu R., Huang Z., Li H., Zhu Y., Zhang H. 2020. A hemidesmosome-to-cytoplasm translocation of small Heat Shock Proteins provides immediate protection against heat stress. *Cell Reports* 33(8): 108410. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108410
- Fu X., Ezemaduka A. N., Lu X., Chang Z. 2021. The *Caenorhabditis elegans* 12-kDa small heat shock proteins with little in vitro chaperone activity play crucial roles for its dauer formation, longevity, and reproduction. *Protein Science* 30: 2170–82. https://doi.org/10.1002/pro.4160
- Gaiser A. M., Brandt F., Richter K. 2009. The non-canonical Hop protein from *Caenorhabditis elegans* exerts essential functions and forms binary complexes with either

Hsc70 or Hsp90. *Journal of Molecular Biology* 391: 621–634. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.051

- Gamalero E., Glick B. R. 2020. The use of plant growth-promoting bacteria to prevent nematode damage to plants. *Biology* 9: 381.
- Garrido C., Gurbuxani S., Ravaganan L., Kroemer G. 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptic cell death. *Biochemical* and *Biophysical Research Communications* 286: 433–442. https://doi.org/10.1007/3-540-29717-0\_8
- Gething M. J., Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45. https://doi.org/10.1038/355033a0
- Ghaderi R., Karssen G. 2020. An updated checklist of *Meloidogyne* Göldi, 1887 species, with a diagnostic compendium for second-stage juveniles and males. *Journal of Crop Protection* 9(2): 183–193.
- Gillan V., Devaney E. 2014. Nematode Hsp90: highly conserved but functionally diverse. *Parasitology* 141(9): 1203–1215. https://doi.org/10.1017/S0031182014000304
- Giné A., Monfort P., Sorribas F. J. 2021. Creation and validation of a temperature-based phenology model for *Meloidogyne incognita* on common bean. *Plants* 10: 240. https://doi.org/10.3390/plants10020240
- Ginzinger D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30: 503–512.
- Glazier D. S. 2018. Effects of contingency versus constraints on the body-mass scaling of metabolic rate. Challenges 9: 4. https://doi.org/10.3390/challe9010004
- Gleason C. A., Liu Q. L., Williamson V. M. 2008. Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene *Mi-1* leads to acquisition of virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5: 576–585.
- Göldi E. A. 1892. Relatoria sobre a molestia do cafeiro na provincia da Rio de Janeiro. *Archivos do Museo Nacional Rio de Janeiro* 8: 7–112.
- Govindan S., Amirthalingam M., Duraisamy K., Govindhan T., Sundararaj N., Palanisamy S. 2018. Phytochemicals-induced hormesis protects *Caenorhabditis elegans* against αsynuclein protein aggregation and stress through modulating HSF-1 and SKN-1/Nrf2 signaling pathways. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 102: 812–822. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.128
- Greet D. N. 1978. The effect of temperature on the life cycle of *Panagrolaimus rigidus* (Schneider). *Nematologica* 24: 239–242.

- Griffin G. D. 1969. Effect of temperature on *Meloidogyne hapla* in alfalfa. *Phytopathology* 59: 599–602.
- Griffin G. D. 1974. Effect of acclimation temperature on infection of alfalfa by *Ditylenchus dipsaci. Journal of Nematology* 6: 57–59.
- Griffin G. D., Jensen K. B. 1997. Importance of temperature in the pathology of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi* on legumes. *Journal of Nematology* 29: 112–116.
- Griffin G. D., Jorgenson E. C. 1969. Life cycle and reproduction of *Meloidogyne hapla* on potato. *Plant Disease Reporter* 53(4): 259–261.
- Groombridge B. 1992. Global biodiversity: status of the Earth's living resources, Chapman & Hall, London, UK.
- Grzelak K., Gluchowska M., Gregorczyk K., Winogradow A., Weslawski J. M. 2016. Nematode biomass and morphometric attributes as biological indicators of local environmental conditions in Arctic fjords. *Ecological Indicators* 69: 368–380. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.036
- Gu J., Fang Y., Ma X., Shao B., Zhuo K. 2023. *Meloidogyne paramali* n. sp. (Nematoda: Meloidogyninae) and first report of *M. marylandi* in maple and yacca tree from Japan. *Journal of Nematology* 55(1): 20220036. https://doi.org/10.2478/jofnem-2022-0036
- Gulyas L., Powell J. R. 2022. Cold shock induces a terminal investment reproductive response in *C. elegans. Scientific Reports* 12(1): 1338. https://doi.org/10.1038/s41598-022-05340-6
- Gupta M., Kumar S., Dangi S.S., Jangir B. L. 2013. Physiological, biochemical and molecular responses to thermal stress in goats. *International Journal of Livestock Research* 3: 27– 38. https://doi.org/10.5455/IJLR.20130502081121
- Gutteling E. W., Doroszuk A., Riksen J. A. G., Prokop Z., Reszka J., Kammenga J. E. 2007. Environmental influence on the genetic correlations between life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* 98: 206–213.
- Habich C., Baumgart K., Kolb H., Burkart V. 2002. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *Journal of Immunology* 168(2): 569–576. https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.569
- Hack H., Bleiholder H., Burh L., Meier U., Schnock-Fricke E., Weber E., Witzenberger A.
  1992. Einheitliche codierung der phanologischen entwicklungsstadien mono-und dikotyler pflanzen erweiterte BBCH-skala allgemein. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutzd* 44: 265–270.
- Halaschek-Wiener J., Khattra J. S., McKay S., Pouzyrev A., Stott J. M., Yang G. S., Holt R. A., Jones S. J. M., Marra M. A., Brooks-Wilson A. R., Riddle D. L. 2005. Analysis of long-lived *C. elegans daf-2* mutants using serial analysis of gene expression. *Genome Research* 15: 603–615. https://doi.org/10.1101/gr.3274805
- Handoo Z. A., Skantar A. M., Carta L. K., Schmitt D. P. 2005. Morphological and molecular evaluation of *Meliodogyne hapla* population damaging coffee (*Coffea arabica*) in Maui, Hawaii. *Journal of Nematology* 37(2): 136–145.
- Hansen E. L., Buecher E. J., Yarwood E. A. 1972. Sex differentiation of *Aphelenchus avenae* in axenic culture. *Nematologica* 18: 253–260.
- Hartl F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–580. https://doi.org/10.1038/381571a0
- Hartl F. U., Bracher A., Hayer-Hartl M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324–332. https://doi.org/10.1038/nature10317
- Hasegawa K., Miwa S., Tsutsumiuchi K., Miwa J. 2010. Allyl isothiocyanate that induces GST and UGT expression confers oxidative stress resistance on *C. elegans*, as demonstrated by nematode biosensor. *PLoS ONE* 5(2): e9267. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009267
- Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurtner D., Buchner J. 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* 12: 842–846. https://doi.org/10.1038/nsmb993
- Heidler T. N. 2009. Effects of nutritional components on stress response and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Praca doktorska. Technische Universität München.
- Heschl M. F., Baillie D. L. 1990. The HSP70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 96(4): 633–637. https://doi: 10.1016/0305-0491(90)90206-9
- Hickling R., Roy D. B., Hill J. K., Fox R., Thomas C. D. 2006. The distributions of a wide range of taxonomic groups are expanding polewards. *Glob Change Biology* 12(3): 450– 455.
- Him N. A., Gillan V., Emes R. D., Maitland K., Devaney E. 2009. Hsp-90 and the biology of nematodes. *BMC Evolutionary Biology* 9(254): 1–13. https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-254
- Him N. A., Izzauddin N. A. I. 2010. Analysis of Hsp90 in nematodes and its role in drug resistance. Praca doktorska. University of Glasgow, Division of Infection and Immunity Faculty of Veterinary Medicine.

- Hodda M. 2022. Phylum Nematoda: a classification, catalogue and index of valid genera, with a census of valid species. *Zootaxa* 5114(1): 1–289. https://doi.org/10.11646/zootaxa.5114.1.1
- Hoter A., Marwan E., El-Sabban, Naim H. Y. 2018. The HSP90 family: structure, regulation, function and implications in health and disease. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2560. https://doi.org/10.3390/ijms19092560
- Huang G. S., Yeh L. K., Chen Y. C. 2008. Nanoparticle-enhanced magnetic field induces apoptosis in nematodes. *NSTI-Nanotech* 2: 497–500.
- Huang G., Allen R., Davis E. L., Baum T. J., Hussey R. S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Science* 103(39): 14302–14306. https://doi.org/10.1073/pnas.0604698103
- Huang Q. X., Cheng X. Y., Mao Z. C. i in. 2010. MicroRNA discovery and analysis of pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by deep sequencing. *PLoS ONE* 5(10): e13271. https://doi:10.1371/journal.pone.0013271
- Huang Y., Mei M., Mao Z., Lv S., Zhou J., Chen S., Xie B. 2014. Molecular cloning and virus-induced gene silencing of MiASB in the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* 138: 181–193. https://doi.org/10.1007/s10658-013-0321-5
- Huang Y., Sterken M. G., Van Zwet K., Van Sluijs L., Pijlman G. P., Kammenga J. E. 2021. Heat stress reduces the susceptibility of *Caenorhabditis elegans* to orsay virus infection. *Genes* 12: 1161. https://doi.org/10.3390/genes12081161
- Hubbard T. J., Sander C. 1991. The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein Engineering* 4: 711–717. https://doi.org/10.1093/protein/4.7.711
- Hughes S., Vrinds I., de Roo J., Francke C., Shimeld S. M., Woollard A., Sato A. 2019. DnaJ chaperones contribute to canalization. *Journal of Experimental Zoology* 331(3): 201–212. https://doi.org/10.1002/jez.2254
- Hunt D. J., Handoo Z. A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. W: Perry R.N., Moens M., Starr J. L. (red.). Root-knot nematodes. CABI Head Office, s. 55–97.
- Hussain M., Zouhar M., Ryšánek P. 2017. Potential of some nematophagous fungi against *Meloidogyne hapla* infection in Czech Republic. *Pakistan Journal of Zoology* 49(1): 35– 43. https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.1.35.43

- Inoue T., Takamura K., Yamae H., Ise N., Kawakami M., Tabuse Y., Miwa J., Yamaguchi Y. 2003. *Caenorhabditis elegans* DAF-21(Hsp90) is characteristically and predominantly expressed in germline cells: spatial and temporal analysis. *Development*, *Growth & Differentiation* 45: 369–376. https://doi.org/10.1046/j.1440-169x.2003.00706.x
- Inserra R. N., Griffin G. D., Sisson D. V. 1983. Effects of temperature and root leachates on embryogenic development and hatching of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla. Journal* of Nematology 15(1): 123–127.
- Ishiguro S., Watanabe Y., Ito N., Nonaka H., Takeda N., Sakai T., Kanaya H., Okada K. 2002. Shepherd is the *Arabidopsis* GRP94 responsible for the formation of functional clavata proteins. *The EMBO Journal* 21: 898–908. https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.898
- Ito A., Zhao Q., Tanaka Y., Yasui M., Katayama R., Sun S., Tanimoto Y., Nishikawa Y., Kage-Nakadai E. 2021. Metolazone upregulates mitochondrial chaperones and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Biogerontology* 22(1): 119–131. https://doi.org/10.1007/s10522-020-09907-6
- Itoh H., Tashima Y. 1991. The stress (heat shock) proteins. *International Journal of Biochemistry* 23: 1185–1191. https://doi.org/10.1016/0020-711X(91)90214-8
- Jakob U., Buchner J. 1994. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends in Biochemical Sciences* 19(5): 205–211. https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90023-x
- Janowska M. K., Baughman H. E. R., Woods C. N., Klevit R. E. 2019. Mechanisms of small heat shock proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11: a034025. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034025
- Jaubert S., Ledger T. N., Laffaire J. B., Piotte C., Abad P., Rosso, M. N. 2002. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Molecular and Biochemical Parasitology* 121: 205–211. https://doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00034-8
- Jędrzejowska I. 2010. Krople lipidowe: nowe spojrzenie na strukturę, biogenezę i funkcje. *Postępy Biologii Komórki* 37(3): 641–655.
- Jeffers D. P., Roberts P. A. 1993. Effect of planting date and host genotype on the root-knot nematode *Fusarium* wilt disease complex of cotton. *Phytopathology* 83: 645–654.
- Jeong D. E., Lee D., Hwang S. Y. i in. 2017. Mitochondrial chaperone HSP-60 regulates antibacterial immunity via p38 MAP kinase signaling. *EMBO Journal* 36(8): 1046–1065. https://doi.org/10.15252/embj.201694781

- Jiang S., Jiang C. P., Cao P., Liu Y. H., Gao C. H., Yi X. X. 2022. Sonneradon a extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* by modulating mitochondrial and IIS signalling pathways. *Marine Drugs* 20(59): 1–14. https://doi.org/10.3390/md20010059
- Jin S., Zhang Y., Dong X., Xi Q., Song D., Fu H., Sun D. 2015. Comparative transcriptome analysis of testes and ovaries for the discovery of novel genes from Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Genetics and Molecular Research* 14: 18913–18927.
- Jo H., Shim J., Lee J. H., Lee J., Kim J. B. 2009. IRE-1 and HSP-4 contribute to energy homeostasis via fasting-induced lipases in *C. elegans. Cell Metabolism* 9(5): 440–8. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.04.004
- Johnston I. A., Dunn J. 1987. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Symposia for Experimental Biology* 41: 67–93.
- Jolly C., Morimoto R. I. 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1564–1572. https://doi.org/10.1093/jnci/92.19.1564
- Jones J. T., Haegeman A., Danchin E. G. J., Gaur H. S., Helder J., Jones M. G. K., Kikuchi T., Manzanilla-López R., Palomares-Rius J. E., Wesemael W. M. L., Perry R. N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14: 946–961. https://doi.org/10.1111/mpp.12057
- Jones L. M., Eves-Van den Akker S., Van-Oosten Hawle P., Atkinson H. J., Urwin P. E. 2018. Duplication of *hsp-110* is implicated in differential success of *Globodera* species under climate change. *Molecular Biology and Evolution* 35(10): 2401–2413. https://doi:10.1093/molbev/msy132
- Joshi P., Perni M., Limbocker R., Mannini B., Casford S., Chia S., Habchi J., Labbadia J., Dobson C. M., Vendruscolo M. 2021. Two human metabolites rescue a *C. elegans* model of Alzheimer's disease via a cytosolic unfolded protein response. *Communications Biology* 4(843): 1–14. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02218-7
- Junkersdorf B., Bauer H., Gutzeit H. O. 2000. Electromagnetic fields enhance the stress response at elevated temperatures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Bioelectromagnetics* 21(2): 100–106. https://doi.org/10.1002/(sici)1521186x(200002)
- Kaczmarek A. M., Back M., Blok V. C. 2019. Population dynamics of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, in relation to temperature, potato cultivar and nematicide application. *Plant Pathology* 68: 962–976. https://doi.org/10.1111/ppa.13002
- Kamath R. S., Fraser A. G., Dong Y., Poulin G., Durbin R., Gotta M., Kanapin A., Le Bot N., Moreno S., Sohrmann M., Welchman D. P., Zipperlen P., Ahringer J. 2003. Systematic

functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421: 231–237. https://doi.org/10.1038/nature01278

- Kammenga J. E., Arts M. S. J., Oude-Breuil W. J. M. 1998. HSP60 as a potential biomarker of toxic stress in the nematode *Plectus acuminatus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 34: 253–258. https://doi.org/10.1007/s002449900314
- Kammenga J. E., Doroszuk A., Riksen J. A. G., Hazendonk E., Spiridon L., Petrescu A. J., Tijsterman M., Plasterk R. H. A., Bakker J. 2007. A *Caenorhabditis elegans* wild type defies the temperature-size rule owing to a single nucleotide polymorphism in *tra-3*. *PLoS Genet* 3(34): 358–366. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0030034
- Kampinga H. H., Hageman J., Vos M. J., Kubota H., Tanguay R. M., Bruford E. A., Cheetham M. E., Chen B., Hightower L. E. 2009. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14: 105–111. https://doi.org/10.1007/s12192-008-0068-7
- Kapulkin W. J., Hiester B. G., Link C. D. 2005. Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans. FEBS Letters* 579: 3063–3068. https://doi.org/10.10 16/j.febslet.2005.04.062
- Karssen G. 1999. The plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne* Göldi, 1892 (*Tylenchida*) in Europe. Praca doktorska. Universiteit Gent, Departement Biologie.
- Karssen G., Brzeski M. W. 1998. *Meloiogyne* Göldi, 1892. W: Brzeski M. W. (red.). Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe. Muzeum i Instytut Zoologii PAN. Warszawa, s. 242–263.
- Karssen G., Moens M. 2006. Root-knot Nematodes. W: Perry R. N., Moens M. (red.). Plant nematology. CABI Publishing, s. 59–90.
- Katan J., Greenberger A., Alon H., Grinstein A. 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soilborne pathogens. *Phytopathology* 66: 683–688.
- Kaźmierczuk A., Kiliańska Z. M. 2010. Rola białek szoku cieplnego w apoptozie komórek. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 64: 273–276.
- Kegel K. B., Iwaki A., Iwaki T., Goldman J. E. 1996. AlphaB-crystallin protects glial cells from hypertonic stress. *American Journal of Physiology* 270: C903–C909. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.270.3.C903
- Khan A., Wesemael W., Moens M. 2014. Influence of temperature on the development of the temperate root-knot nematodes *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax. Russian Journal of Nematology* 22(1): 1–9.

