

dr hab. Mariola Andrejko
Zakład Immunobiologii
Instytut Biologii i Biochemii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Lublin

Lublin, 10.05.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Magdaleny Lis

**pt.: Wpływ temperatury na konkurencję pomiędzy *Heterorhabditis megidis*
a *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida)**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Magdaleny Lis wykonana została w Laboratorium Biokontroli, Produkcji i Aplikacji EPN, ICBN Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II, pod kierunkiem dr hab. Dariusza Skarżyńskiego, prof. UW (Uniwersytet Wrocławski). Promotorem pomocniczym jest dr Waldemar Kazimierzak z Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego.

Doktorantka podjęła się zbadania zakresu oddziaływania temperatury na konkurencję pomiędzy nicieniami entomopatogenicznymi (EPN) *Heterorhabditis megidis* oraz *Steinernema* spp. Te obligatoryjne parazytoidy owadów są ważną grupą organizmów ze względu na potencjał do praktycznego zastosowania jako alternatywa lub uzupełnienie dla tradycyjnych metod ochrony roślin przed szkodnikami. Ze względu na zachodzące na siebie zakresy preferencji termicznych w środowisku glebowym, w którym występują nicienie, należy przypuszczać, że dochodzi między nimi do konkurencji międzygatunkowej o zasoby pokarmowe. Ponieważ temperatura jest jednym z najważniejszych czynników abiotycznych środowiska, z pewnością wpływa również na antagonistyczne oddziaływania pomiędzy nicieniami. Biorąc powyższe pod uwagę, uważam, że wybór tematu rozprawy jest w pełni uzasadniony.

Oceniana rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Składa się z następujących rozdziałów: wstęp, cele badań, przegląd badań, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, wnioski, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, bibliografia. Całość poprzedzona jest spisem treści, jasno informującym o treści zawartej w opracowaniu. Na końcu rozprawy zamieszczone zostały, już bez podziału na rozdziały, skład

podłoży mikrobiologicznych, wykaz stosowanych skrótów, spis tabel, spis wykresów. Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Przyznam, że mam wątpliwości co do tytułów i kolejności pierwszych rozdziałów pracy tj.: wstęp (2 strony), cele badań i przegląd badań. Wydaje mi się, że lepszy byłby układ „tradycyjny”, tj.: na początku wstęp zawierający przegląd literatury a następnie cele badań. Zwykle hipotezę badawczą czy też cele badań określa się po zapoznaniu się z wynikami dostępnymi w literaturze.

W tematykę rozprawy wprowadza 20 stronicowy „Przegląd badań”, w którym wyróżnić można 2 wątki tematyczne. W pierwszym z nich Doktorantka zamieściła wiadomości dotyczące badanej w pracy interakcji pomiędzy organizmami (konkurencji). Opisała podstawowe typy oddziaływań konkurencyjnych oraz konsekwencje tych oddziaływań. Informacje te zostały poparte odpowiednio dobranymi przykładami. Druga, większa część tego rozdziału, została poświęcona nicieniom entomopatogenicznym oraz związanym z nimi bakteriom symbiotycznym (*Photorhabdus* spp. i *Xenorhabdus* spp.). Autorka szczegółowo opisała, m.in.: cykl życiowy tych organizmów, występowanie, sposób wyszukiwania żywicieli, spektrum porażanych owadów. Bardzo istotne było zamieszczenie podrozdziału (3.2.9) dotyczącego konkurencji między EPN. Doktorantka w tym miejscu umiejętnie przybliżyła wagę problemu jakim jest dokładne poznanie różnych aspektów konkurencji między gatunkami nicieni entomopatogenicznych. Ten rozdział rozprawy został napisany merytorycznie bardzo dobrze, opiera się na odpowiednio cytowanym piśmiennictwie światowym, co pozwala czytelnikowi szczegółowo zapoznać się z zagadnieniami analizowanymi w pracy.

Zasadniczym celem rozprawy, jasno określonym przez Doktorantkę (rozdział 2), było zbadanie w jaki sposób temperatura modyfikuje konkurencję pomiędzy nicieniami z rodzaju *H. megidis* a *Steinernema* spp. W rozdziale tym określone zostały również 3 cele szczegółowe, dzięki którym osiągnięty został główny cel rozprawy.

W kolejnej części pracy (rozdział 4) Autorka szczegółowo opisała materiały i metody stosowane podczas realizowania zaplanowanych eksperymentów. Należy podkreślić, że zarówno metody laboratoryjne jak i metody statystyczne zostały prawidłowo dobrane do podjętych zadań badawczych.

Wyniki badań (rozdział 5) Doktorantka przedstawiła w formie tabelarycznej (6 tabel) oraz graficznej (9 wykresów). Autorka umiejętnie posłużyła się kolorem aby uwypuklić dane zamieszczone w tabelach i na wykresach, co bardzo ułatwiło analizę oraz interpretację wyników.

Za główne osiągnięcie Doktorantki należy uznać udowodnienie wpływu temperatury na patogeniczność larw infekcyjnych, czas śmierci owadów żywicielskich oraz uwalnianie symbiotycznych bakterii. Wzrost temperatury miał istotne znaczenie podczas jednoczesnej ekspozycji owadów testowanych na pojedyncze larwy infekcyjne *H. megidis* i *Steinernema* spp. Autorka dowiodła, że wzrost temperatury zwiększał szanse *H. megidis* do zabicia gąsienic *Galleria mellonella* w porównaniu do zimnolubnych gatunków *Steinernema* (*S. affine* i *S. kraussei*). Natomiast nie miała wpływu w przypadku konkurencji z gatunkiem o szerokim zakresie preferencji termicznych (*S. arenarium*).

Zgodnie z założonym celem Doktorantka udowodniła istotny wpływ temperatury na patogeniczność larw infekcyjnych nicieni poprzez zmiany w ich infekcyjności (z wyjątkiem larw *S. arenarium*). Natomiast zmiany temperatury nie miały wpływu na stopień skolonizowania larw infekcyjnych badanych gatunków EPN przez symbionty bakteryjne. Badany parametr był zależny tylko od gatunku nicieni.

Kolejnym celem pracy było określenie średniego czasu letalnego (LT_{50}), czyli czasu upływającego od momentu ekspozycji organizmów testowych na larwy infekcyjne nicieni do śmierci 50% owadów, w zależności od temperatury, w której prowadzone były doświadczenia. Doktorantka stwierdziła, że w zdecydowanej większości przypadków wzrost temperatury istotnie wpływał na skrócenie średniego czasu zamierania. Zaobserwowała również występowanie istotnych statystycznie międzygatunkowych różnic pomiędzy wartościami LT_{50} . Dodatkowo stwierdziła zależność między odsetkiem zainfekowanych gąsienic *G. mellonella* a gatunkiem EPN oraz czasem ekspozycji. Najszybciej owady były infekowane przez dwa gatunki nicieni tj.: *S. carpocapsae* i *H. megidis*, najwolniej zaś przez *S. affine*. Temperatura miała również istotny wpływ na czas, po którym w hemolimfie owadów modelowych stwierdzano obecność bakterii symbiotycznych EPN.

Ostatnim z założonych problemów, które Doktorantka podjęła się rozwiązania było sprawdzenie czy interakcje pomiędzy bakteriami symbiotycznymi badanych nicieni są zależne od temperatury hodowli. W tym celu badała jednoczesny wzrost bakterii na pożywce stałej (NBTA) oraz na pożywce płynnej (LB) podczas inkubacji w 3 różnych temperaturach. Doktorantka uzyskała rezultaty wskazujące, że bakteryjne symbionty wzajemnie hamowały swój wzrost na podłożu NBTA a wielkość stref zahamowania zależała od temperatury, w której prowadzono hodowle. Wyniki uzyskane w eksperymentach, w których bakterie rosły w pożywce płynnej nie były jednoznaczne i w wielu przypadkach nie potwierdziły rezultatów obserwowanych z użyciem podłoża stałego. Moim zdaniem, na tym etapie badań trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski dotyczące wpływu temperatury inkubacji na jednoczesny

wzrost badanych bakterii. Z dużym prawdopodobieństwem za hamowanie wzrostu odpowiedzialne były bakteryjne metabolity wtórne wydzielane do podłoża. Jednak w tego typu badaniach porównawczych należy wziąć pod uwagę wpływ wielu innych czynników, m.in.: skład podłoża, dyfuzję metabolitów w podłożu, stężenie metabolitów, szybkość podziału bakterii, oczywiście również temperaturę, która ma wpływ na większość tych parametrów. Wyniki te z pewnością są interesujące ale wymagają dalszych potwierdzeń.