- Khan N. U., Sajid M., Bibi S., Rehman W., Alanazi M. M., Abdellatif M. H. 2023. Nematicidal characterization of *Solanum nigrum* and *Mentha arvensis* leaf extracts using *Caenorhabditis elegans* as a model organism. ACS Omega 8(10): 9454–9463. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c08124
- Kiliańska Z. M. 2002. Apoptoza organizmow zwierzęcych. W: Kłyszejko-Stefanowicz L. (red.). Cytobiochemia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 772–815.
- Kiliańska Z. M., Ptasińska A. 1999. Zmiany w jądrach komórkowych wywołane szokiem termicznym. *Folia Biochemica et Biophysica* 14: 103–122.
- Kim H. E., Grant A. R., Simic M. S., Kohnz R. A., Nomura D. K., Durieux J., Riera C. E., Sanchez M., Kapernick E., Wolff S., Dillin A. 2016. Lipid biosynthesis coordinates a mitochondrial-to-cytosolic stress response. Cell 166(6): 1539–1552. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.027
- Kim S. J., Beak S. M., Park S. K. 2017. Supplementation with triptolide increases resistance to environmental stressors and lifespan in *C. elegans. Journal of Food Science* 82: 1484– 1490. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13720
- Kimura K., Tanaka N., Nakamura N., Takano S., Ohkuma S. 2007. Knockdown of mitochondrial heat shock protein 70 promotes progeria-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans. Journal of Biological Chemistry* 282(8): 5910–8. https://doi.org/10.1074/jbc.M609025200
- King A. D., Karoly D. J. 2017. Climate extremes in Europe at 1.5 and 2 degrees of global warming. *Environmental Research Letters* 12: 114031. https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa8e2c
- Kinloch R. A., Allen M. W. 1972. Interaction of *Meloidogyne hapla* and *M. javanica* infecting tomato. *Journal of Nematology* 4(1): 7–16.
- Kirstein J., Arnsburg K., Scior A., Szlachcic A., Guilbride D. L., Morimoto R. I., Bukau B., Nillegoda N. B. 2017. In vivo properties of the disaggregase function of J-proteins and Hsc70 in *Caenorhabditis elegans* stress and aging. *Aging Cell* 16(6): 1414–1424. https://doi.org/10.1111/acel.12686
- Klapper M., Ehmke M., Palgunow D., Böhme M., Matthäus C., Bergner G., Dietzek B., Popp J., Döring F. 2011. Fluorescence-based fixative and vital staining of lipid droplets in *Caenorhabditis elegans* reveal fat stores using microscopy and flow cytometry approaches. *Journal of Lipid Research* 52(6): 1281–1293. https://doi.org/10.1194/jlr.D011940

- Klass M. R., 1977. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. *Mechanisms of Ageing and Development* 6: 413–429.
- Klukowski Z. 2006. Możliwości wykorzystania nicieni (*Nematoda*) jako indykatorów zdrowotności gleby. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Rolnictwo LXXXIX* 546: 115–123.
- Koenning S. R., Overstreet C., Noling J. W., Donald P. A., Becker J. O., Fortnum B. A. 1999. Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. *Journal of Nematology* 31(4): 587–618.
- Kokke B. P. A., Leroux M. R., Candido E. P. M., Boelens W. C., de Jong W. W. 1998. *Caenorhabditis elegans* small heat-shock proteins Hspl2.2 and Hspl2.3 form tetramers and have no chaperone-like activity. *FEBS Letters* 433: 228–232. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00917-x
- Korzeniewski B. 1995. Metabolizm. Oficyna wydawnicza Erem-Fosze.
- Kourtis N., Nikoletopoulou V., Tavernarakis N. 2012. Small heat-shock proteins protect from heat-stroke-associated neurodegeneration. *Nature* 490: 213–221. https://doi.org/10.1038/nature11417
- Koyuncu S., Loureiro R., Lee H. J., Wagle P., Krueger M., Vilchez D. 2021. Rewiring of the ubiquitinated proteome determines ageing in *C. elegans. Nature* 596: 285–290. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03781-z
- Krause M. 2013. Structural and functional characterization of small Heat shock proteins of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Praca doktorska. Department Chemie Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München.
- Kregel K. C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* 92: 2177–2186. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01267.2001
- Kruth H. S. 1984. Filipin-positive, Oil red O-negative particles in atherosclerotic lesions induced by cholesterol feeding. *Laboratory Investigation* 50: 8293.
- Kubota H. 2009. Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. *Journal of Biochemistry* 146: 609–616. https://doi.org/10.1093/jb/mvp139
- Kumarasingha R., Palombo E. A., Bhave M., Yeo T. C., Lim D. S. L., Tu C. L., Shaw J. M., Boag P. R. 2014. Enhancing a search for traditional medicinal plants with anthelmintic action by using wild type and stress reporter *Caenorhabditis elegans* strains as screening

tools. International Journal for Parasitology 44: 291–298. http://dx.doi.org/10.1016 /j.ijpara.2014.01.008

- Kundu A., Dutta A., Mandal A. i in. 2021. A comprehensive *in vitro* and *in silico* analysis of nematicidal action of essential oils. *Frontiers in Plant Science* 11: 614143. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.614143
- Labbadia J., Brielmann R. M., Neto M. F., Lin Y. F., Haynes C. M., Morimoto R. I. 2017. Mitochondrial stress restores the heat shock response and prevents proteostasis collapse during aging. *Cell Reports* 21(6): 1481–1494. https://doi.org/10.1016/j.celrep. 2017.10.038
- Labbadia J., Morimoto R. I. 2015. Repression of the heat shock response is a programmed event at the onset of reproduction. *Molecular Cell* 59(4): 639–50. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.027
- Łabno G. 2006. Ekologia. Słownik encyklopedyczny. Wydawnictwo Europa, Wrocław.
- Lahtinen A. E., Trudgill D. L., Tiilikkala K. 1988. Treshold temperature and minimum thermal time requirements for the complete life cycle of *Meloidogyne hapla* from northern Europe. *Nematologica* 34: 443–451.
- Lanneau D., Brunet M., Frisan E., Solary E., Fontenay M., Garrido C., 2008. Heat shock proteins essentials proteins for apoptosis regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12: 743–761. http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x
- Laughlin C. W., Williams A. S., Fox J. A. 1969. The influence of temperature on development and sex differentiation of *Meloidogyne graminis*. *Journal of Nematology* 1: 212–215.
- Lee D. L., Atkinson H. J. 1976. The physiology of nematodes. Red Globe Press London, 2nd edition. London, UK, Macmillan Press. https://doi.org/10.1007/978-1-349-02667-8
- Lee D., An S. W. A., Jung Y., Yamaoka Y., Ryu Y., Goh G. Y. S., Beigi A., Yang J. S., Jung G. Y., Ma D. K., Ha C. M., Taubert S., Lee Y., Lee S. V. 2019. MDT-15/MED15 permits longevity at low temperature via enhancing lipidostasis and proteostasis. *PLoS Biology* 17(8): e3000415. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000415
- Leitão D. A. H. S., Pedrosa E. M. R., Dickson D. W., Oliveira A. K. S., Rolim M. M. 2021. Temperature: a driving factor for *Meloidogyne floridensis* migration toward different hosts. *Journal of Nematology* 54: 1–10. https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-074
- Lepock J. R., Frey H. E., Ritchie K. P. 1993. Protein denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock. *The Journal of Cell Biology* 122(6): 1267– 1276.

- Li W. H., Shi Y. C., Chang C. H., Huang C. W., Liao V. H. Ch. 2014. Selenite protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative stress via DAF-16 and TRXR-1. *Molecular Nutrition & Food Research* 58: 863–874. https://doi.org/10.1002/mnfr.201300404863
- Li Y., Guan S., Liu C., Chen X., Zhu Y., Xie Y., Wang J., Ji X., Li L., Li Z., Zhang Y., Zeng X., Li M. 2018. Neuroprotective effects of *Coptis chinensis* Franch polysaccharide on amyloid-beta (Aβ)-induced toxicity in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease (AD). *International Journal of Biological Macromolecules* 113: 991–995. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.035
- Lilley C. J., Bakhetia M., Charlton W. L., Urwin P. E. 2007. Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. *Molecular Plant Pathology* 8: 701–711.
- Liu L., Ruediger C., Shapira M. 2018. Integration of stress signaling in *Caenorhabditis elegans* through cell-nonautonomous contributions of the jnk homolog kgb-1. *Genetics* 210(4): 1317–1328. https://doi.org/10.1534/genetics.118.301446
- Liu P., Li D., Li W., Wang D. 2019. Mitochondrial unfolded protein response to microgravity stress in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports* 9: 16474. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53004-9
- Liu W., Saint D. A. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry* 302: 52–59. https://doi.org/10.1006/abio.2001.5530
- Liu Y., Samuel B. S., Breen P. C., Ruvkun G. 2014. *Caenorhabditis elegans* pathways that surveil and defend mitochondria. *Nature* 508(7496): 406–10. https://doi.org/10.1038/nature13204
- Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime PCR and 2-ΔΔCT method. *Methods* 25: 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262
- Losi V., Moreno M., Gaozza L., Vezzulli L., Fabiano M., Albertelli G. 2013. Nematode biomass and allometric attributes as indicators of environmental quality in a Mediterranean harbour (Ligurian Sea, Italy). *Ecological Indicators* 30: 80–89. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.01.034
- Lourenço-Tessutti I. T., Souza Junior J. D., Martins-de-Sa D. i in. 2015. Knock-down of heatshock protein 90 and isocitrate lyase gene expression reduced root-knot nematode reproduction. *Phytopathology* 105(5): 628–37. https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0237-R

- Lu C. J., Meng Y., Wang Y. L., Zhang T., Yang G. F., Mo M. H., Ji K. F., Liang L. M., Zou C. G., Zhang K. Q. 2022. Survival and infectivity of second-stage root-knot nematode *Meloidogyne incognita* juveniles depend on lysosome-mediated lipolysis. *Biological Chemistry* 298(3): 101637 1–13. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101637
- Lu M., Tan L., Zhou X. G., Yang Z. L., Zhu Q., Chen J. N., Luo H. R., Wu G. S. 2020. Tectochrysin increases stress resistance and extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via FOXO/DAF-16. *Biogerontology* 21(5): 669–682. https://doi.org/10.1007 /s10522-020-09884-w
- Luo Y., Zhang J., Liu N., Luo Y., Zhao B. 2011. Copper ions influence the toxicity of βamyloid(1-42) in a concentration-dependent manner in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Science China Life Sciences* 54(6): 527–34. https://doi.org/10.1007/s11427-011-4180-z
- Mahmud R. 2014. The importance of the gelatinous matrix for the survival of eggs of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax. Ghent University, Department of Biology* 1–32.
- Majdi N., Traunspurger W., Fueser H., Gansfort B., Laffaille P., Maire A. 2019. Effects of a broad range of experimental temperatures on the population growth and body-size of five species of free-living nematodes. *Journal of Thermal Biology* 1–30. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.010
- Maleita C., Curtis R., Abrantes I. 2012. Thermal requirements for the embryonic development and life cycle of *Meloidogyne hispanica*. *Plant Pathology* 61: 1002–1010. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02576.x
- Malek R. B. 1980. Population response to temperature in the subfamily Tylenchorhynchinae. *Journal of Nematology* 12: 1–6.
- Malik J. A., Lone R. 2021. Heat shock proteins with an emphasis on HSP 60. *Molecular Biology Reports* 48(10): 6959–6969. https://doi.org/10.1007/s11033-021-06676-4
- Maman M., Marques F. C., Volovik Y., Dubnikov T., Bejerano-Sagie M., Cohen E. 2013. A neuronal GPCR is critical for the induction of the heat shock response in the nematode *C. elegans. Journal of Neuroscience* 33(14): 6102–6111. https://doi.org/10.1523 /JNEUROSCI.4023-12.2013
- Manière X., Krisko A., Pellay F. X., Di Meglio J-M., Hersend P., Matic I. 2014. High transcript levels of heat-shock genes are associated with sorter lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Gerontology* 60: 12–17. http://dx.doi.org/10.1016/j.exger. 2014.09.005

- Marcinowski K. 1909. Parasitisch und semiparasitisch an Pflanzen lebende Nematoden. Arbeiten aus der Kaiserlichen Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin 7: 1–192.
- Martinez L., Wu S., Owen-Smith P., Patton M., Collins S., Rudgers J. 2023. Soil nematode assemblages respond to interacting environmental changes. *Preprint from Research Square* 1–38. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2394380/v1
- Massie M. R., Lapoczka E. M., Boggs K. D., Stine K. E., White G. E. 2003. Exposure to the metabolic inhibitor sodium azide induces stress protein expression and thermotolerance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Stress & Chaperones* 8(1): 1–7. http://dx.doi.org/10.1379/1466-1268(2003)8<1:ettmis>2.0.co;2
- Maulana M. I., Riksen J. A. G., Snoek B. L., Kammenga J. E., Sterken M. G. 2022. The genetic architecture underlying body-size traits plasticity over different temperatures and developmental stages in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* 128(5): 313–324. https://doi.org/10.1038/s41437-022-00528-y
- McCarthy M. A. 2015. Approaches to statistical inference. W: Fox G. A., Negrete-Yankelevich S., Sosa V. J. (red.). Ecological statistics: contemporary theory and application. Oxford University Press, Oxford, s. 15–43.
- Melakeberhan H., Ferris H. 1988. Growth and energy demand of *Meloidogyne incognita* on susceptible and resistant *Vtis vinifera* cultivars. *Journal of Nematology* 20(4): 545–554.
- Melton T. A., Jacobsen B. J., Noel G. R. 1986. Effects of temperature on development of *Heterodera glycines* on *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Nematology* 18(4): 468–74.
- Meneely P. M., Dahlberg C. L., Rose J. K. 2019. Working with worms: Caenorhabditis elegans as a model organism. Current Protocols Essential Laboratory Techniques 19: 1– 35. https://doi.org/10.1002/cpet.35
- Menoret A., Chandawarkar R. Y., Srivastava P. K. 2000. Natural autoantibodies against heatshock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins. *Immunology* 101: 364–370. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00127.x
- Mitkowski N. A., Van der Beek J. G., Abawi G. S. 2002. Characterization of root-knot nematode populations associated with vegetables in New York State. *Plant Disease* 86: 840–847. https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.8.840
- Moens M., Perry R. N., Starr J. L. 2009. *Meloidogyne* Species a diverse group of novel and important plant parasites. W: Perry R. N., Moens M., Starr J. L. (red.). Root-knot nematodes. CABI Head Office, s. 1–17.

- Morimoto R. I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development* 12: 3788–3796. https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3788
- Morley J. F., Morimoto R. I. 2004. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Molecular Biology of the Cell* 15: 657–664. https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0532.
- Morris K. S., Horgan F. G., Downes M. J., Griffin C. T. 2011. The effect of temperature on hatch and activity of second-stage juveniles of the root-knot nematode, *Meloidogyne minor*, an emerging pest in north-west Europe. *Nematology* 13(8): 985–993. https://doi.org/10.1163/138855411X571902
- Mugniéry D. 2007. The canon of potato science: 15. Root-knot Nematodes. *Potato Research* 50: 263–265. https://doi.org/10.1007/s11540-008-9048-7
- Mullaney B. C., Ashrafi K. 2009. *C. elegans* fat storage and metabolic regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1791: 474–478. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.12.013
- Mulvihill E. 2014. Transcriptomic and proteomic analysis of anhydrobiosis in *Panagrolaimus superbus* and *Caenorhabditis elegans* dauer larvae. Praca doktorska. Department of Biology National University of Ireland Maynooth Co. Kildare.
- Munoz-Lobato F., Rodriguez-Palero M. J., Naranjo-Galindo F. J., Shephard F., Gaffney C. J., Szewczyk N. J., Hamamichi S., Caldwell K. A, Caldwell G. A., Link C. D., Miranda-Vizuete A. 2014. Protective role of DNJ-27/ERdj5 in *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 20(2): 217–235. https://doi.org/10.1089/ars.2012.5051
- Murray D. L., Bastille-Rousseau G., Beaty L. E., Hornseth M. L., Row J. R., Thornton D. H. 2020. From research hypothesis to model selection. W: Murray D. L., Sandercock B. K. (red.). Population ecology in practice. John Wiley & Sons, s. 17–45.
- Mutwakil M. H., Reader J. P., Holdich D. M., Smithurst P. R., Candido E. P. M., Jones D., Stringham E. G., de Pomerai D. I. 1997. Use of stress-inducible transgenic nematodes as biomarkers of heavy-metal pollution in water samples from an English river system. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32(2): 146–153.
- Nischwitz C., Skantar A., Handoo Z. A., Hult M. N., Schmitt M. E., McClure M. A. 2013. Occurrence of *Meloidogyne fallax* in North America, and molecular characterization of *M. fallax* and *M. minor* from U.S. golf course greens. *Plant Disease* 97(11): 1424–1430. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0263-RE

- Niu J., Jian H., Xu J., Chen C., Guo Q., Liu Q., Guo Y. 2012. RNAi silencing of the *Meloidogyne incognita Rpn7* gene reduces nematode parasitic success. *European Journal* of Plant Pathology 134: 131–144. https://doi.org/10.1007/s10658-012-9971-y
- Nowell M. A., De Pomerai D. I., Pritchard D. I. 1999. Caenorhabditis elegans as a biomonitor for immunological stress in nematodes. Parasite Immunology 20(10): 495– 505. https://doi.org 10.1046/j.1365-3024.1999.00249.x
- Nsengimana J., Bauters L., Haegeman A., Gheysen G. 2013. Silencing of Mg-pat-10 and Mgunc-87 in the plant parasitic nematode Meloidogyne graminicola using siRNAs. Agriculture 3: 567–578. https://doi.org/10.3390/agriculture3030567
- Olive P. J. W. 1995. Annual breeding cycles in marine invertebrates and environmental temperature: Probing the proximate and ultimate causes of reproductive synchrony. *Journal of Thermal Biology* 20: 79–90.
- Olthof T. H. A., Potter J. W. 1972. Relationship between population densities of *Meloidogyne hapla* and crop losses in summer-maturing vegetables in Ontario. *Phytopathology* 62: 981–986.
- Omer Z. S., Wallenhammar A. C., Viketoft M. 2022. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and analysis of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* in soil. *Horticulturae* 8: 87. https://doi.org/10.3390 /horticulturae8020087
- Opperman C. H., Bird D. M., Williamson V. M., Rokhsar D. S., Burke M., Cohn J., Cromer J., Diener S., Gajan J., Graham S., Houfek T. D., Liu Q., Mitros T., Schaff J., Shaffer R., Scholl E., Sosinski B. R., Thomas V. P., Windham E., 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proceedings of the National Academy of Science* 105(39): 14802–14807. https://doi.org/10.1073/pnas.0805946105
- Pagliuso D. C., Bodas D. M., Pasquinelli A. E. 2021. Recovery from heat shock requires themicroRNA pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 17(8): e1009734. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009734
- Pant A., Krishnakumar K. C., Dileep N. C., Yamana M., Alamelu N. M., Paithankar K., Amash V., Subbarao S. A. 2021. Hsp90 and its mitochondrial homologue TRAP-1 independently regulate hypoxia adaptations in *Caenorhabditis elegans*. *Mitochondrion* 60: 101–111. https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.08.002

- Papsdorf K., Sacherl J., Richter K. 2014. The balanced regulation of Hsc70 by DNJ-13 and UNC-23 is required for muscle functionality. *Journal of Biological Chemistry* 289(36): 25250–61. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.565234
- Papsdorf K., Sima S., Schmauder L., Peter S., Renner L., Hoffelner P., Richter K. 2019. Head-bent resistant Hsc70 variants show reduced Hsp40 affinity and altered protein folding activity. *Scientific Reports* 9(1): 11955. https://doi.org/10.1038/s41598-019
- Parcellier A., Gurbuxani S., Schmitt E., Solary E., Garrido C. 2003. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304: 505–512. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00623-5
- Parida L., Neogi S., Padmanabhan V. 2014. Effect of temperature pre-exposure on the locomotion and chemotaxis of *C. elegans. PLoS One* 9(10): e111342. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111342
- Pauly D. 1980. On the interrelationships between natural mortality, growth parameters, and mean environmental temparature in fish stocks. *Journal du Conseil* 39: 175–192.
- Pearse A. G. E. 1968. Histochemistry. Theoretical and applied. Churchill, London.
- Pétavy G., Moreteau B., Gibert P., Morin J. P., David J. R., 2001. Phenotypic plasticity of body size in *Drosophila*: Effects of a daily periodicity of growth temperature in two sibling species. *Physiological Entomology* 26: 351–361. https://doi.org/10.1046/j.0307-6962.2001.00255.x.
- Pfaffl M. W. 2003. Live stock transcriptomics: quantitative mRNA analytics in molecular endocrinology and physiology. Praca habilitacyjna. Technische Universität München Weihenstephan.
- Pilch W., Piotrowska A., 2011. Families of heat shock proteins and their role in response to exercise. *Antropomotoryka* 54: 1–11.
- Pinkerton J. N., Mojtahedi H., Santo G. S., O'Bannon J. H. 1987. Vertical migration of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* under controlled temperature. *Journal of Nematology* 19: 152–157.
- Ploeg A. T., Maris P. C. 1999. Effects of temperature on the duration of the life cycle of a *Meloidogyne incognita* population. *Nematology* 1: 389–393.
- Polanowska-Grabowska R., Gear A. R., 2000. Heat shock proteins and platelet function. *Platelets* 11: 6–22. https://doi.org/10.1080/09537100075742
- Poulain P., Gelly J. C., Flatters D. 2010. Detection and architecture of small heat shock protein monomers. *PLoS ONE* 5: e9990. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009990

- Prassinos C., Haralampidis K., Milioni D., Samakovli D., Krambis K., Hatzopoulos P. 2008. Complexity of Hsp90 in organelle targeting. *Plant Molecular Biology* 67: 323–334. https://doi.org/10.1007/s11103-008-9322-8
- Prithika U., Deepa V., Balamurugan K. 2016. External induction of heat shock stimulates the immune response and longevity of *Caenorhabditis elegans* towards pathogen exposure. *Innate Immunity* 22(6): 466–478. https://doi.org/10.1177/1753425916654557
- Prot J. 1980. Migration of plant-parasitic nematodes towards plant roots. *Revue de Nématologie* 3: 305–18.
- Prot J. C., Van Gundy S. D. 1981. Influence of photoperiod and temperature on migrations of *Meloidogyne* juveniles. *Journal of Nematology* 13(2): 217–220.
- Qiu X.-B., Shao Y.-M., Miao S., Wang L. 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 2560– 2570. https://doi.org/10.1007/s00018-006-6192-6
- R Core Team 2022. R: A languague and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/
- Ramos A. R. B. 2012. The consequences of stochastic gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Praca doktorska. Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.
- Ramos C. H., Oliveira C. L., Fan C. Y., Torriani I. L., Cyr D. M. 2008. Conserved central domains control the quaternary structure of type I and type II Hsp40 molecular chaperones. *Journal of Molecular Biology* 383(1): 155–166. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.019
- Rao T. R. 2021. Body size matters in the lives of organisms. *Resonance* 26(1): 61–71. https://doi.org/10.1007/s12045-020-1105-9
- Ray A., Rentas C., Caldwell G. A., Caldwell K. A. 2015. Phenazine derivatives cause proteotoxicity and stress in *C. elegans. Neuroscience Letters* 584: 23–27. http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.055
- Rebois R. V. 1973. Effect of soil temperature on infectivity and development of *Rotylenchulus reniformis* on resistant and susceptible soybeans, *Glycine max. Journal of Nematology* 5: 10–13.
- Regitz C., Dubling L. M., Wenzel U. 2014. Amyloid-beta (Aβ<sub>1-42</sub>)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. *Molecular Nutrition and Food Research* 58(10): 1931–40. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400014

- Richter K. 2015. daf-41/p23: a small protein heating up lifespan regulation. *PLoS Genet* 11(7): e1005188. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005188
- Ritossa F. 1962. A new paffi ng pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila melanogaster. Experientia* 18: 571–573.
- Roberts P. A. 1987. The influence of planting date of carrot on *Meloidogyne incognita* reproduction and injury to roots. *Nematologica* 33: 335–342.
- Robinson A. F., Perry R. N. 2006. Behaviour and sensory perception. W: Perry R. N., Moens M. (red.). Plant nematology. CABI Publishing, s. 210–233.
- Robinson M. P., Atkinson H. J., Perry R. N. 1987. The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida. Revue de Nématologie* 10(3): 343–348.
- Rocha F. S., Campos V. P., Catão H. C. R. M., Muniz M. D. F. S., Civil N. 2015. Correlations among methods to estimate lipid reserves of second-stage juveniles and its relationships with infectivity and reproduction of *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 17: 345–352. https://doi.org/ 10.1163/15685411-00002871
- Rocha F., Campos V. P., Souza J. T. 2010. Variation in lipid reserves of second-stage juveniles of *Meloidogyne exigua* in a coffee field and its relationship with infectivity. *Nematology* 12(3): 365–371. https://doi.org/10.1163/138855409X12548945788367
- Rödelsperger C., Streit A., Sommer R. J. 2013. Structure, function and evolution of the nematode genome. *John Wiley & Sons* 1–9. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0024603
- Rodrigues A. J., Neves-Carvalho A., Teixeira-Castro A. i in. 2011. Absence of ataxin-3 leads to enhanced stress response in *C. elegans. PLoS ONE* 6(4): e18512. https://doi:10.1371/journal.pone.0018512
- Roh J. Y., Park S. Y., Choi J. 2006. Cadmium toxicity monitoring using stress related gene expressions in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular & Cellular Toxicology* 2(1): 54–59.
- Rosso M. N., Favery B., Piotte C., Arthaud L., De Boer J. M., Hussey R. S., Bakker J., Baum T. J., Abad P. 1999. Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 585–91. https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.7.585

- Ryan C. P., Brownlie J. C., Whyard S. 2016. Hsp90 and physiological stress are linked to autonomous transposon mobility and heritable genetic change in nematodes. *Genome Biology and Evolution* 8(12): 3794–3805. https://doi.org/10.1093/gbe/evw284
- Saini A. R. K., Tyler R. T., Shim Y. Y., Reaney M. J. T. 2011. Allyl isothiocyanate induced stress response in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Research Notes* 4: 502. https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-502
- Sánchez-Blanco A., Rodríguez-Matellán A. G., Reis-Sobreiro M., Sáenz-Narciso B., Cabello J., Mohler W. A., Mollinedo F. 2014. *Caenorhabditis elegans* as a platform to study the mechanism of action of synthetic antitumor lipids. *Cell Cycle* 13(21): 3375–89. https://doi.org/10.4161/15384101.2014.952183
- Sandground J. H. 1923. 'Oxyuris incognita' or Heterodera radicicola? Journal of Parasitology 10: 92–94.
- Sandner G., Mueller A. S., Zhou X. i in. 2020. Ginseng extract ameliorates the negative physiological effects of heat stress by supporting heat shock response and improving intestinal barrier integrity: evidence from studies with heat-stressed caco-2 cells, *C. elegans* and growing broilers. *Molecules* 25(4): 835. https://doi.org/10.3390/molecules25040835
- Sasser J. N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64: 36–41.
- Schmauder L., Absmeier E., Bepperling A., Barkovits K., Marcus K., Richter K. 2021. Nematode CDC-37 and DNJ-13 form complexes and can interact with HSP-90. *Scientific Reports* 11(1): 21346. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00885-4
- Schmidt-Nielsen K. 2008. Fizjologia zwierząt. Adaptacja do środowiska. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Schmitt E., Gehrmann M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C. 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology* 81: 15–27. https://doi.org/10.1189/jlb.0306167
- Schulte P. M. 2015. The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *Journal of Experimental Biology* 218: 1856–66. https://doi.org 10.1242/jeb.118851
- Seid A., Fininsa C., Mekete T., Decraemer W., Wesemael W. M. L. 2015. Tomato (Solanum lycopersicum) and root-knot nematodes (Meloidogyne spp.) a century-old battle. Nematology 17(9): 995–1009. https://doi.org/10.1163/15685411-00002935

- Selvan S., Gaugler R., Lewis E. E. 1993. Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *Journal of Parasitology* 79: 167–172. https://doi.org/10.2307/3283503
- Selye H., 1956. The stress of life. New York: McGraw-Hill.
- Seybold A. 2015. Molecular adaptation mechanisms in the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. Praca doktorska. University of Otago, Dunedin, New Zealand.
- Shah S. M., Saini N., Ashraf S., Kumar G. R. 2012. Gene silencing, mechanism and applications. *DHR International Journal of Biomedical and Life Sciences* 3(1): 114–126. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003
- Shan Q., Ma F., Wei J., Li H., Ma H., Sun P. 2020. Physiological functions of heat shock proteins. *Current Protein and Peptide Science* 21(8): 751–760. https://doi.org/10.2174/1389203720666191111113726
- Sharon E., Spiegel Y. 1993. Glycoprotein characterization of the gelatinous matrix in the rootknot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 25: 585–589.
- Shehata A. M., Saadeldin I. M., Tukur H. A., Habashy W. S. 2020. Modulation of heat-shock proteins mediates chicken cell survival against thermal stress. *Animals* 10(12): 2407. https://doi.org/10.3390/ani10122407
- Shen X., Ellis R. E., Lee K., Liu C. Y., Yang K., Solomon A., Yoshida H., Morimoto R., Kurnit D. M., Mori K., Kaufman R. J. 2001. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 107(7): 893–903. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00612-2
- Shi L., Yu X. T., Li H., Wu G. S., Luo H. R. 2023. D-chiro-inositol increases antioxidant capacity and longevity of *Caenorhabditis elegans* via activating Nrf-2/SKN-1 and FOXO/DAF-16. *Experimental Gerontology* 175: 112145. https://doi.org/10.1016/j.exger.2023.112145
- Shi X., Li J., Zou X., Greggain J., Rodkaer S. V., Faergeman N. J., Liang B., Watts J. L. 2013. Regulation of lipid droplet size and phospholipid composition by stearoyl-CoA desaturase. *Journal of Lipid Research* 54: 2504–2514. https://doi.org/10.1194/jlr.M039669
- Shim J., Im S. H., Lee J. 2003. Tissue-specifc expression, heat inducibility, and biological roles of two *hsp16* genes in *Caenorhabditis elegans*. *Federation of European Biochemical Societies* 537: 139–145. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00111-x
- Shivakumara T. N., Dutta T. K., Mandal A., Rao U. 2018. Estimation of lipid reserves in different life stages of *Meloidogyne incognita* using image analysis of Nile Red-stained nematodes. *Nematology* 0: 1–8. http://dx.doi.org/10.1163/15685411-00003212

- Simmer F., Moorman C., Van der Linden A. M., Kuijk E., Van den Berghe P. V., Kamath R. S., Fraser A. G., Ahringer J., Plasterk R. H. 2003. Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive *rrf-3* strain reveals novel gene functions. *PLOS Biology* 1: 077–084. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000012
- Singh K. P., Jaiswal R. K., Kumar N., Kumar D. 2006. Biomass of nematode and associated roots: a determinant of symptom production in root knot disease of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Phytopathology* 154: 676–682. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01170.x
- Singh S. K., Hodda M., Ash G. J., Banks N. C. 2013. Plant-parasitic nematodes as invasive species: characteristics, uncertainty and biosecurity implications. *Annals of Applied Biology* 163: 323–350. https://doi.org/10.1111/aab.12065
- Skantar A. M., Carta L. K. 2004. Molecular characterization and phylogenetic evaluation of the hsp90 gene from selected nematodes. *Journal of Nematology* 36(4): 466–80.
- Skantar A., Carta L., Handoo Z. 2008. Molecular and morphological characterization of an unusual *Meloidogyne arenaria* population from traveler's tree, *Ravenala madagascariensis*. *Journal of Nematology* 40(3): 179–189.
- Skwiercz A., Dobosz R., Flis Ł., Damszel M., Litwińczuk W. 2019. First report of Meloidogyne hapla on Paulownia tomentosa in Poland. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 88(3): 3628. https://doi.org/10.5586/asbp.3628
- Smolik J. D., Lewis J. K. 1982. Effect of range condition on density and biomass of nematodes in a mixed prairie ecosystem. *Journal of Range Management* 35: 657–663. https://doi.org/10.2307/3898658
- Snutch T. P., Heschl M. F. P., Baillie D. L. 1988. The *Caenorhabditis elegans hsp*70 genefamily: a molecular genetic characterization. *Gene* 64: 241–255.
- So S., Garan Y., Miyahara K., Ohshima Y. 2012. Body size change in various nematodes depending on bacterial food, sex and growth temperature. *Worm* 1(2): 93–97. https://doi.org/10.4161/worm.20175
- Soo S. K., Traa A., Rudich P. D., Mistry M., Van Raamsdonk J. M. 2021. Activation of mitochondrial unfolded protein response protects against multiple exogenous stressors. *Life Science Alliance* 4(12): e202101182. https://doi.org/10.26508/lsa.202101182
- Stephan Z. A. 1983. The effect of different densities of *Meloidogyne ardenensis* and of three populations of *M. hapla* on the growth of tomato at four soil temperatures. *Nematologia Mediterranea* 11: 93–100.

- Stephan Z. A., Trudgill D. L., 1982. Development of four populations of *Meloidogyne hapla* on two cultivars of cucumber at different temperatures. *Journal of Nematology* 14: 545– 549.
- Stringham E. G., Dixon D. K., Jones D., Candido E. P. M. 1992. Temporal and spatial expression patterns of small heat shock (*hsp16*) genes in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell* 3(2): 221–233. https://doi.org/10.1091/mbc.3.2.221
- Sturhan D. 1968. Untersuchungenubar des eindringen von stengelalchen (*Dittylenchus dipsaci*) in Nichtiate. *Mededelingen Rijksuniversiteit te Gent Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen* 33: 679–685.
- Sumita K., Das D. 2016. Effect of temperatures on embryogenesis of *Meloidogyne incognita*. *Annals of Plant Protection Sciences* 24: 163–166.
- Suzuki M., Shinohara Y., Ohsaki Y., Fujimoto T. 2011. Lipid droplets: size matters. *Journal* of *Electron Microscopy* 60(1): 101–116. https://doi.org/10.1093/jmicro/dfr016
- Takatsu K., Selz O. M., Brodersen J. 2022. Temperature regime during embryogenesis alters subsequent behavioural phenotypes of juvenile brown trout. *Biology Letters* 18: 20220369. https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0369
- Takayanagi-Kiya S., Jin Y. 2016. Altered function of the DnaJ family cochaperone DNJ-17 modulates locomotor circuit activity in a *Caenorhabditis elegans* seizure model. *Genes, Genomes, Genetics* 6(7): 2165–2171. https://doi.org/10.1534/g3.116.028928
- Tatli Y. A., Bozbuğa R., Özer G., Mokrini F., Lahlali R., Dababat A., İmren M. 2021. Effects of temperature and duration of storage on the hatching behaviour of *Heterodera latipons* (Nematoda: Heteroderidae). *Turkish Journal of Zoology* 45: 1–10. https://doi.org/10.3906/zoo-2008-7
- Taylor A. L., Sasser J. N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). *North Carolina State University Graphics* 1–111.
- Thai T. T., Yen N. T. M., Tan L. V., Hoai P. N., Quang N. X. 2022. The morphometry, biomass, and respiration of free living nematodes in the Ba Lai river, Ben Tre province, Vietnam. Science and Technology Development Journal - Natural Sciences 6: 1752– 1765. https://doi.org/10.32508/stdjns.v6i1.1082
- Thomason I. J., Lear B. 1961. Rate of reproduction of *Meloidogyne* spp. as influenced by soil temperature. *Phytopathology* 51: 520–524.

- Thornton B., Basu C. 2011. Real-Time PCR (qPCR) primer design using free online software. Biochemistry and Molecular Biology Education 39(2): 145–154. https://doi.org/10.1002/bmb.20461
- Tissières A., Mitchell H. K., Tracey U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanodaster, relation to chromosome puffs. Journal of Molecular Biology 84: 389–398. https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90447-1
- Tournayre J., Reichstadt M., Parry L., Fafournoux P., Jousse C. 2019. "Do my qPCR calculation", a web tool. *Bioinformation* 15(5): 369–372. https://doi.org/10.6026/97320630015369
- Treinin M., Shliar J., Jiang H., Powell-Coffman J. A., Bromberg Z., Horowitz M. 2003. HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiological Genomics* 14(1): 17–24. https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00179.2002
- Triantaphyllou A. C. 1973. Environmental sex differentiation of nematodes in relation to pest management. *Annual Review of Phytopathology* 11(1): 441–462.
- Tsai B. Y. 2008. Effect of temperature on the survival of *Meloidogyne incognita*. *Plant Pathology Bulletin* 17: 203–208.
- Tyburski J., Studzińska A., Daca P., Tretyn A. 2008. PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych. *Biotechnologia* 1(80): 86–96.
- Umesh K. C., Ferris H. 1994. Influence of temperature and host plant on the interaction between *Pratylenchus neglectus* and *Meloidogyne chitwoodi*. *Journal of Nematology* 26: 65–71.
- Ungelenk S., Moayed F., Ho C. T., Grousl T., Scharf A., Mashaghi A., Tans S., Mayer M. P., Mogk A., Bukau B. 2016. Small heat shock proteins sequester misfolding proteins in near-native conformation for cellular protection and efficient refolding. *Nature Communications* 7: 13673. https://doi.org/10.1038/ncomms13673
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: e115. https://doi.org/10.1093/nar/gks596
- Van den Hoogen J., Geisen S., Routh D., Ferris H., Traunspurger W., Wardle D. A., De Goede R. G. M., Adams B. J., Ahmad W. i in. 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* 572: 194–198.
- Van der Have T. M., De Jong G. 1996. Adult size in ectotherms: Temperature effects on growth and differentiation. *Journal of Theoretical Biology* 183: 329–340. https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0224