W obszernej dyskusji (rozdział 6) Autorka umiejętnie konfrontuje wyniki swoich prac eksperymentalnych z osiągnięciami innych badaczy. Dyskusja jest napisana w sposób dojrzały, wskazujący na dobrą znajomość literatury przedmiotu, metodologii i wyników badań uzyskanych przez innych autorów. Część doświadczalna zakończona jest podsumowaniem, które bardzo ułatwia analizę i interpretację uzyskanych wyników oraz siedmioma wnioskami. Generalnie wnioski zostały sformułowane prawidłowo, jasno odzwierciedlają uzyskane wyniki eksperymentów. Spis cytowanych pozycji literaturowych („Bibliografia”) jest bardzo obszerny, liczy ponad 300 pozycji (pozycje literatury wymienione w spisie nie są numerowane), jest zredagowany jednolicie. Cytowane artykuły są dobrane poprawnie i są to na ogół publikacje z ostatnich lat.

Z obowiązku recenzenta, chciałabym zwrócić uwagę na fragmenty pracy, do których mam pewne zastrzeżenia:

1. W rozdziale 5 („Wyniki”), w podrozdziale 5.5, zamieszczone zostały rezultaty dotyczące uwalniania bakterii symbiotycznych przez nicienie. W przypadku nicienia *H. megidis* gatunek związanej z nim symbiotycznej bakterii (*P. temperata temperata*), Autorka zamieściła już w rozdziale Materiały i metody (podrozdział 4.1). Podobnego zestawienia zabrakło jednak w przypadku nicieni z rodzaju *Steinernema* spp. Jest to istotne ze względu na fakt, że w badaniach stosowano 5 gatunków nicieni z tego rodzaju, więc umieszczenie wykazu nicieni i związanych z nimi bakterii symbiotycznych ułatwiłoby znacznie analizę wyników. Na przykład, w tabeli 3 podane są tylko gatunki stosowanych nicieni, brak jest natomiast nazw bakterii symbiotycznych, a w tekście Autorka posługuje się często tylko nazwami bakterii symbiotycznych.
2. W podsumowaniu zamieszczone zostało zdanie „Wzrost temperatury z reguły zmniejszał szerokość stref zahamowania wzrostu bakterii na pożywce stałej”. Temperatura jest tylko czynnikiem pośrednim, przyczyną braku wzrostu bakterii w badanym podłożu mogą być na przykład antybiotyki czy inne metabolity

konkurencyjnej bakterii, temperatura może wpływać na wydzielanie tych substancji, na optymalny wzrost bakterii itp., co w konsekwencji może oczywiście powodować zmniejszenie stref zahamowania wzrostu.

3. W pracy Doktorantka badała patogeniczność larw infekcyjnych, następnie w dyskusji próbuje konfrontować te dane z wynikami dostępnymi w literaturze. Wydaje mi się to trudne a nawet niemożliwe w przypadku gdy patogeniczność była określana według własnej definicji przyjętej na potrzeby tej rozprawy, oraz metodami różniącymi się od tych stosowanych przez innych badaczy. Uwaga ta dotyczy również szacowania wartości LT_{50} . Trudno porównywać te parametry gdy zastosowane zostały różne metody ekspozycji żywicieli na larwy infekcyjne oraz inne dawki nicieni. Badania porównawcze mają sens kiedy stosowane są podobne metody, dawki, zbliżone warunki itp.
4. We wnioskach (punkt 2) pojawia się stwierdzenie „Patogeneza owadów żywicielskich porażonych przez EPN.” Wydaje mi się, że pojęcia patogeneza używa się raczej w zestawieniu do czynników sprawczych, powodujących proces chorobowy, czyli bardziej poprawne byłoby sformułowanie na przykład: „Mechanizmy patogenezy nicieni uruchamiane podczas zakażenia owadów żywicielskich...”

Powyższe nieliczne uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na końcową, wysoce pozytywną opinię o przedstawionej do recenzji pracy. Podsumowując, uważam że rozprawa jest wartościowym opracowaniem opartym na oryginalnych wynikach, zawiera elementy nowości naukowej. Wyniki badań z jednej strony wyjaśniają fizjologię nicieni entomopatogenicznych z drugiej zaś mogą być wykorzystane praktycznie do kontroli patogeniczności larw infekcyjnych EPN. Patogeniczność może być wyznacznikiem jakości laboratoryjnie i komercyjnie produkowanych preparatów opartych na entomopatogenicznych nicieniach. Praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595; z późniejszymi zmianami). Z pełnym przekonaniem przedkładałam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wnioski o dopuszczenie mgr Magdaleny Lis do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę zarówno zakres przeprowadzonych badań jak i wysoką wartość merytoryczną wniosku o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Małgorzata Antkowiak