- Van Gundy S. D., Bird A. F., Wallace H. R. 1967. Aging starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology* 57: 559–571.
- Van Voorhies W. A. 1996. Bergmann size clines: a simple explanation for their occurrence in ectotherms. *Evolution*. 50(3): 1259–1264.
- Vinberg G. G. 1983. Temperaturnyj koefficient Vant-Goffa i uravnienie Arrieniusa v biologii. Żurnal Obsej Biologii 44 (1): 31–42.
- Vrablik T. L., Petyuk V. A., Larson E. M., Smith R. D., Watts J. L. 2015. Lipidomic and proteomic analysis of *Caenorhabditis elegans* lipid droplets and identification of ACS-4 as a lipid droplet-associated protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1851: 1337–1345. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.06.004
- Vrain T. C., Barker K. R. 1978. Influence of low temperature on development of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* eggs in egg masses. *Journal of Nematology* 10(4): 311–313.
- Vrain T. C., Barker K. R., Holtzman I. G. 1978. Influence of low temperature on rate of development of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* larvae. *Journal of Nematology* 10: 166–171.
- Wagner A., Hofmeister O., Rolland S. G., Maiser A., Aasumets K., Schmitt S., Schorpp K., Feuchtinger A., Hadian K., Schneider S., Zischka H., Leonhardt H., Conradt B., Gerhold J. M., Wolf1 A. 2019. Mitochondrial Alkbh1 localizes to mtRNA granules and itsknockdown induces the mitochondrial UPR in humans and *C. elegans. Journal of Cell Science* 132: 1–17. https://doi.org/10.1242/jcs.223891
- Wallace H. R. 1966. Factors influencing the infectivity of plant-parasitic nematodes. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 164: 592–614. https://doi.org/10.1098/rspb.1966.0050
- Wallace H. R. 1968. Dynamics of nematode movement. *Annual Review of Phytopathology* 6: 91–114.
- Wallace H. R. 1969. The influence of nematode numbers and of soil particle size, nutrients and temperature on the reproduction of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 15: 55–64.
- Wang F., Li D., Chen Q., Ma L. 2016. Genome-wide survey and characterization of the small heat shock protein gene family in *Bursaphelenchus xylophilus*. *Gene* 579(2): 153–161. https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.047
- Wang H. D., Kazemi-Esfarjani P., Benzer S. 2004. Multiple-stress analysis for isolation of Drosophila longevity genes. Proceedings of the National Academy of Sciences 101: 12610–12615. https://doi.org/10.1073/pnas.0404648101

- Weinstein D. J., Allen S. E., Lau M. C. Y., Erasmus M., Asalone K. C., Walters-Conte K., Deikus G., Sebra R., Borgonie G., Van Heerden E., Onstott T. C., Bracht J. R. 2019. The genome of a subterrestrial nematode reveals adaptations to heat. *Natural Communications* 10: 5268. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13245-8
- Welte M. A., Gould A. P. 2017. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochimica et Biophysica Acta* 1862: 1260–1272. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.006.
- Wesemael W. M. L., Viaene N., Moens M. 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology* 13(1): 3–16.
- Wesemael W. M., Moens M. 2008. Quality damage on carrots (*Daucus carota* L.) caused by the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi*. *Nematology* 10(2): 261–270. https://doi.org/10.1163/156854108783476368
- Wickham H., Averick M., Bryan J. i in. 2019. Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software* 4(43): 1686.
- Widmer T. L., Ludwig J. W., Abawi G. S. 1999. The northern root-knot nematode on carrot, lettuce, and onion in New York. *New York's Food and Life Sciences Bulletin* 156: 1–2.
- Wilson E. O. 2000. A global biodiversity map. *Science* 289(5488): 2279–2279. https://doi.org/10.1126/science.293.5534.1433b
- Wong T. K., Mai W. F. 1973. *Meloidogyne hapla* in organic soil: effects of environment on hatch, movement and root invasion. *Journal of Nematology* 5(2): 130–138.
- WormBase, http://www.wormbase.org/me#1-0-5
- Wright D. J., Perry R. N. 2006. Reproduction, physiology and biochemistry. W: Perry R. N., Moens M. (red.). Plant nematology. CABI Publishing, s. 185–202.
- Wu X., Yu H., Yang R., Zhou Y., Zhu X., Wang Y., Liu X., Fan H., Chen L., Duan Y. 2019.
  Evaluation of suitable reference genes for gene expression analysis in the northern rootknot nematode, *Meloidogyne hapla*. *PLoS One* 14(6): e0218610. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218610
- Wu X., Zhu X., Wang Y., Liu X., Chen L., Duan Y. 2018. The cold tolerance of the northern root-knot nematode, *Meloidogyne hapla*. *PLoS ONE* 13(1): e0190531. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190531
- Xie K., Zhang P., Na H., Liu Y., Zhang H., Liu P. 2019. MDT-28/PLIN-1 mediates lipid droplet-microtubule interaction via DLC-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific Reports* 9: 14902. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51399-z
- Xu X. B., Song H. M., Zhou Z. H., Shi N. N., Ying Q. C., Wang H. Z. 2010. Functional characterization of at Hsp90.3 in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*

under heat stress. *Biotechnology Letters* 32: 979–987. https://doi.org/10.1007/s10529-010-0240-x

- Yang S., Zhang X., Wang J., Wang S., Pan Y., Zhang J., Xi J. 2018. Identification and analysis of up-regulated proteins in *Lissorhoptrus oryzophilus* adults for rapid cold hardening. *Gene* 642: 9–15. https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.002
- Yang Y., Hu X., Liu P., Chen L., Peng H., Wang Q., Zhang Q. 2021. A new root-knot nematode, *Meloidogyne vitis* sp. nov. (Nematoda: Meloidogynidae), parasitizing grape in Yunnan. *PLoS ONE* 16(2): e0245201. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245201
- Yeates G. W. 1971. Feeding types and feeding groups in plant and soil nematodes. *Pedobiologia* 11: 173–179.
- Yeates G. W. 1979. Soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Journal of Nematology* 11: 213–229.
- Yeates G. W. 2003. Nematodes as soil indicators: Functional and biodiversity aspects. Biology and Fertility of Soils 37: 199–210.
- Yeates G. W., Bongers T., De Goede R. G., Freckman D. W., Georgieva S. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera – An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25: 315–331.
- Yeates G.W., Bongers T. 1999. Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 113–135. http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8809(99)
- Yoneda T., Benedetti C., Urano F., Clark S. G., Harding H. P., Ron D. 2004. Compartmentspecific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *Journal of Cell Science* 117: 4055–66. https://doi.org/10.1242/jcs.01275
- Yoon D. S., Byeon E., Kim D. H., Lee M. C., Shin K. H., Hagiwara A., Park H. G., Lee J. S. 2022. Effects of temperature and combinational exposures on lipid metabolism in aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C* 262: 109449. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109449
- Zaidi A. K. 2016. Proteome characterization of *Caenorhabditis elegans* during developmental stages. Praca doktorska. Case Western Reserve University.
- Zeis B., Buchen I., Wacker A., Martin-Creuzburg D. 2019. Temperature-induced changes in body lipid composition affect vulnerability to oxidative stress in *Daphnia magna*. *Biochemical and Molecular Biology* 232: 101–107. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.03.008
- Zeng X. C., Bhasin S., Wu X., Lee J. G., Maffi S., Nichols C. J., Lee K. J., Taylor J. P., Greene L. E., Eisenberg E. 2004. Hsp70 dynamics in vivo: effect of heat shock and

protein aggregation. *Journal* of *Cell Science* 117: 4991–5000. https://doi.org/10.1242/jcs.01373

- Zhang F., Schmitt D. P. 1995. Embryogenesis and postinfection development of *Meloidogyne konaensis*. *Journal of Nematology* 27(1): 103–108.
- Zhang H., Zhou Q., Yang Y., Chen X., Yan B., Du A. 2013. Characterization of heat shock protein 70 gene from *Haemonchus contortus* and its expression and promoter analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology* 140(6): 683–694. https://doi.org/10.1017/S0031182012002168
- Zhang P., Na H., Liu Z., Zhang S., Xue P., Chen Y., Pu J., Peng G., Huang X., Yang F., Xie Z., Xu T., Xu P., Ou G., Zhang SO., Liu P. 2012. Proteomic study and marker protein identification of *Caenorhabditis elegans* lipid droplets. *Molecular and Cellular Proteomics* 11(8): 317–28. https://doi.org/10.1074/mcp.M111.016345
- Zhang Q. Y., Ji Y. T., Wang P., Xie H., Kong H. H., Qu C. Q., 2022. Paeoniflorin protects *Caenorhabditis elegans* from heat stress. *Current Topics in Nutraceutical Research* 20(1): 43–50.
- Zhang S. O., Trimble R., Guo F., Mak H. Y. 2010. Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans. BMC Cell Biology* 11(96): 1–11. https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-96
- Zhao Y. L., Wang D. Y. 2012. Formation and regulation of adaptive response in nematode *Caenorhabditis elegans*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 1–7. https://doi.org/10.1155/2012/564093
- Zheng C., Atlas E., Lee H. M. T., Jao S. L. J., Nguyen K. C. Q., Hall D. H., Chalfie M. 2020. Opposing effects of an F-box protein and the HSP90 chaperone network on microtubule stability and neurite growth in *Caenorhabditis elegans*. *Company of Biologists* 147: 1–14. https://doi.org/10.1242/dev.189886
- Zhou J., Wu J., Huang J., Sheng X., Dou X., Lu M. 2022. A synthesis of soil nematode responses to global change factors. *Soil Biology and Biochemistry* 165: 108538. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108538
- Zuo W., Moses M. E., West G. B., Hou C., Brown J. H. 2012. A general model for effects of temperature on ectotherm ontogenetic growth and development. *Proceedings: Biological Sciences* 279(1734): 1840–6. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2000

## 9. Załączniki

Tabela 1Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*90 w stadium jaja *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 9, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,06	0,21	5,01	7,87E-06
temperatura 5°C	-0,38	0,30	-1,26	0,22
temperatura 10°C	0,07	0,30	0,24	0,82
temperatura 30°C	0,72	0,30	2,42	0,02
temperatura 35°C	3,26	0,30	10,91	1,38E-14
temperatura 40°C	0,28	0,30	0,95	0,35
czas inkubacji 2h	0,00	0,30	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	0,00	0,30	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	0,00	0,30	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,27	0,42	-0,63	0,53
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,63	0,42	-1,50	0,14
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-1,16	0,42	-2,75	0,01
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	0,64	0,42	1,52	0,14
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	0,31	0,42	0,74	0,46
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,37	0,42	0,87	0,39
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,46	0,42	-1,10	0,28
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,61	0,42	-1,44	0,16
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,94	0,42	-2,23	0,03
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-0,16	0,42	-0,37	0,71
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,17	0,42	0,41	0,68
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	-0,37	0,42	-0,88	0,38
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,30	0,42	-0,72	0,47
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-2,43	0,42	-5,75	6,12E-07
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	1,14	0,42	2,68	0,01

Tabela 2Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 9, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*90 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*90), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura inkubacji [°C]	Czas inkubacji [godzina]	Ekspresja genu <i>Mh-hsp</i> 90 [R]	Dolna wartość [R]	Górna wartość [R]	SE
5	1	0,68	0,26	1,11	0,21
10	1	1,13	0,70	1,56	0,21
20	1	1,06	0,63	1,48	0,21
30	1	1,78	1,36	2,21	0,21
35	1	4,32	3,90	4,75	0,21
40	1	1,34	0,92	1,77	0,21
5	2	0,42	-0,01	0,84	0,21
10	2	0,50	0,07	0,92	0,21
20	2	1,06	0,63	1,48	0,21
30	2	0,62	0,20	1,05	0,21
35	2	4,96	4,54	5,39	0,21
40	2	1,66	1,23	2,08	0,21
5	8	1,05	0,63	1,48	0,21
10	8	0,67	0,24	1,09	0,21
20	8	1,06	0,63	1,48	0,21
30	8	1,17	0,75	1,60	0,21
35	8	3,38	2,95	3,81	0,21
40	8	1,19	0,76	1,61	0,21

5	24	0,86	0,43	1,28	0,21
10	24	0,76	0,33	1,18	0,21
20	24	1,06	0,63	1,48	0,21
30	24	1,48	1,05	1,90	0,21
35	24	1,89	1,47	2,32	0,21
40	24	2,48	2,05	2,90	0,21

Tabela 3Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*1 w stadium jaja *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 10, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	0,99	0,13	7,73	5,72E-10
temperatura 5°C	-0,51	0,18	- 2,84	0,007
temperatura 10°C	0,09	0,18	0,51	0,611
temperatura 30°C	0,47	0,18	2,62	0,012
temperatura 35°C	3,41	0,18	18,93	< 2e-16
temperatura 40°C	-0,01	0,18	- 0,03	0,974
czas inkubacji 2h	0,00	0,18	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	0,00	0,18	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	0,00	0,18	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	0,69	0,26	2,70	0,010
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,51	0,26	- 2,01	0,050
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,37	0,26	- 1,45	0,154
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-0,20	0,26	- 0,77	0,445
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	0,14	0,26	0,53	0,597
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,89	0,26	3,48	0,001
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,19	0,26	- 0,73	0,470
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,26	0,26	- 1,00	0,321
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,27	0,26	- 1,05	0,298
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	0,01	0,26	0,05	0,957
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,35	0,26	1,38	0,175
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,28	0,26	1,10	0,277
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	0,42	0,26	1,64	0,107
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-1,18	0,26	- 4,64	2,71E-05
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	0,13	0,26	0,51	0,610

Tabela 4Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 10, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*1 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*1), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (SE).

Temperatura inkubacji [°C]	Czas inkubacji [godzina]	Ekspresja genu <i>Mh-hsp</i> 1 [R]	Dolna wartość [R]	Górna wartość [R]	SE
5	1	0,47	0,22	0,73	0,13
10	1	1,08	0,82	1,33	0,13
20	1	0,99	0,73	1,24	0,13
30	1	1,46	1,20	1,71	0,13
35	1	4,40	4,14	4,66	0,13
40	1	0,98	0,72	1,24	0,13
5	2	1,16	0,91	1,42	0,13
10	2	0,56	0,31	0,82	0,13
20	2	0,99	0,73	1,24	0,13
30	2	1,09	0,83	1,34	0,13
35	2	4,20	3,95	4,46	0,13
40	2	1,12	0,86	1,37	0,13

5	8	1,36	1,10	1,62	0,13
10	8	0,89	0,64	1,15	0,13
20	8	0,99	0,73	1,24	0,13
30	8	1,20	0,95	1,46	0,13
35	8	4,13	3,88	4,39	0,13
40	8	0,99	0,74	1,25	0,13
5	24	0,82	0,57	1,08	0,13
10	24	1,36	1,10	1,61	0,13
20	24	0,99	0,73	1,24	0,13
30	24	1,88	1,62	2,13	0,13
35	24	3 22	2.96	3 47	0 13
	21	3,22	2,70	2,11	0,10

Tabela 5Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*4 w stadium jaja *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 11, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,08	0,11	10,23	1,19E-13
temperatura 5°C	-0,25	0,15	-1,66	0,104
temperatura 10°C	0,02	0,15	0,12	0,902
temperatura 30°C	-0,16	0,15	-1,07	0,290
temperatura 35°C	0,15	0,15	1,00	0,321
temperatura 40°C	0,44	0,15	2,94	0,005
czas inkubacji 2h	0,00	0,15	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	0,00	0,15	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	0,00	0,15	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,06	0,21	-0,27	0,786
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,17	0,21	-0,80	0,427
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	0,28	0,21	1,33	0,190
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	0,79	0,21	3,76	0,000
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-0,20	0,21	-0,94	0,351
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,10	0,21	0,47	0,643
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,45	0,21	-2,15	0,037
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,19	0,21	-0,89	0,378
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,24	0,21	-1,14	0,262
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-0,27	0,21	-1,30	0,200
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,32	0,21	1,53	0,134
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	-0,47	0,21	-2,21	0,032
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	0,05	0,21	0,22	0,825
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	0,46	0,21	2,16	0,036
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	0,15	0,21	0,70	0,487

Tabela 6Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 11, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*4 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*4), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura inkubacji [°C]	Czas inkubacji [godzina]	Ekspresja genu <i>Mh-hsp</i> 4 [R]	Dolna wartość [R]	Górna wartość [R]	SE
5	1	0,83	0,62	1,05	0,11
10	1	1,10	0,89	1,31	0,11
20	1	1,08	0,87	1,29	0,11
30	1	0,92	0,71	1,13	0,11
35	1	1,23	1,02	1,44	0,11
40	1	1,52	1,31	1,73	0,11

5	2	0,78	0,56	0,99	0,11
10	2	0,93	0,72	1,14	0,11
20	2	1,08	0,87	1,29	0,11
30	2	1,20	0,99	1,41	0,11
35	2	2,02	1,81	2,24	0,11
40	2	1,32	1,11	1,53	0,11
5	8	0,93	0,72	1,14	0,11
10	8	0,64	0,43	0,86	0,11
20	8	1,08	0,87	1,29	0,11
30	8	0,73	0,52	0,95	0,11
35	8	0,99	0,78	1,20	0,11
40	8	1,24	1,03	1,46	0,11
5	24	1,16	0,94	1,37	0,11
10	24	0,63	0,42	0,84	0,11
20	24	1,08	0,87	1,29	0,11
30	24	0,97	0,76	1,18	0,11
35	24	1,69	1,47	1,90	0,11
40	24	1,67	1,45	1,88	0,11

Tabela 7Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*6 w stadium jaja *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 12, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,04	0,07	15,79	< 2e-16
temperatura 5°C	-0,03	0,09	-0,37	0,716
temperatura 10°C	-0,51	0,09	-5,52	1,37E-06
temperatura 30°C	-0,22	0,09	-2,40	0,020
temperatura 35°C	2,25	0,09	24,32	< 2e-16
temperatura 40°C	0,82	0,09	8,82	1,31E-11
czas inkubacji 2h	-0,00	0,09	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-0,00	0,09	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	0,00	0,09	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,14	0,13	-1,06	0,296
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,08	0,13	-0,65	0,521
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	0,08	0,13	0,61	0,544
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-1,82	0,13	-13,90	< 2e-16
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-0,56	0,13	-4,27	9,33E-05
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	-0,11	0,13	-0,83	0,409
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,13	0,13	-0,99	0,327
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,01	0,13	-0,06	0,952
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-1,15	0,13	-8,81	1,36E-11
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-0,82	0,13	-6,25	1,05E-07
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	-0,20	0,13	-1,50	0,140
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	-0,42	0,13	-3,18	0,003
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,13	0,13	-0,99	0,325
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-2,56	0,13	-19,51	< 2e-16
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-0,67	0,13	-5,14	5,08E-06

Tabela 8Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 12, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp6* w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp6*), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (SE).

	J (U	,, ,	,	J ( )	
Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	SE
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp6 [R]	wartość [R]	wartość [R]	512
5	1	1,00	0,87	1,13	0,07
10	1	0,52	0,39	0,66	0,07
20	1	1,03	0,90	1,17	0,07
30	1	0,81	0,68	0,94	0,07
35	1	3,29	3,16	3,42	0,07
40	1	1,85	1,72	1,98	0,07
5	2	0,86	0,73	0,99	0,07
10	2	0,44	0,31	0,57	0,07
20	2	1,03	0,90	1,17	0,07
30	2	0,89	0,76	1,02	0,07
35	2	1,47	1,33	1,60	0,07
40	2	1,29	1,16	1,42	0,07
5	8	0,89	0,76	1,02	0,07
10	8	0,39	0,26	0,53	0,07
20	8	1,03	0,90	1,17	0,07
30	8	0,80	0,67	0,94	0,07
35	8	2,13	2,00	2,27	0,07
40	8	1,03	0,90	1,17	0,07
5	24	0,80	0,67	0,94	0,07
10	24	0,11	-0,02	0,24	0,07
20	24	1,03	0,90	1,17	0,07
30	24	0,68	0,55	0,81	0,07
35	24	0,73	0,60	0,86	0,07
40	24	1,18	1,05	1,31	0,07

Tabela 9Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*60 w stadium jaja *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 13, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,08	0,11	10,04	2,25e-13
temperatura 5°C	0,13	0,15	0,83	0,412
temperatura 10°C	0,09	0,15	0,60	0,549
temperatura 30°C	-0,10	0,15	-0,68	0,502
temperatura 35°C	0,36	0,15	2,36	0,022
temperatura 40°C	0,08	0,15	0,55	0,585
czas inkubacji 2h	-0,00	0,15	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-0,00	0,15	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-0,00	0,15	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,38	0,21	-1,79	0,079
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,36	0,21	-1,70	0,097
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	0,36	0,21	1,70	0,096
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-0,02	0,21	-0,07	0,941
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-0,20	0,21	-0,92	0,361
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,66	0,21	3,09	0,003
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,12	0,21	-0,55	0,583
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	0,08	0,21	0,38	0,702
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,11	0,21	-0,50	0,618
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	0,34	0,21	1,57	0,123

temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,19	0,21	0,89	0,376
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	-0,23	0,21	-1,06	0,295
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,10	0,21	-0,45	0,652
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-0,08	0,21	-0,38	0,706
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	0,39	0,21	1,81	0,077

Tabela 10Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 13, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*60 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*60), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura inkubacii [°C]	Czas inkubacji [godzina]	Ekspresja genu Mh-hsp60 [R]	Dolna wartość [R]	Górna wartość [R]	SE
5	1	1,20	0,99	1,42	0,11
10	1	1,17	0,95	1,38	0,11
20	1	1,08	0,86	1,29	0,11
30	1	0,97	0,76	1,19	0,11
35	1	1,43	1,22	1,65	0,11
40	1	1,16	0,94	1,37	0,11
5	2	0,82	0,60	1,03	0,11
10	2	0,80	0,59	1,02	0,11
20	2	1,08	0,86	1,29	0,11
30	2	1,34	1,12	1,55	0,11
35	2	1,42	1,20	1,63	0,11
40	2	0,96	0,75	1,18	0,11
5	8	1,86	1,65	2,08	0,11
10	8	1,05	0,83	1,26	0,11
20	8	1,08	0,86	1,29	0,11
30	8	1,06	0,84	1,27	0,11
35	8	1,33	1,11	1,54	0,11
40	8	1,50	1,28	1,71	0,11
5	24	1,39	1,18	1,61	0,11
10	24	0,94	0,72	1,16	0,11
20	24	1,08	0,86	1,29	0,11
30	24	0,88	0,66	1,09	0,11
35	24	1,35	1,14	1,57	0,11
40	24	1,55	1,33	1,76	0,11

Tabela 11Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mhdnj*19 w stadium jaja *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 14, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,08	0,07	15,8	< 2e-16
temperatura 5°C	0,21	0,10	2,2	0,036
temperatura 10°C	-0,64	0,10	-6,7	2,50E-08
temperatura 30°C	0,02	0,10	0,2	0,805
temperatura 35°C	0,14	0,10	1,4	0,158
temperatura 40°C	0,05	0,10	0,5	0,614
czas inkubacji 2h	-0,00	0,10	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-0,00	0,10	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-0,00	0,10	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,21	0,14	-1,5	0,132
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,38	0,14	2,7	0,009
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	0,15	0,14	1,1	0,274
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	0,17	0,14	1,2	0,221

temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	0,24	0,14	1,8	0,083
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,55	0,14	4,0	0,0002
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	0,63	0,14	4,6	3,36E-05
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	0,37	0,14	2,7	0,010
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	0,37	0,14	2,7	0,010
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	0,42	0,14	3,0	0,004
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	-0,07	0,14	-0,5	0,630
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,44	0,14	3,2	0,003
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	0,22	0,14	1,6	0,115
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	0,21	0,14	1,5	0,141
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	0,16	0,14	1,1	0,257

Tabela 12Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 14, model 1) dla ekspresji genu *Mh-dnj*19 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-dnj*19), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

	3 (0	// [	2	3	
Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	SF
inkubacji [°C]	[godzina]	<i>Mh-dnj</i> 19 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	1,29	1,15	1,43	0,07
10	1	0,44	0,30	0,57	0,07
20	1	1,08	0,94	1,22	0,07
30	1	1,11	0,97	1,24	0,07
35	1	1,22	1,08	1,36	0,07
40	1	1,13	0,99	1,27	0,07
5	2	1,08	0,94	1,22	0,07
10	2	0,81	0,68	0,95	0,07
20	2	1,08	0,94	1,22	0,07
30	2	1,26	1,12	1,40	0,07
35	2	1,39	1,25	1,53	0,07
40	2	1,37	1,24	1,51	0,07
5	8	1,84	1,70	1,98	0,07
10	8	1,06	0,93	1,20	0,07
20	8	1,08	0,94	1,22	0,07
30	8	1,47	1,34	1,61	0,07
35	8	1,59	1,45	1,72	0,07
40	8	1,55	1,41	1,69	0,07
5	24	1,22	1,09	1,36	0,07
10	24	0,87	0,74	1,01	0,07
20	24	1,08	0,94	1,22	0,07
30	24	1,33	1,19	1,46	0,07
35	24	1,43	1,29	1,56	0,07
40	24	1,29	1,15	1,43	0,07

Tabela 13Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*43 w stadium jaja *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 15, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	0,97	0,15	6,65	2,53E-08
temperatura 5°C	-0,16	0,21	-0,76	0,449
temperatura 10°C	-0,37	0,21	-1,81	0,076
temperatura 30°C	0,65	0,21	3,17	0,003
temperatura 35°C	2,23	0,21	10,84	1,69E-14
temperatura 40°C	0,42	0,21	2,02	0,049
czas inkubacji 2h	-0,00	0,21	0,0	1,0

czas inkubacji 8h	-0,00	0,21	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-0,00	0,21	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,45	0,29	-1,55	0,128
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,32	0,29	1,10	0,278
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,33	0,29	-1,14	0,262
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-1,63	0,29	-5,58	1,08E-06
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-0,18	0,29	-0,62	0,539
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	-0,33	0,29	-1,15	0,257
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,29	0,29	-1,00	0,321
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,96	0,29	-3,31	0,002
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-1,68	0,29	-5,78	5,35E-07
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	1,02	0,29	3,52	0,001
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,42	0,29	1,43	0,159
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,31	0,29	1,05	0,298
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,57	0,29	-1,96	0,056
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-2,03	0,29	-6,97	8,09E-09
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	1,21	0,29	4,15	0,0001

Tabela 14Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 15, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*43 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*43), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	SF
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp43 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	0,81	0,52	1,10	0,15
10	1	0,59	0,30	0,89	0,15
20	1	0,97	0,68	1,26	0,15
30	1	1,62	1,33	1,91	0,15
35	1	3,20	2,91	3,49	0,15
40	1	1,38	1,09	1,68	0,15
5	2	0,36	0,07	0,65	0,15
10	2	0,91	0,62	1,21	0,15
20	2	0,97	0,68	1,26	0,15
30	2	1,29	1,00	1,58	0,15
35	2	1,57	1,28	1,87	0,15
40	2	1,20	0,91	1,50	0,15
5	8	0,48	0,18	0,77	0,15
10	8	0,30	0,01	0,60	0,15
20	8	0,97	0,68	1,26	0,15
30	8	0,66	0,36	0,95	0,15
35	8	1,51	1,22	1,81	0,15
40	8	2,41	2,11	2,70	0,15
5	24	1,23	0,93	1,52	0,15
10	24	0,90	0,61	1,19	0,15
20	24	0,97	0,68	1,26	0,15
30	24	1,05	0,76	1,34	0,15
35	24	1,17	0,88	1,46	0,15
40	24	2,59	2,30	2,88	0,15

Tabela 15Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 w stadium jaja *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 16, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

		CT.		
Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,00	0,08	12,11	3,37E-16
_temperatura 5°C	0,35	0,12	3,02	0,004
temperatura 10°C	-0,39	0,12	-3,32	0,002
temperatura 30°C	0,26	0,12	2,19	0,033
temperatura 35°C	0,66	0,12	5,66	8,24E-07
temperatura 40°C	-0,27	0,12	-2,30	0,026
czas inkubacji 2h	-0,00	0,12	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-0,00	0,12	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-0,00	0,12	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,82	0,17	-4,97	9,09E-06
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,34	0,17	2,06	0,045
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,06	0,17	-0,37	0,713
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-0,42	0,17	-2,51	0,016
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-0,46	0,17	-2,78	0,008
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,04	0,17	0,26	0,795
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,07	0,17	-0,44	0,660
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,38	0,17	-2,27	0,028
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,42	0,17	-2,53	0,015
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-0,48	0,17	-2,88	0,006
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	-0,12	0,17	-0,70	0,490
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	-0,38	0,17	-2,30	0,026
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,79	0,17	-4,74	1,98E-05
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-0,54	0,17	-3,25	0,002
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-0,72	0,17	-4,32	7,88E-05

Tabela 16Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 16, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 w stadium jaja *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*12.2), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	SF
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp12.2 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	1,36	1,19	1,53	0,08
10	1	0,61	0,45	0,78	0,08
20	1	1,00	0,84	1,17	0,08
30	1	1,26	1,09	1,43	0,08
35	1	1,67	1,50	1,83	0,08
40	1	0,73	0,57	0,90	0,08
5	2	0,53	0,37	0,70	0,08
10	2	0,96	0,79	1,12	0,08
20	2	1,00	0,84	1,17	0,08
30	2	1,20	1,03	1,37	0,08
35	2	1,25	1,09	1,42	0,08
40	2	0,27	0,11	0,44	0,08
5	8	1,40	1,23	1,57	0,08
10	8	0,54	0,37	0,71	0,08
20	8	1,00	0,84	1,17	0,08
30	8	0,88	0,72	1,05	0,08
35	8	1,25	1,08	1,42	0,08
40	8	0,26	0,09	0,42	0,08

5	24	1,24	1,08	1,41	0,08
10	24	0,23	0,07	0,40	0,08
20	24	1,00	0,84	1,17	0,08
30	24	0,48	0,31	0,64	0,08
35	24	1,13	0,96	1,30	0,08
40	24	0,02	-0,15	0,18	0,08

Tabela 17Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*90 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 17, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,00	1,19	0,84	0,405
temperatura 5°C	0,30	1,68	0,18	0,860
temperatura 10°C	2,33	1,68	1,39	0,170
temperatura 30°C	5,72	1,68	3,40	0,001
temperatura 35°C	25,05	1,68	14,89	< 2e-16
temperatura 40°C	5,10	1,68	3,03	0,003
czas inkubacji 2h	-1,46E-14	1,68	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-2,37E-14	1,68	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-3,02E-14	1,68	0,0	1,0
czas inkubacji 336h	-2,62E-14	1,68	0,0	1,0
czas inkubacji 1008h	-2,94E-14	1,68	0,0	1,0
czas inkubacji 1344h	-2,47E-14	1,68	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	1,15	2,38	0,49	0,629
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,10	2,38	-0,04	0,965
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	3,56	2,38	1,50	0,139
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	9,28	2,38	3,90	0,0002
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	9,49	2,38	3,99	0,0002
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,20	2,38	0,08	0,935
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	2,76	2,38	1,16	0,251
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-3,37	2,38	-1,42	0,161
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	2,09	2,38	0,88	0,384
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-0,95	2,38	-0,40	0,690
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,62	2,38	0,26	0,796
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	1,70	2,38	0,71	0,477
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	0,59	2,38	0,25	0,805
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-7,61	2,38	-3,20	0,002
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	1,93	2,38	0,81	0,421
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	1,69	2,38	0,71	0,481
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	-1,51	2,38	-0,63	0,528
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	-4,21	2,38	-1,77	0,081
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-20,37	2,38	-8,56	1,38E-12
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	-0,22	2,38	-0,09	0,926
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	-1,15	2,38	-0,48	0,630
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	-5,24	2,38	-2,20	0,031
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	0,53	2,38	0,22	0,825
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	-2,47	2,38	-1,04	0,302
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 18Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 17, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*90 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*90), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	CE.
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp90 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	1,29	-1,08	3,67	1,19
10	1	3,33	0,96	5,70	1,19
20	1	1,00	-1,38	3,37	1,19
30	1	6,72	4,34	9,09	1,19
35	1	26,05	23,68	28,42	1,19
40	1	6,10	3,73	8,47	1,19
5	2	2,45	0,08	4,82	1,19
10	2	3,23	0,86	5,60	1,19
20	2	1,00	-1,38	3,37	1,19
30	2	10,28	7,91	12,65	1,19
35	2	35,33	32,96	37,70	1,19
40	2	15,58	13,21	17,95	1,19
5	8	1,49	-0,88	3,86	1,19
10	8	6,09	3,72	8,46	1,19
20	8	1,00	-1,38	3,37	1,19
30	8	3,35	0,98	5,72	1,19
35	8	28,13	25,76	30,51	1,19
40	8	5,15	2,77	7,52	1,19
5	24	1,91	-0,46	4,28	1,19
10	24	5,03	2,66	7,40	1,19
20	24	1,00	-1,38	3,37	1,19
30	24	7,30	4,93	9,68	1,19
35	24	18,43	16,06	20,81	1,19
40	24	8,02	5,65	10,40	1,19
5	336	2,98	0,61	5,35	1,19
10	336	1,82	-0,55	4,19	1,19
20	336	1,00	-1,38	3,37	1,19
30	336	2,51	0,13	4,88	1,19
35	336	5,68	3,30	8,05	1,19
40	336	NA	NA	NA	NA
5	1008	1,07	-1,30	3,45	1,19
10	1008	2,18	-0,19	4,55	1,19
20	1008	1,00	-1,38	3,37	1,19
30	1008	1,48	-0,89	3,85	1,19
35	1008	NA	NA	NA	NA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	1,82	-0,55	4,19	1,19
10	1344	0,86	-1,51	3,23	1,19
20	1344	1,00	-1,38	3,37	1,19
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA
Tabela 19Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*1 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 18, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,0	0,93	1,08	0,286
temperatura 5°C	6,26	1,32	4,75	1,03E-05
temperatura 10°C	0,27	1,32	0,21	0,836
temperatura 30°C	5,78	1,32	4,39	3,86E-05
temperatura 35°C	25,15	1,32	19,07	< 2e-16
temperatura 40°C	60,78	1,32	46,09	< 2e-16
czas inkubacji 2h	1,19E-15	1,32	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-3,61E-14	1,32	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-3,97E-14	1,32	0,0	1,0
czas inkubacji 336h	-2,06E-14	1,32	0,0	1,0
czas inkubacji 1008h	-3,22E-14	1,32	0,0	1,0
czas inkubacji 1344h	-2,21E-14	1,32	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	4,17	1,87	2,23	0,029
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,13	1,87	-0,07	0,946
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	2,46	1,87	1,32	0,192
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	1,68	1,87	0,90	0,370
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-43,96	1,87	-23,58	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	5,32	1,87	2,85	0,006
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,16	1,87	-0,09	0,932
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-1,22	1,87	-0,66	0,515
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	0,36	1,87	0,2	0,846
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-53,79	1,87	-28,85	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	14,94	1,87	8,01	1,45E-11
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,16	1,87	0,09	0,931
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-1,29	1,87	-0,69	0,492
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-8,47	1,87	-4,55	2,17E-05
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-55,32	1,87	-29,66	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	16,62	1,87	8,91	3,05E-13
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	-0,45	1,87	-0,24	0,811
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	-3,48	1,87	-1,87	0,066
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-8,04	1,87	-4,31	5,11E-05
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	10,43	1,87	5,59	3,80E-07
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	-0,42	1,87	-0,23	0,821
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	-3,12	1,87	-1,68	0,098
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	15,27	1,87	8,19	6,74E-12
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	-0,53	1,87	-0,28	0,778
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 20Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 18, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*1 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*1), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	CE.
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp1 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	7,26	5,40	9,12	0,93
10	1	1,28	-0,58	3,14	0,93
20	1	1,00	-0,86	2,86	0,93
30	1	6,79	4,93	8,65	0,93
35	1	26,15	24,29	28,01	0,93
40	1	61,78	59,92	63,64	0,93
5	2	11,42	9,57	13,28	0,93
10	2	1,15	-0,71	3,01	0,93
20	2	1,00	-0,86	2,86	0,93
30	2	9,24	7,39	11,10	0,93
35	2	27,84	25,98	29,69	0,93
40	2	17,82	15,96	19,68	0,93
5	8	12,58	10,72	14,43	0,93
10	8	1,12	-0,74	2,98	0,93
20	8	1,00	-0,86	2,86	0,93
30	8	5,57	3,71	7,42	0,93
35	8	26,52	24,66	28,37	0,93
40	8	7,99	6,13	9,85	0,93
5	24	22,20	20,34	24,06	0,93
10	24	1,44	-0,42	3,30	0.93
20	24	1,00	-0,86	2,86	0,93
30	24	5,50	3,64	7,36	0,93
35	24	17,68	15,82	19,54	0,93
40	24	6,46	4,61	8,32	0.93
5	336	23,88	22,02	25,74	0.93
10	336	0.83	-1,03	2,69	0.93
20	336	1,00	-0,86	2,86	0.93
30	336	3,31	1,45	5,17	0,93
35	336	18,12	16,26	19,98	0.93
40	336	NA	NA	NA	ŇA
5	1008	17,69	15,83	19,54	0,93
10	1008	0,85	-1,00	2,71	0.93
20	1008	1,00	-0,86	2,86	0.93
30	1008	3.66	1.80	5.52	0.93
35	1008	ŇA	NA	NA	ŇA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	22,53	20,68	24,39	0.93
10	1344	0,75	-1,11	2,61	0,93
20	1344	1,00	-0.86	2,86	0,93
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 21Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*4 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 19, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników (β), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,0	0,14	6,95	1,34E-09
temperatura 5°C	-0,30	0,2	-1,45	0,151
temperatura 10°C	0,09	0,2	0,43	0,666
temperatura 30°C	0,41	0,2	2,01	0,048
temperatura 35°C	1,32	0,2	6,49	9,64E-09
temperatura 40°C	0,74	0,2	3,66	0,0005
czas inkubacji 2h	1,90E-15	0,2	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	2,01E-15	0,2	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	1,88E-15	0,2	0,0	1,0
czas inkubacji 336h	1,99E-15	0,2	0,0	1,0
czas inkubacji 1008h	1,17E-15	0,2	0,0	1,0
czas inkubacji 1344h	2,10E-15	0,2	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,27	0,29	-0,93	0,355
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	1,02	0,29	3,53	0,001
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	1,82	0,29	6,30	2,10E-08
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	2,27	0,29	7,88	2,61E-11
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	1,81	0,29	6,27	2,39E-08
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	-0,22	0,29	-0,78	0,438
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,14	0,29	-0,48	0,637
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,27	0,29	-0,95	0,345
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,14	0,29	-0,50	0,618
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	0,12	0,29	0,43	0,668
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,59	0,29	2,05	0,044
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,31	0,29	1,07	0,288
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	1,01	0,29	3,49	0,001
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	0,24	0,29	0,84	0,402
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-0,12	0,29	-0,42	0,674
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	0,51	0,29	1,78	0,079
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	-0,18	0,29	-0,61	0,541
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	-0,19	0,29	-0,68	0,501
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-0,01	0,29	-0,04	0,972
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	-0,12	0,29	-0,42	0,674
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	-0,51	0,29	-1,77	0,081
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	-0,49	0,29	-1,69	0,095
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	0,64	0,29	2,23	0,029
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	-0,09	0,29	-0,32	0,753
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 22Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 19, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp4* u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp4*), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	<b>SE</b>
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp4 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	0,71	0,42	0,99	0,14
10	1	1,09	0,80	1,38	0,14
20	1	1,00	0,71	1,29	0,14
30	1	1,41	1,12	1,70	0,14
35	1	2,32	2,04	2,61	0,14
40	1	1,75	1,46	2,03	0,14
5	2	0,44	0,15	0,72	0,14
10	2	2,11	1,82	2,39	0,14
20	2	1,00	0,71	1,29	0,14
30	2	3,23	2,94	3,51	0,14
35	2	4,59	4,30	4,88	0,14
40	2	3,55	3,26	3,84	0,14
5	8	0,48	0,19	0,77	0,14
10	8	0,95	0,67	1,24	0,14
20	8	1,00	0,71	1,29	0,14
30	8	1,14	0,85	1,42	0,14
35	8	2,18	1,89	2,47	0,14
40	8	1,87	1,58	2,16	0,14
5	24	1,30	1,01	1,58	0,14
10	24	1,40	1,11	1,69	0,14
20	24	1,00	0,71	1,29	0,14
30	24	2,42	2,13	2,70	0,14
35	24	2,57	2,28	2,85	0,14
40	24	1,62	1,34	1,91	0,14
5	336	1,22	0,93	1,51	0,14
10	336	0,91	0,63	1,20	0,14
20	336	1,00	0,71	1,29	0,14
30	336	1,22	0,93	1,50	0,14
35	336	2,31	2,03	2,60	0,14
40	336	NA	NA	NA	NA
5	1008	0,58	0,30	0,87	0,14
10	1008	0,58	0,29	0,87	0,14
20	1008	1,00	0,71	1,29	0,14
30	1008	0,92	0,64	1,21	0,14
35	1008	NA	NA	NA	NA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	1,35	1,06	1,64	0,14
10	1344	1,00	0,71	1,29	0,14
20	1344	1,00	0,71	1,29	0,14
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 23Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp6* u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 20, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,0	0,13	8,0	1,55E-11
temperatura 5°C	0,11	0,18	0,63	0,532
temperatura 10°C	-0,19	0,18	-1,06	0,295
temperatura 30°C	0,10	0,18	0,58	0,567
_temperatura 35°C	0,34	0,18	1,92	0,059
_temperatura 40°C	2,24	0,18	12,64	< 2e-16
czas inkubacji 2h	-3,38E-15	0,18	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-2,50E-15	0,18	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-1,99E-15	0,18	0,0	1,0
czas inkubacji 336h	-2,12E-15	0,18	0,0	1,0
czas inkubacji 1008h	-2,14E-15	0,18	0,0	1,0
czas inkubacji 1344h	-1,74E-15	0,18	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,56	0,25	-2,25	0,028
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,03	0,25	-0,11	0,913
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	0,48	0,25	1,90	0,062
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	1,82	0,25	7,26	3,70E-10
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	1,67	0,25	6,67	4,45E-09
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	-0,77	0,25	-3,09	0,003
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	0,59	0,25	2,35	0,021
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	1,20	0,25	4,79	8,74E-06
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	2,07	0,25	8,26	4,96E-12
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	0,99	0,25	3,95	0,0002
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	-0,48	0,25	-1,92	0,059
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	-0,21	0,25	-0,82	0,414
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,24	0,25	-0,95	0,348
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	0,10	0,25	0,41	0,681
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-2,32	0,25	-9,25	7,19E-14
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	-0,61	0,25	-2,45	0,017
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	0,13	0,25	0,53	0,596
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	0,14	0,25	0,57	0,570
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	0,65	0,25	2,60	0,011
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	-0,21	0,25	-0,82	0,416
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	0,09	0,25	0,35	0,727
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	0,52	0,25	2,09	0,040
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	-0,5	0,25	-1,98	0,052
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	0,15	0,25	0,59	0,555
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 24Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 20, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*6 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*6), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	CE.
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp6 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	1,12	0,86	1,37	0,13
10	1	0,82	0,57	1,07	0,13
20	1	1,00	0,75	1,25	0,13
30	1	1,11	0,86	1,36	0,13
35	1	1,34	1,09	1,59	0,13
40	1	3,25	3,00	3,50	0,13
5	2	0,55	0,30	0,80	0,13
10	2	0,79	0,54	1,04	0,13
20	2	1,00	0,75	1,25	0,13
30	2	1,58	1,33	1,83	0,13
35	2	3,17	2,92	3,42	0,13
40	2	4,92	4,67	5,17	0,13
5	8	0,34	0,09	0,59	0,13
10	8	1,41	1,16	1,66	0,13
20	8	1,00	0,75	1,25	0,13
30	8	2,31	2,06	2,56	0,13
35	8	3,42	3,17	3,67	0,13
40	8	4,24	3,99	4,49	0,13
5	24	0,63	0,38	0,88	0,13
10	24	0,61	0,36	0,86	0,13
20	24	1,00	0,75	1,25	0,13
30	24	0,87	0,62	1,12	0,13
35	24	1,45	1,20	1,70	0,13
40	24	0,93	0,68	1,18	0,13
5	336	0,50	0,25	0,75	0,13
10	336	0,95	0,70	1,20	0,13
20	336	1,00	0,75	1,25	0,13
30	336	1,25	1,00	1,50	0,13
35	336	2,00	1,75	2,25	0,13
40	336	ŇA	NA	NA	ŇA
5	1008	0,91	0,66	1,16	0,13
10	1008	0,90	0,65	1,15	0,13
20	1008	1,00	0,75	1,25	0,13
30	1008	1,63	1,38	1,88	0,13
35	1008	ŇA	ŇA	ŇA	ŇA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	0,62	0,37	0,87	0,13
10	1344	0,97	0,72	1,22	0,13
20	1344	1,00	0,75	1,25	0,13
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 25Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*60 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 21, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,22	0,19	6,57	6,75E-09
temperatura 5°C	-0,56	0,26	-2,12	0,038
_temperatura 10°C	-1,00	0,26	-3,81	0,000
temperatura 30°C	-0,33	0,26	-1,27	0,209
temperatura 35°C	3,49	0,26	13,28	< 2e-16
temperatura 40°C	0,51	0,26	1,94	0,056
czas inkubacji 2h	8,08E-15	0,26	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	6,67E-15	0,26	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	5,76E-15	0,26	0,0	1,0
czas inkubacji 336h	6,59E-15	0,26	0,0	1,0
czas inkubacji 1008h	6,33E-15	0,26	0,0	1,0
czas inkubacji 1344h	5,46E-15	0,26	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	1,27	0,37	3,41	0,001
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,05	0,37	-0,13	0,894
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,34	0,37	-0,91	0,367
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-2,94	0,37	-7,92	2,21E-11
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	0,11	0,37	0,30	0,769
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,82	0,37	2,21	0,031
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,02	0,37	-0,06	0,949
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,10	0,37	-0,27	0,792
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,64	0,37	-1,73	0,088
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-1,07	0,37	-2,88	0,005
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,15	0,37	0,39	0,697
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,40	0,37	1,08	0,285
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,38	0,37	-1,03	0,306
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-1,93	0,37	-5,19	1,85E-06
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-0,12	0,37	-0,31	0,756
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	1,30	0,37	3,48	0,001
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	0,19	0,37	0,50	0,617
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	0,32	0,37	0,87	0,388
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-3,33	0,37	-8,95	2,55E-13
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	1,07	0,37	2,89	0,005
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	0,75	0,37	2,03	0,046
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	0,81	0,37	2,18	0,033
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	0,96	0,37	2,59	0,012
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	1,05	0,37	2,81	0,006
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 26Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 21, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*60 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*60), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	<b>SE</b>
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp60 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	0,67	0,30	1,04	0,19
10	1	0,22	-0,15	0,59	0,19
20	1	1,22	0,85	1,59	0,19
30	1	0,89	0,52	1,26	0,19
35	1	4,72	4,34	5,09	0,19
40	1	1,73	1,36	2,10	0,19
5	2	1,93	1,56	2,30	0,19
10	2	0,17	-0,20	0,54	0,19
20	2	1,22	0,85	1,59	0,19
30	2	0,55	0,18	0,92	0,19
35	2	1,77	1,40	2,14	0,19
40	2	1,84	1,47	2,21	0,19
5	8	1,49	1,12	1,86	0,19
10	8	0,20	-0,17	0,57	0,19
20	8	1,22	0,85	1,59	0,19
30	8	0,79	0,42	1,16	0,19
35	8	4,07	3,70	4,44	0,19
40	8	0,66	0,29	1,03	0,19
5	24	0,81	0,44	1,18	0,19
10	24	0,62	0,25	0,99	0,19
20	24	1,22	0,85	1,59	0,19
30	24	0,50	0,13	0,88	0,19
35	24	2,78	2,41	3,15	0,19
40	24	1,62	1,25	1,99	0,19
5	336	1,96	1,59	2,33	0,19
10	336	0,41	0,04	0,78	0,19
20	336	1,22	0,85	1,59	0,19
30	336	1,21	0,84	1,58	0,19
35	336	1,39	1,01	1,76	0,19
40	336	NA	NA	NA	NA
5	1008	1,74	1,37	2,11	0,19
10	1008	0,98	0,60	1,35	0,19
20	1008	1,22	0,85	1,59	0,19
30	1008	1,70	1,33	2,07	0,19
35	1008	NA	NA	NA	NA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	1,63	1,26	2,00	0,19
10	1344	1,27	0,90	1,64	0,19
20	1344	1,22	0,85	1,59	0,19
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 27Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-dnj*19 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 22, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	2,54	0,20	12,58	< 2e-16
temperatura 5°C	-1,00	0,29	-3,51	0,0008
temperatura 10°C	-1,54	0,29	-5,39	8,61E-07
temperatura 30°C	-0,34	0,29	-1,18	0,2436
temperatura 35°C	-0,02	0,29	-0,06	0,9532
temperatura 40°C	0,84	0,29	2,92	0,0047
czas inkubacji 2h	-0,50	0,29	-1,75	0,0840
czas inkubacji 8h	-1,07	0,29	-3,73	0,0004
czas inkubacji 24h	-1,53	0,29	-5,36	9,72E-07
czas inkubacji 336h	-1,07	0,29	-3,75	0,0004
czas inkubacji 1008h	-1,30	0,29	-4,53	2,27E-05
czas inkubacji 1344h	-1,37	0,29	-4,79	8,72E-06
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	1,25	0,40	3,10	0,0028
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,50	0,40	1,24	0,2194
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	2,28	0,40	5,63	3,25E-07
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	3,45	0,40	8,52	1,67E-12
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-1,16	0,40	-2,87	0,0055
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	1,07	0,40	2,65	0,0099
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	1,07	0,40	2,64	0,0103
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	0,80	0,40	1,98	0,0517
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	2,03	0,40	5,01	3,77E-06
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	2,09	0,40	5,17	2,03E-06
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	2,13	0,40	5,26	1,44E-06
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	1,53	0,40	3,79	0,0003
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	2,16	0,40	5,33	1,07E-06
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	2,38	0,40	5,89	1,16E-07
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	2,30	0,40	5,68	2,68E-07
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	1,08	0,40	2,68	0,0091
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	1,07	0,40	2,65	0,0099
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	1,38	0,40	3,42	0,0010
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	2,68	0,40	6,63	5,30E-09
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	1,18	0,40	2,91	0,0047
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	1,30	0,40	3,21	0,0020
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	2,60	0,40	6,43	1,23E-08
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	1,21	0,40	2,99	0,0038
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	1,37	0,40	3,39	0,0012
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 28Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 22, model 1) dla ekspresji genu *Mh-dnj*19 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-dnj*19), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	CE.
inkubacji [°C]	[godzina]	<i>Mh-dnj</i> 19 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	2,54	2,14	2,95	0,20
10	1	1,54	1,14	1,94	0,20
20	1	1,00	0,60	1,41	0,20
30	1	2,21	1,81	2,61	0,20
35	1	2,53	2,12	2,93	0,20
40	1	3,38	2,98	3,78	0,20
5	2	2,04	1,64	2,45	0,20
10	2	2,29	1,89	2,70	0,20
20	2	1,00	0,60	1,41	0,20
30	2	3,99	3,58	4,39	0,20
35	2	5,47	5,07	5,88	0,20
40	2	1,72	1,32	2,12	0,20
5	8	1,48	1,07	1,88	0,20
10	8	1,55	1,14	1,95	0,20
20	8	1,00	0,60	1,41	0,20
30	8	1,94	1,54	2,35	0,20
35	8	3,49	3,08	3,89	0,20
40	8	4,41	4,00	4,81	0,20
5	24	1,01	0,61	1,42	0,20
10	24	2,14	1,73	2,54	0,20
20	24	1,00	0,60	1,41	0,20
30	24	2,83	2,43	3,24	0,20
35	24	3,38	2,97	3,78	0,20
40	24	4,15	3,74	4,55	0,20
5	336	1,47	1,07	1,88	0,20
10	336	1,55	1,15	1,96	0,20
20	336	1,00	0,60	1,41	0,20
30	336	2,52	2,12	2,92	0,20
35	336	4,14	3,73	4,54	0,20
40	336	NA	NA	NA	NA
5	1008	1,25	0,85	1,65	0,20
10	1008	1,42	1,02	1,83	0,20
20	1008	1,00	0,60	1,41	0,20
30	1008	3,51	3,11	3,92	0,20
35	1008	NA	NA	NA	NA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	1,17	0,77	1,58	0,20
10	1344	1,38	0,98	1,78	0,20
20	1344	1,00	0,60	1,41	0,20
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 29Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*43 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 23, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,10	0,10	11,45	< 2e-16
temperatura 5°C	0,03	0,14	0,19	0,848
temperatura 10°C	0,47	0,14	3,47	0,001
temperatura 30°C	0,55	0,14	4,07	0,0001
temperatura 35°C	1,55	0,14	11,40	< 2e-16
temperatura 40°C	-0,07	0,14	-0,52	0,606
czas inkubacji 2h	-3,10E-15	0,14	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-2,93E-15	0,14	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-4,31E-15	0,14	0,0	1,0
czas inkubacji 336h	-3,71E-15	0,14	0,0	1,0
czas inkubacji 1008h	-3,36E-15	0,14	0,0	1,0
czas inkubacji 1344h	-3,32E-15	0,14	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	1,28	0,19	6,66	4,70E-09
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-1,27	0,19	-6,61	5,69E-09
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,28	0,19	-1,45	0,151
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-1,09	0,19	-5,65	3,06E-07
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-0,34	0,19	-1,77	0,081
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,15	0,19	0,77	0,444
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,66	0,19	-3,44	0,001
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,88	0,19	-4,58	1,93E-05
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-1,24	0,19	-6,45	1,14E-08
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	1,32	0,19	6,86	1,99E-09
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	1,48	0,19	7,70	5,69E-11
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	-0,41	0,19	-2,14	0,036
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,89	0,19	-4,61	1,73E-05
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-1,15	0,19	-5,95	8,80E-08
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	1,47	0,19	7,63	7,52E-11
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	0,55	0,19	2,87	0,005
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	-0,34	0,19	-1,76	0,083
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	-0,73	0,19	-3,77	0,0003
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-1,26	0,19	-6,57	6,81E-09
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	-0,55	0,19	-2,87	0,005
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	-0,56	0,19	-2,93	0,005
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	-0,57	0,19	-2,98	0,004
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	0,48	0,19	2,47	0,016
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	-1,19	0,19	-6,16	3,71E-08
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 30Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 23, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*43 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*43), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	<b>CE</b>
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp43 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	1,13	0,94	1,32	0,10
10	1	1,57	1,38	1,77	0,10
20	1	1,10	0,91	1,29	0,10
30	1	1,65	1,46	1,85	0,10
35	1	2,65	2,46	2,85	0,10
40	1	1,03	0,84	1,22	0,10
5	2	2,41	2,22	2,60	0,10
10	2	0,30	0,11	0,49	0,10
20	2	1,10	0,91	1,29	0,10
30	2	1,38	1,18	1,57	0,10
35	2	1,57	1,38	1,76	0,10
40	2	0,69	0,50	0,88	0,10
5	8	1,28	1,08	1,47	0,10
10	8	0,91	0,72	1,10	0,10
20	8	1,10	0,91	1,29	0,10
30	8	0,77	0,58	0,97	0,10
35	8	1,41	1,22	1,60	0,10
40	8	2,35	2,16	2,54	0,10
5	24	2,61	2,42	2,80	0,10
10	24	1,16	0,97	1,35	0,10
20	24	1,10	0,91	1,29	0,10
30	24	0,77	0,58	0,96	0,10
35	24	1,51	1,32	1,70	0,10
40	24	2,50	2,31	2,69	0,10
5	336	1,68	1,49	1,87	0,10
10	336	1,24	1,04	1,43	0,10
20	336	1,10	0,91	1,29	0,10
30	336	0,93	0,74	1,12	0,10
35	336	1,39	1,20	1,58	0,10
40	336	ŇA	NA	NA	ŇA
5	1008	0,58	0,38	0,77	0,10
10	1008	1,01	0,82	1,20	0,10
20	1008	1,10	0,91	1,29	0,10
30	1008	1,08	0,89	1,27	0,10
35	1008	ŇA	ŇA	ŇA	ŃA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	1,60	1,41	1,79	0,10
10	1344	0,39	0,20	0,58	0,10
20	1344	1.10	0.91	1.29	0.10
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 31Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w poziomie ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 24, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	1,07	0,08	13,52	< 2e-16
temperatura 5°C	0,58	0,11	5,16	2,12E-06
temperatura 10°C	-0,71	0,11	-6,33	1,84E-08
temperatura 30°C	-0,51	0,11	-4,56	2,02E-05
temperatura 35°C	-0,24	0,11	-2,12	0,04
temperatura 40°C	-0,28	0,11	-2,51	0,01
czas inkubacji 2h	-3,37E-15	0,11	0,0	1,0
czas inkubacji 8h	-2,73E-15	0,11	0,0	1,0
czas inkubacji 24h	-2,16E-15	0,11	0,0	1,0
czas inkubacji 336h	-2,54E-15	0,11	0,0	1,0
czas inkubacji 1008h	-2,46E-15	0,11	0,0	1,0
czas inkubacji 1344h	-2,89E-15	0,11	0,0	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-1,04	0,16	-6,59	6,37E-09
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-0,03	0,16	-0,18	0,86
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,22	0,16	-1,38	0,17
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-0,28	0,16	-1,79	0,08
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	0,08	0,16	0,52	0,60
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	-0,98	0,16	-6,17	3,64E-08
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	0,07	0,16	0,46	0,65
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	0,13	0,16	0,84	0,41
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	0,22	0,16	1,42	0,16
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-0,73	0,16	-4,63	1,59E-05
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	-0,94	0,16	-5,93	9,82E-08
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,10	0,16	0,62	0,54
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	0,07	0,16	0,43	0,67
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	0,04	0,16	0,25	0,80
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	0,34	0,16	2,13	0,04
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	-1,55	0,16	-9,78	7,61E-15
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	-0,05	0,16	-0,31	0,76
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	-0,15	0,16	-0,97	0,34
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-0,31	0,16	-1,97	0,05
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	-1,56	0,16	-9,82	6,22E-15
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	-0,06	0,16	-0,40	0,69
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	0,19	0,16	1,22	0,23
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	-1,59	0,16	-10,06	2,29E-15
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	0,42	0,16	2,62	0,01
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 32Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 24, model 1) dla ekspresji genu *Mh-hsp*12.2 u osobników w stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (ekspresja genu *Mh-hsp*43), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Ekspresja genu	Dolna	Górna	C.F.
inkubacji [°C]	[godzina]	Mh-hsp12.2 [R]	wartość [R]	wartość [R]	SE
5	1	1,65	1,49	1,81	0,08
10	1	0,36	0,20	0,52	0,08
20	1	1,07	0,91	1,23	0,08
30	1	0,56	0,40	0,72	0,08
35	1	0,83	0,68	0,99	0,08
40	1	0,79	0,63	0,95	0,08
5	2	0,61	0,45	0,76	0,08
10	2	0,33	0,18	0,49	0,08
20	2	1,07	0,91	1,23	0,08
30	2	0,34	0,18	0,50	0,08
35	2	0,55	0,39	0,71	0,08
40	2	0,87	0,72	1,03	0,08
5	8	0,67	0,51	0,83	0,08
10	8	0,43	0,28	0,59	0,08
20	8	1,07	0,91	1,23	0,08
30	8	0,69	0,53	0,85	0,08
35	8	1,06	0,90	1,22	0,08
40	8	0,06	-0,10	0,21	0,08
5	24	0,71	0,55	0,87	0,08
10	24	0,46	0,30	0,62	0,08
20	24	1,07	0,91	1,23	0,08
30	24	0,63	0,47	0,79	0,08
35	24	0,87	0,71	1,03	0,08
40	24	1,13	0,97	1,28	0,08
5	336	0,10	-0,06	0,26	0,08
10	336	0,31	0,16	0,47	0,08
20	336	1,07	0,91	1,23	0,08
30	336	0,41	0,25	0,56	0,08
35	336	0,52	0,36	0,68	0,08
40	336	NA	NA	NA	NA
5	1008	0,09	-0,07	0,25	0,08
10	1008	0,30	0,14	0,46	0,08
20	1008	1,07	0,91	1,23	0,08
30	1008	0,75	0,59	0,91	0,08
35	1008	NA	NA	NA	NA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	0,06	-0,10	0,21	0,08
10	1344	0,78	0,62	0,94	0,08
20	1344	1,07	0,91	1,23	0,08
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 33Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w długości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 26, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (P).

	/· •			
Zmienna	β	SE	t	Р
wyraz wolny	386,93	1,00	388,13	< 2e-16
temperatura 5°C	-9,86	1,41	-6,99	7,37E-12
temperatura 10°C	-6,92	1,41	-4,91	1,17E-06
temperatura 30°C	1,72	1,41	1,22	0,223
temperatura 35°C	-17,63	1,41	-12,51	< 2e-16

Tabela 34Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 26, model 1) dla długości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*; wartość oszacowania średniej (długość ciała), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura	Czas inkubacji	Długość	Dolno wortość [ug]	Cánna wantaść [ug]	SE
inkubacji [°C]	[godzina]	ciała [µg]	Doina wartosc [µg]	Gorna wartosc [µg]	SE
5	1	378,6	374,7	382,5	2,0
10	1	381,3	377,4	385,2	2,0
20	1	386,9	383,0	390,9	2,0
30	1	387,3	383,4	391,2	2,0
35	1	371,8	367,8	375,7	2,0
5	2	377,7	373,8	381,7	2,0
10	2	379,8	375,9	383,8	2,0
20	2	386,9	383,0	390,9	2,0
30	2	388,9	385,0	392,8	2,0
35	2	369,2	365,3	373,2	2,0
5	8	376,2	372,3	380,1	2,0
10	8	380,6	376,6	384,5	2,0
20	8	386,9	383,0	390,9	2,0
30	8	388,2	384,3	392,2	2,0
35	8	370,7	366,8	374,6	2,0
5	24	375,8	371,9	379,7	2,0
10	24	378,4	374,4	382,3	2,0
20	24	386,9	383,0	390,9	2,0
30	24	390,2	386,3	394,1	2,0
35	24	365,5	361,6	369,5	2,0

Tabela 35Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w szerokości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 27, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (P).

Zmienna	β	SE	t	Р
wyraz wolny	15,63	0,09	173,53	< 2e-16
temperatura 5°C	-0,15	0,13	-1,18	0,239
temperatura 10°C	-0,71	0,13	-5,60	3,29E-08
temperatura 30°C	-0,79	0,13	-6,18	1,23E-09
temperatura 35°C	-0,98	0,13	-7,67	7,35E-14
czas inkubacji 2h	2,2E-15	0,13	0,00	1,0
czas inkubacji 8h	-7,1E-16	0,13	0,00	1,0
czas inkubacji 24h	-4,2E-16	0,13	0,00	1,0
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,19	0,18	-1,04	0,300
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,12	0,18	0,67	0,505
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	0,37	0,18	2,07	0,039
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	0,17	0,18	0,96	0,336

temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	-0,58	0,18	-3,22	0,001
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	0,37	0,18	2,07	0,039
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	0,51	0,18	2,85	0,005
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,38	0,18	-2,09	0,037
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	-0,74	0,18	-4,13	4,21E-05
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,47	0,18	2,61	0,009
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	0,47	0,18	2,63	0,009
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-0,84	0,18	-4,66	3,85E-06

Tabela 36Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 27, model 1) dla szerokości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*; wartość oszacowania średniej (szerokość ciała), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura inkubacji [°C]	Czas inkubacji [godzina]	Szerokość ciała [µm]	Dolna wartość [µg]	Górna wartość [µg]	SE
5	1	15,5	15,3	15,7	0,09
10	1	14,9	14,7	15,1	0,09
20	1	15,6	15,5	15,8	0,09
30	1	14,8	14,7	15,0	0,09
35	1	14,7	14,5	14,8	0,09
5	2	15,3	15,1	15,5	0,09
10	2	15,0	14,9	15,2	0,09
20	2	15,6	15,5	15,8	0,09
30	2	15,2	15,0	15,4	0,09
35	2	14,8	14,7	15,0	0,09
5	8	14,9	14,7	15,1	0,09
10	8	15,3	15,1	15,5	0,09
20	8	15,6	15,5	15,8	0,09
30	8	15,4	15,2	15,5	0,09
35	8	14,3	14,1	14,5	0,09
5	24	14,7	14,6	14,9	0,09
10	24	15,4	15,2	15,6	0,09
20	24	15,6	15,5	15,8	0,09
30	24	15,3	15,1	15,5	0,09
35	24	13,8	13,6	14,0	0,09

Tabela 37Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w wartości masy ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 28, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników (β), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (P).

Zmienna	β	SE	t	Р
Wyraz wolny	0,591	0,0008	75,53	< 2e-16
temperatura 5°C	-0,0025	0,0011	-2,26	0,0243
temperatura 10°C	-0,0060	0,0011	-5,39	1,03E-07
temperatura 30°C	-0,0057	0,0011	-5,15	3,60E-07
temperatura 35°C	-0,0092	0,0011	-8,31	6,83E-16
czas inkubacji 2h	0,0000	0,0011	0,00	1,00
czas inkubacji 8h	0,0000	0,0011	0,00	1,00
czas inkubacji 24h	0,0000	0,0011	0,00	1,00
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-0,0014	0,0016	-0,89	0,3716
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,0007	0,0016	0,43	0,6704
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	0,0030	0,0016	1,90	0,0586
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	0,0007	0,0016	0,47	0,6397
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	-0,0042	0,0016	-2,70	0,0071
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	0,0025	0,0016	1,58	0,1157

temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	0,0040	0,0016	2,58	0,0102
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,0025	0,0016	-1,62	0,1062
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	-0,0056	0,0016	-3,56	0,0004
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,0030	0,0016	1,90	0,0586
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	0,0039	0,0016	2,47	0,0138
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-0,0062	0,0016	-3,98	7,73E-05

Tabela 38Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 28, model 1) dla masy ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*; wartość oszacowania średniej (masa ciała), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura	Czas inkubacji	Masa	Dolna	Górna	SE
inkubacji [°C]	[godzina]	ciała [µg]	wartość [µg]	wartość [µg]	
5	1	0,057	0,055	0,058	0,0008
10	1	0,053	0,052	0,055	0,0008
20	1	0,059	0,058	0,061	0,0008
30	1	0,053	0,052	0,055	0,0008
35	1	0,050	0,048	0,051	0,0008
5	2	0,055	0,054	0,057	0,0008
10	2	0,054	0,052	0,055	0,0008
20	2	0,059	0,058	0,061	0,0008
30	2	0,056	0,055	0,058	0,0008
35	2	0,051	0,049	0,052	0,0008
5	8	0,052	0,051	0,054	0,0008
10	8	0,056	0,054	0,057	0,0008
20	8	0,059	0,058	0,061	0,0008
30	8	0,057	0,056	0,059	0,0008
35	8	0,047	0,046	0,049	0,0008
5	24	0,051	0,050	0,053	0,0008
10	24	0,056	0,055	0,058	0,0008
20	24	0,059	0,058	0,061	0,0008
30	24	0,057	0,056	0,059	0,0008
35	24	0,044	0,042	0,045	0,0008

Tabela 39Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w długości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 29, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	388,13	0,57	682,28	< 2e-16
temperatura 5°C	-1,40	0,56	-2,49	0,01
temperatura 10°C	-0,69	0,56	-1,22	0,22
temperatura 30°C	0,77	0,59	1,31	0,19
temperatura 35°C	0,11	0,63	0,17	0,86
temperatura 40°C	-0,31	0,68	-0,46	0,64
czas inkubacji 2h	0,23	0,61	0,37	0,71
czas inkubacji 8h	0,56	0,61	0,92	0,36
czas inkubacji 24h	1,02	0,61	1,69	0,09
czas inkubacji 336h	2,21	0,64	3,44	0,0006
czas inkubacji 1008h	3,10	0,69	4,48	8,10E-06
czas inkubacji 1344h	3,74	0,77	4,89	1,19E-06

Tabela 40Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 29, model 1) dla długości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury inkubacji (A) oraz w zależności od czasu inkubacji (B); wartość oszacowania średniej (długość ciała), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Π				
Temperatura	Długość	Dolna	Górna	SE
inkubacji [°C]	ciała [µm]	wartość [µm]	wartość [µm]	~ _
5	388,0	387,2	388,8	0,40
10	388,7	387,9	389,5	0,40
20	389,4	388,6	390,2	0,40
30	390,2	389,3	391,0	0,43
35	389,5	388,6	390,4	0,48
40	380.1	388.0	300.1	0.54

B

Ь				
Czas inkubacji [godzina]	Długość ciała [µm]	Dolna wartość [µm]	Górna wartość [µm]	SE
1	387,8	387,0	388,7	0,43
2	388,1	387,2	388,9	0,43
8	388,4	387,5	389,2	0,43
24	388,9	388,0	389,7	0,43
336	390,0	389,1	391,0	0,47
1008	390,9	389,9	392,0	0,54
1344	391,6	390,3	392,8	0,63

Tabela 41Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w szerokości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 30, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników (β), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	15,66	0,05	298,43	< 2e-16
temperatura 5°C	0,22	0,07	2,97	0,003
temperatura 10°C	0,14	0,07	1,93	0,054
temperatura 30°C	-0,03	0,07	-0,45	0,653
temperatura 35°C	-0,14	0,07	-1,93	0,054
temperatura 40°C	-0,31	0,07	-4,18	3,18E-05
czas inkubacji 2h	-0,23	0,07	-3,15	0,002
czas inkubacji 8h	-0,52	0,07	-7,05	3,17E-12
czas inkubacji 24h	-0,83	0,07	-11,23	< 2e-16
czas inkubacji 336h	-1,30	0,07	-17,57	< 2e-16
czas inkubacji 1008h	-2,81	0,07	-37,83	< 2e-16
czas inkubacji 1344h	-3,98	0,07	-53,64	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	0,14	0,10	1,37	0,1722
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,05	0,10	0,51	0,6114
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,13	0,10	-1,27	0,2041
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-0,09	0,10	-0,83	0,4090
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-0,12	0,10	-1,18	0,2401
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,31	0,10	2,99	0,0029
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	0,11	0,10	1,08	0,2803
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,31	0,10	-2,99	0,0029
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,58	0,10	-5,53	4,10E-08
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-0,43	0,10	-4,07	5,13E-05

temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,37	0,10	3,50	0,0005
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,15	0,10	1,43	0,1531
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,48	0,10	-4,58	5,34E-06
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-0,98	0,10	-9,31	< 2e-16
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-1,34	0,10	-12,77	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	0,61	0,10	5,81	8,12E-09
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	0,38	0,10	3,62	0,0003
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	-0,96	0,10	-9,15	< 2e-16
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-2,06	0,10	-19,67	< 2e-16
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	1,12	0,10	10,64	< 2e-16
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	0,84	0,10	7,97	4,02E-15
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	-1,14	0,10	-10,90	< 2e-16
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	1,45	0,10	13,85	< 2e-16
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	1,22	0,10	11,63	< 2e-16
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 42Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 30, model 1) dla szerokości ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (szerokość ciała), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Szerokość	Dolna	Górna	SE
inkubacji [°C]	[godzina]	ciała [µm]	wartość [µm]	wartość [µm]	SE
5	1	15,9	15,8	16,0	0,05
10	1	15,8	15,7	15,9	0,05
20	1	15,7	15,6	15,8	0,05
30	1	15,6	15,5	15,7	0,05
35	1	15,5	15,4	15,6	0,05
40	1	15,4	15,2	15,5	0,05
5	2	15,8	15,7	15,9	0,05
10	2	15,6	15,5	15,7	0,05
20	2	15,4	15,3	15,5	0,05
30	2	15,3	15,2	15,4	0,05
35	2	15,2	15,1	15,3	0,05
40	2	15,0	14,9	15,1	0,05
5	8	15,7	15,6	15,8	0,05
10	8	15,4	15,3	15,5	0,05
20	8	15,1	15,0	15,2	0,05
30	8	14,8	14,7	14,9	0,05
35	8	14,4	14,3	14,5	0,05
40	8	14,4	14,3	14,5	0,05
5	24	15,4	15,3	15,5	0,05
10	24	15,1	15,0	15,2	0,05
20	24	14,8	14,7	14,9	0,05
30	24	14,3	14,2	14,4	0,05
35	24	13,7	13,6	13,8	0,05
40	24	13,2	13,1	13,3	0,05
5	336	15,2	15,1	15,3	0,05
10	336	14,9	14,8	15,0	0,05

20	336	14,4	14,3	14,5	0,05
30	336	13,4	13,3	13,5	0,05
35	336	12,2	12,0	12,3	0,05
40	336	NA	NA	NA	NA
5	1008	14,2	14,1	14,3	0,05
10	1008	13,8	13,7	13,9	0,05
20	1008	12,9	12,8	13,0	0,05
30	1008	11,7	11,6	11,8	0,05
35	1008	NA	NA	NA	NA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	13,4	13,3	13,5	0,05
10	1344	13,0	12,9	13,1	0,05
20	1344	11,7	11,6	11,8	0,05
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 43Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w wartości masy ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 31, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników (β), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	0,0594	0,0004	146,69	< 2e-16
temperatura 5°C	0,0015	0,0006	2,70	0,007
temperatura 10°C	0,0011	0,0006	1,84	0,066
temperatura 30°C	-0,0001	0,0006	-0,24	0,808
temperatura 35°C	-0,0010	0,0006	-1,83	0,067
temperatura 40°C	-0,0023	0,0006	-4,08	4,88E-05
czas inkubacji 2h	-0,0017	0,0006	-3,00	0,003
czas inkubacji 8h	-0,0038	0,0006	-6,67	4,23E-11
czas inkubacji 24h	-0,0060	0,0006	-10,53	< 2e-16
czas inkubacji 336h	-0,0091	0,0006	-15,81	< 2e-16
czas inkubacji 1008h	-0,0190	0,0006	-33,15	< 2e-16
czas inkubacji 1344h	-0,0260	0,0006	-45,32	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	0,0011	0,0008	1,32	0,188
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,0004	0,0008	0,48	0,631
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,0010	0,0008	-1,19	0,236
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-0,0006	0,0008	-0,76	0,449
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-0,0009	0,0008	-1,11	0,267
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,0023	0,0008	2,83	0,005
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	0,0008	0,0008	0,98	0,327
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,0022	0,0008	-2,74	0,006
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-0,0041	0,0008	-5,05	5,35E-07
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-0,0030	0,0008	-3,69	0,0002
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,0026	0,0008	3,26	0,0011
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,0010	0,0008	1,28	0,2023
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,0033	0,0008	-4,11	4,28E-05
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-0,0066	0,0008	-8,16	9,62E-16
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-0,0088	0,0008	-10,88	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	0,0041	0,0008	5,05	5,26E-07
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	0,0025	0,0008	3,05	0,002
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	-0,0066	0,0008	-8,10	1,58E-15
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-0,0133	0,0008	-16,45	< 2e-16
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA

temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	0,0070	0,0008	8,68	< 2e-16
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	0,0052	0,0008	6,37	2,86E-10
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	-0,0069	0,0008	-8,46	< 2e-16
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	0,0085	0,0008	10,45	< 2e-16
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	0,0071	0,0008	8,71	< 2e-16
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 44Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 31, model 1) dla masy ciała osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (masa ciała), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona, jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Masa	Dolna	Górna	<b>SE</b>
inkubacji [°C]	[godzina]	ciała [µg]	wartość [µg]	wartość [µg]	SE
5	1	0,0610	0,0602	0,0618	0,0004
10	1	0,0605	0,0597	0,0613	0,0004
20	1	0,0594	0,0586	0,0602	0,0004
30	1	0,0593	0,0585	0,0601	0,0004
35	1	0,0584	0,0576	0,0592	0,0004
40	1	0,0571	0,0563	0,0579	0,0004
5	2	0,0603	0,0595	0,0611	0,0004
10	2	0,0592	0,0584	0,0600	0,0004
20	2	0,0577	0,0569	0,0585	0,0004
30	2	0,0566	0,0558	0,0574	0,0004
35	2	0,0561	0,0553	0,0569	0,0004
40	2	0,0545	0,0537	0,0553	0,0004
5	8	0,0595	0,0587	0,0603	0,0004
10	8	0,0575	0,0567	0,0583	0,0004
20	8	0,0556	0,0548	0,0564	0,0004
30	8	0,0533	0,0525	0,0541	0,0004
35	8	0,0505	0,0497	0,0513	0,0004
40	8	0,0503	0,0495	0,0511	0,0004
5	24	0,0576	0,0568	0,0584	0,0004
10	24	0,0555	0,0547	0,0563	0,0004
20	24	0,0534	0,0526	0,0542	0,0004
30	24	0,0499	0,0491	0,0507	0,0004
35	24	0,0457	0,0449	0,0465	0,0004
40	24	0,0422	0,0415	0,0430	0,0004
5	336	0,0560	0,0552	0,0568	0,0004
10	336	0,0539	0,0531	0,0547	0,0004
20	336	0,0504	0,0496	0,0512	0,0004
30	336	0,0437	0,0429	0,0445	0,0004
35	336	0,0360	0,0352	0,0368	0,0004
40	336	NA	NA	NA	NA
5	1008	0,0490	0,0482	0,0498	0,0004
10	1008	0,0467	0,0459	0,0475	0,0004
20	1008	0,0404	0,0396	0,0412	0,0004
30	1008	0,0335	0,0327	0,0342	0,0004
35	1008	NA	NA	NA	NA
40	1008	NA	NA	NA	NA

5	1344	0,0435	0,0427	0,0443	0,0004
10	1344	0,0416	0,0408	0,0424	0,0004
20	1344	0,0335	0,0327	0,0343	0,0004
30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 45Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w wartościach powierzchni wybarwionych lipidów u osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 32, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników (β), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	63,34	5,21	12,16	< 2e-16
temperatura 5°C	-8,94	7,62	-1,17	0,241
temperatura 10°C	5,72	7,88	0,73	0,468
temperatura 30°C	-2,87	7,67	-0,38	0,708
temperatura 35°C	-6,33	9,34	-0,68	0,498
temperatura 40°C	-3,94	9,90	-0,40	0,690
czas inkubacji 2h	-0,94	0,79	-1,20	0,232
czas inkubacji 8h	-1,25	0,84	-1,48	0,138
czas inkubacji 24h	-1,98	0,93	-2,12	0,034
czas inkubacji 336h	-37,98	1,10	-34,38	< 2e-16
czas inkubacji 1008h	-54,23	1,83	-29,69	< 2e-16
czas inkubacji 1344h	-60,68	2,39	-25,37	< 2e-16
masa ciała	-29,42	87,14	-0,34	0,736
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	0,50	1,10	0,45	0,654
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,24	1,11	0,22	0,826
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-0,04	1,13	-0,04	0,970
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	0,65	1,15	0,57	0,568
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	-2,42	1,17	-2,07	0,039
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,38	1,15	0,33	0,742
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-0,28	1,18	-0,24	0,812
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-0,59	1,28	-0,46	0,645
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-1,42	1,55	-0,92	0,360
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	-11,00	1,52	-7,24	8,74E-13
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	1,01	1,25	0,81	0,419
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,11	1,31	0,08	0,934
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-0,58	1,50	-0,38	0,701
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-6,40	2,07	-3,09	0,002
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	-16,80	2,50	-6,72	2,97E-11
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	7,97	1,42	5,60	2,69E-08
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	4,27	1,49	2,86	0,004
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	-5,01	2,00	-2,51	0,012
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	-10,98	3,26	-3,37	0,001
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	9,76	2,26	4,32	1,74E-05
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	3,91	2,40	1,63	0,104
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	-5,50	3,15	-1,75	0,081
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	10,83	2,97	3,64	0,0003
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	2,63	3,11	0,84	0,399
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : masa ciała	154,79	125,84	1,23	0,219
temperatura 10°C : masa ciała	-89,66	130,63	-0,69	0,493
temperatura 30°C : masa ciała	43,98	128,53	0,34	0,732
temperatura 35°C : masa ciała	84,48	158,56	0,53	0,594
temperatura 40°C : masa ciała	24,88	170,95	0,15	0,884

Tabela 46Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 32, model 1) dla powierzchni wybarwionych lipidów u osobników J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (powierzchnia wybarwionych lipidów), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura inkubacji [°C]	Czas inkubacji [godzina]	Powierzchnia wybarwionych linidów [%]	Dolna wartość [%]	Górna wartość [%]	SE
5	1	60,87	58,89	62,85	1,01
10	1	62,90	60,90	64,91	1,02
20	1	61,82	60,11	63,53	0,87
30	1	61,22	59,44	63,00	0,91
35	1	59,85	57,80	61,91	1,05
40	1	59,16	57,25	61,07	0,97
5	2	60,42	58,54	62,31	0,96
10	2	62,21	60,42	64,00	0,91
20	2	60,88	59,39	62,37	0,76
30	2	60,23	58,82	61,65	0,72
35	2	59,56	57,99	61,13	0,80
40	2	55,80	54,45	57,15	0,69
5	8	60,00	58,24	61,76	0,90
10	8	61,37	59,83	62,92	0,79
20	8	60,57	59,30	61,84	0,65
30	8	59,38	58,27	60,49	0,57
35	8	57,18	56,07	58,30	0,57
40	8	46,91	45,77	48,05	0,58
5	24	59,90	58,39	61,41	0,77
10	24	61,03	59,73	62,33	0,66
20	24	59,84	58,72	60,95	0,57
30	24	58,66	57,54	59,78	0,57
35	24	51,47	49,60	53,34	0,95
40	24	40,38	37,46	43,30	1,49
5	336	30,85	29,53	32,18	0,68
10	336	29,20	28,04	30,35	0,59
20	336	23,84	22,74	24,93	0,56
30	336	18,22	16,40	20,05	0,93
35	336	10,89	6,68	15,09	2,14
40	336	NA	NA	NA	NA
5	1008	16,40	15,23	17,57	0,60
10	1008	12,58	11,14	14,01	0,73
20	1008	7,58	5,39	9,78	1,12
30	1008	1,49	-2,05	5,03	1,80
35	1008	NA	NA	NA	NA
40	1008	NA	NA	NA	NA
5	1344	11,02	9,21	12,82	0,92
10	1344	4,85	2,65	7,05	1,12
20	1344	1,14	-2,14	4,43	1,68

30	1344	NA	NA	NA	NA
35	1344	NA	NA	NA	NA
40	1344	NA	NA	NA	NA

Tabela 47Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 32, model 1) dla powierzchni wybarwionych lipidów u osobników J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i masy ciała; wartość oszacowania średniej (powierzchnia wybarwionych lipidów), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Oszacowania efektów dla temperatur 30°C, 35°C i 40°C są niemożliwe do wyliczenia z uwagi na strukturę modelu; oznaczono jako "NA" (*not available*).

Temperatura	Masa	Powierzchnia wybarwionych	Dolno wortość [0/]	Cánna mantaká [0/]	SE
inkubacji [°C]	ciała [µg]	lipidów [%]	Doina wartose [76]	Gorna wartose [76]	SE
5	0,03	44,51	39,76	49,26	2,42
10	0,03	49,69	44,91	54,46	2,43
20	0,03	45,40	41,62	49,18	1,93
30	0,03	NA	NA	NA	NA
35	0,03	NA	NA	NA	NA
40	0,03	NA	NA	NA	NA
5	0,04	45,76	42,78	48,75	1,52
10	0,04	48,50	45,62	51,37	1,47
20	0,04	45,11	43,02	47,20	1,07
30	0,04	NA	NA	NA	NA
35	0,04	NA	NA	NA	NA
40	0,04	NA	NA	NA	NA
5	0,05	47,02	45,77	48,26	0,63
10	0,05	47,31	46,28	48,33	0,52
20	0,05	44,81	44,28	45,35	0,27
30	0,05	NA	NA	NA	NA
35	0,05	NA	NA	NA	NA
40	0,05	NA	NA	NA	NA
5	0,06	48,27	47,53	49,01	0,38
10	0,06	46,12	45,06	47,17	0,54
20	0,06	44,52	43,09	45,95	0,73
30	0,06	NA	NA	NA	NA
35	0,06	NA	NA	NA	NA
40	0,06	NA	NA	NA	NA
5	0,07	49,52	47,10	51,95	1,24
10	0,07	44,92	42,01	47,84	1,48
20	0,07	44,23	41,12	47,34	1,58
30	0,07	NA	NA	NA	NA
35	0,07	NA	NA	NA	NA
40	0,07	NA	NA	NA	NA

Tabela 48Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w wartości masy lipidów u osobników J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 33, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Zmienna	β	SE	t	р
Wyraz wolny	0,0356	0,0004	99,99	< 2e-16
temperatura 5°C	0,0014	0,0005	2,88	0,0041
temperatura 10°C	0,0011	0,0005	2,17	0,0302
temperatura 30°C	- 0,0008	0,0005	-1,55	0,1214
temperatura 35°C	- 0,0057	0,0005	-11,31	< 2e-16
temperatura 40°C	- 0,0125	0,0005	-24,81	< 2e-16
czas inkubacji 2h	- 0,0010	0,0005	-2,06	0,0401
czas inkubacji 8h	- 0,0023	0,0005	-4,56	5,70E-06
czas inkubacji 24h	- 0,0036	0,0005	-7,20	1,19E-12
czas inkubacji 336h	- 0,0235	0,0005	-46,82	< 2e-16
czas inkubacji 1008h	- 0,0323	0,0005	-64,34	< 2e-16
czas inkubacji 1344h	- 0,0350	0,0005	-69,59	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	0,0006	0,0007	0,90	0,3704
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	0,0002	0,0007	0,32	0,7524
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	- 0,0005	0,0007	-0,75	0,4543
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	- 0,0002	0,0007	-0,23	0,8217
temperatura 40°C : czas inkubacji 2h	- 0,0000	0,0007	-0,03	0,9726
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	0,0014	0,0007	1,93	0,0540
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	0,0005	0,0007	0,64	0,5207
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	- 0,0012	0,0007	-1,75	0,0800
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	- 0,0017	0,0007	-2,45	0,0143
temperatura 40°C : czas inkubacji 8h	- 0,0005	0,0007	-0,64	0,5215
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	0,0016	0,0007	2,22	0,0270
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	0,0006	0,0007	0,83	0,4067
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	- 0,0019	0,0007	-2,64	0,0084
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	- 0,0028	0,0007	-3,99	7,07E-05
temperatura 40°C : czas inkubacji 24h	- 0,0024	0,0007	-3,35	0,0008
temperatura 5°C : czas inkubacji 336h	0,0042	0,0007	5,84	6,85E-09
temperatura 10°C : czas inkubacji 336h	0,0025	0,0007	3,47	0,0005
temperatura 30°C : czas inkubacji 336h	- 0,0033	0,0007	-4,64	3,97E-06
temperatura 35°C : czas inkubacji 336h	- 0,0027	0,0007	-3,81	0,0001
temperatura 40°C : czas inkubacji 336h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1008h	0,0032	0,0007	4,53	6,68E-06
temperatura 10°C : czas inkubacji 1008h	0,0019	0,0007	2,60	0,0094
temperatura 30°C : czas inkubacji 1008h	- 0,0020	0,0007	-2,83	0,0047
temperatura 35°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1008h	NA	NA	NA	NA
temperatura 5°C : czas inkubacji 1344h	0,0023	0,0007	3,29	0,0011
temperatura 10°C : czas inkubacji 1344h	0,0009	0,0007	1,22	0,2246
temperatura 30°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 35°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA
temperatura 40°C : czas inkubacji 1344h	NA	NA	NA	NA

Tabela 49Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 33, model 1) dla masy lipidów u osobników J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (masa lipidów), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE). Część współczynników, oznaczona jako "NA" (*not available*), była niemożliwa do oszacowania z uwagi na brak danych dla niektórych kombinacji wartości zmiennych.

Temperatura	Czas inkubacji	Masa	Dolno wortość [ug] Córno wortość [ug		SE	
inkubacji [°C]	[godzina]	lipidów [µg]	Doina wartosc [µg]	Gorna wartose [µg]	SE	
5	1	0,037	0,0363	0,0377	0,0004	
10	1	0,0366	0,0359	0,0373	0,0004	
20	1	0,0355	0,0348	0,0362	0,0004	
30	1	0,0348	0,0341	0,0355	0,0004	
35	1	0,0299	0,0292	0,0306	0,0004	
40	1	0,0231	0,0224	0,0238	0,0004	
5	2	0,0366	0,0359	0,0373	0,0004	
10	2	0,0358	0,0351	0,0365	0,0004	
20	2	0,0345	0,0338	0,0352	0,0004	
30	2	0,0332	0,0325	0,0339	0,0004	
35	2	0,0287	0,028	0,0294	0,0004	
40	2	0,022	0,0213	0,0227	0,0004	
5	8	0,0361	0,0354	0,0368	0,0004	
10	8	0,0348	0,0341	0,0355	0,0004	
20	8	0,0333	0,0326	0,034	0,0004	
30	8	0,0312	0,0305	0,0319	0,0004	
35	8	0,0258	0,0251	0,0265	0,0004	
40	8	0,0203	0,0196	0,021	0,0004	
5	24	0,035	0,0343	0,0356	0,0004	
10	24	0,0336	0.0329	0,0343	0,0004	
20	24	0,0319	0.0312	0,0326	0,0004	
30	24	0,0293	0,0286	0,03	0,0004	
35	24	0,0234	0.0227	0,0241	0,0004	
40	24	0,0171	0.0164	0,0178	0,0004	
5	336	0.0176	0.0169	0.0183	0.0004	
10	336	0.0156	0.0149	0.0163	0.0004	
20	336	0.012	0.0113	0.0127	0.0004	
30	336	0.0079	0.0072	0.0086	0.0004	
35	336	0,0036	0.0029	0,0043	0,0004	
40	336	NA	NA	NA	NA	
5	1008	0.0079	0.0072	0.0086	0.0004	
10	1008	0.0061	0.0054	0.0068	0.0004	
20	1008	0.0032	0.0025	0.0039	0.0004	
30	1008	0.0004	-0.0003	0.0011	0.0004	
35	1008	NA	NA	NA	NA	
40	1008	NA	NA	NA	NA	
5	1344	0.0043	0.0036	0.005	0.0004	
10	1344	0.0025	0.0018	0.0032	0.0004	
20	1344	0,0006	-0.0001	0.0013	0 0004	
30	1344	NA	NA	NA	NA	
35	1344	NA	NA	NA	NA	
40	1344	NA	NA	NA	NA	

Tabela 50Z. Współczynniki modelu GLM objaśniającego różnice w aktywności ruchowej osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla*, wskazanego jako najlepiej dopasowany do danych w ramach selekcji modeli (Tab. 34, model 1). Dla modelu optymalnego podano wartości współczynników ( $\beta$ ), błąd standardowy (SE), wartość statystyki (t), wartość prawdopodobieństwa (p).

Zmienna	β	SĒ	t	р
Wyraz wolny	53,0	0,5	104,2	< 2e-16
temperatura 5°C	-46,6	0,7	-64,8	< 2e-16
temperatura 10°C	-26,9	0,7	-37,4	< 2e-16
temperatura 30°C	8,1	0,7	11,2	< 2e-16
temperatura 35°C	-28,9	0,7	-40,2	< 2e-16
czas inkubacji 2h	0,6	0,7	0,8	0,431
czas inkubacji 8h	0,9	0,7	1,3	0,195
czas inkubacji 24h	1,3	0,7	1,8	0,071
temperatura 5°C : czas inkubacji 2h	-1,8	1,0	-1,7	0,083
temperatura 10°C : czas inkubacji 2h	-4,8	1,0	-4,8	2,54E-06
temperatura 30°C : czas inkubacji 2h	-4,2	1,0	-4,1	4,17E-05
temperatura 35°C : czas inkubacji 2h	-5,8	1,0	-5,7	1,88E-08
temperatura 5°C : czas inkubacji 8h	-2,9	1,0	-2,9	0,004
temperatura 10°C : czas inkubacji 8h	-7,5	1,0	-7,4	5,73E-13
temperatura 30°C : czas inkubacji 8h	-11,3	1,0	-11,1	< 2e-16
temperatura 35°C : czas inkubacji 8h	-9,8	1,0	-9,6	< 2e-16
temperatura 5°C : czas inkubacji 24h	-4,4	1,0	-4,4	1,54E-05
temperatura 10°C : czas inkubacji 24h	-9,6	1,0	-9,4	< 2e-16
temperatura 30°C : czas inkubacji 24h	-15,9	1,0	-15,6	< 2e-16
temperatura 35°C : czas inkubacji 24h	-19,7	1,0	-19,3	< 2e-16

Tabela 51Z. Oszacowania średnich dla najlepszego modelu wskazanego w ramach selekcji modeli GLM (Tab. 34, model 1) dla aktywności ruchowej osobników stadium J2 *Meloidogyne hapla* w zależności od temperatury i czasu inkubacji; wartość oszacowania średniej (aktywność ruchowa), dolna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (dolna wartość), górna wartość 95% przedziału ufności oszacowania średniej (górna wartość), błąd standardowy oszacowania średniej (SE).

Temperatura	Czas inkubacji	Aktywność	Dolna	Górna	SF
inkubacji [°C]	[godzina]	ruchowa [L/5min]	wartość [L/5min]	wartość [L/5min]	SE
5	1	6,4	5,4	7,4	0,51
10	1	26,1	25,1	27,1	0,51
20	1	53,0	52,0	54,0	0,51
30	1	61,1	60,1	62,1	0,51
35	1	24,1	23,1	25,1	0,51
5	2	5,2	4,2	6,2	0,51
10	2	21,8	20,8	22,8	0,51
20	2	53,6	52,6	54,6	0,51
30	2	57,4	56,4	58,4	0,51
35	2	18,8	17,8	19,8	0,51
5	8	4,4	3,4	5,4	0,51
10	8	19,5	18,5	20,5	0,51
20	8	53,9	52,9	54,9	0,51
30	8	50,7	49,7	51,7	0,51
35	8	15,2	14,2	16,2	0,51
5	24	3,2	2,2	4,2	0,51
10	24	17,8	16,8	18,8	0,51
20	24	54,3	53,3	55,3	0,51
30	24	46,5	45,5	47,5	0,51
35	24	5,7	4,7	6,7	0,51