

dr hab. Sebastian Hofman, prof. UJ
Zakład Anatomii Porównawczej,
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych UJ
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

Kraków 07.09.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgra Łukasza Gajdy pt. „Pozycja troficzna wazonkowca białego (*Enchytraeus albidus*) w kontekście badań molekularnych”,
wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Piotra Świątka oraz promotora
pomocniczego dr hab. Agaty Daszkowskiej-Golec, prof. UŚ, z Uniwersytetu Śląskiego
w Katowicach.

Podstawą formalno – prawną przygotowania recenzji rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Gajdy pt. „Pozycja troficzna wazonkowca białego (*Enchytraeus albidus*) w kontekście badań molekularnych” jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z dnia 28.06.2024 r. podjęta zgodnie z art. 190 ust. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2023 r. poz. 742, ze zm.).

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska składa się z trzech, powiązanych tematycznie, artykułów, które zostały opublikowane w języku angielskim w renomowanych zagranicznych, wysoko punktowanych, czasopismach naukowych:

1. Gajda A., Gorgoń S., Urbisz A. Z. 2017. Food preferences of enchytraeids. *Pedobiologia* 63: 19336. Impact Factor: 2,0; punkty MEiN: 70;
2. Gajda A., Daszkowska-Golec A., Świątek P. 2024a. Discovery and characterization of the α -amylases cDNAs from *Enchytraeus albidus* shed light on the evolution of „*Enchytraeus-Eisenia*” type Amy homologs in Annelida. *Biochimie* 221: 38359. Impact Factor: 3,3; punkty MEiN: 100;
3. Gajda A., Daszkowska-Golec A., Świątek P. 2024b. Trophic position of the white worm (*Enchytraeus albidus*) in the context of digestive enzyme genes revealed by transcriptomics analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 25: 4685. Impact Factor: 4,9; punkty MEiN: 140;

Sumarycznie IF wynosi 10,2, a punkty ministerialne wynoszą 310. We wszystkich pracach doktorant jest pierwszym autorem, a w dwóch pierwszych również autorem korespondencyjnym. Prace są powiązane ze sobą tematycznie i stanowią logiczną ciągłość badań. Przedstawione w rozprawie doktorskiej publikacje poprzedzone są czterdziestostronicowym autoreferatem, zawierającym klasyczne rozdziały: wprowadzenie, materiały i metody, omówienie wyników i wniosków oraz spis literatury. W rozprawie umieszczone zostały również oświadczenia współautorów prac o wkładzie merytorycznym w powstanie konkretnej publikacji. Przedstawiony autoreferat jest napisany bardzo poprawnie i stanowi właściwie odrębną całość, zawierającą również tabele i ryciny, która jasno wskazuje na zakres prac Doktoranta i uzyskane przez Niego wyniki. Doktorant bardzo dobrze wprowadził w badane zagadnienie, pokazał korzyści (nie tylko poznawcze) jakie można osiągnąć z badań nad wazonkowcem białym, dokładnie przedstawił cele rozprawy i hipotezy badawcze oraz zastosowane metody, a także jasno wykazał najważniejsze wyniki. Drobne błędy edytorskie, jak niejednolita czcionka, nieprecyzyjne sformułowania typu „strzała” zamiast „strzałka” i inne drobiazgi w niczym nie umniejszają wysokiej jakości autoreferatu.

Rozprawa doktorska mgr. Łukasza Gajdy dotyczy pozycji troficznej i analiz molekularnych wazonkowca białego (*Enchytraeus albidus* Henle, 1837), który był jednym z pierwszych opisanych gatunków w obrębie rodziny Enchytraeidae i jest jednocześnie gatunkiem typowym rodzaju. Wazonkowce są niezwykle ważną grupą, zarówno w kontekście badań podstawowych, jak i ich ogromnej roli w odpowiednim przebiegu procesów glebowych, takich jak dekompozycja martwej materii organicznej, powstawanie próchnicy i wpływ na aktywność mikroorganizmów. Trafny wybór wazonkowca białego jako modelu badawczego potwierdza również fakt, że jest to gatunek dość szeroko rozpowszechniony geograficznie oraz zasiedlający wiele siedlisk, tak lądowych, jak i wodnych. Oprócz znaczenia gospodarczego i ekonomicznego, gatunek ten jest również niezwykle ciekawy z punktu widzenia zmienności genetycznej. Jest on przykładem grupy gatunków kryptycznych, a właściwie pseudokryptycznych, które znacznie różnią się genetycznie, ale wykazują tylko niewielkie różnice morfologiczne. Z tych powodów poznanie zmienności genetycznej wazonkowca i jego roli w glebowych sieciach troficznych jest bardzo istotnym tematem i badania nad nim są niezwykle ważne. Szczególnie ciekawe są badania stosunkowo wąskimi specjalizacji pokarmowych wśród organizmów glebowych charakteryzujących się dużą bioróżnorodnością i współwystępowaniem wielu gatunków glebowych w tej samej niszy troficznej. Badania dotyczące wyżej wymienionych zagadnień są jednak dość trudne, choćby

ze względu na brak dokładnej wiedzy co do pozycji troficznej poszczególnych gatunków, na co wpływają skomplikowane mechanizmy odżywiania, nieznan status taksonomiczny organizmów glebowych (wynikający choćby ze zmienności kryptycznej), problemy z odróżnieniem pobieranego pokarmu od tego co jest asymilowane, elastyczność pokarmowa i wiele innych. Jedynym wyjściem jest zastosowanie nowoczesnych technik molekularnych, oczywiście w połączeniu z metodami klasycznymi. Takie, całkowicie poprawne, podejście zastosował Doktorant w swoich badaniach.

Ogólnym celem rozprawy było poznanie pozycji troficznej wazonkowca białego na podstawie analizy jego zdolności trawiennych. Pierwszym etapem było sprawdzenie istniejącej wiedzy na temat preferencji pokarmowej przedstawicieli rodziny Enchytraeidae, a efekty tej dogłębnej analizy wykonanej przez Doktoranta złożyły się na pierwszą publikację wchodzącą w skład rozprawy. Opisuje ona różne źródła pożywienia wazonkowców, selektywne pobieranie przez nie pokarmu i trawienie oraz zawiera opisy aktywności enzymatycznej. Znajduje się tu również analiza dwóch eksperymentów obrazujących możliwy udział mikroorganizmów w procesie dekompozycji materii roślinnej oraz wpływ wazonkowców na zdrowie roślin. Wkład Doktoranta w powstanie tej pracy jest kluczowy, obejmuje m. in. ustalenie koncepcji pracy, analizę literatury, wykonanie eksperymentów oraz wszelkie prace związane z przygotowaniem manuskryptu i przeprowadzenie go przez wszystkie etapy recenzji.

Najważniejszymi wnioskami wynikającymi z tej pracy było zaproponowanie podziału rodziny na dwie grupy troficzne (saprofagi pierwszo i drugorzędowe) oraz wykazanie, że wazonkowce nie są pasożytami roślin i nie produkują celulaz (lub ich zdolności celulolityczne są marginalne). Co więcej ich opisywana wcześniej zdolność trawienia celulozy może wynikać z działalności mikroorganizmów, które następnie mogą być trawione przez wazonkowce. Na podstawie tej analizy Doktorant postawił dwie hipotezy, które próbował przetestować w dalszej części swojej rozprawy: 1) wazonkowiec biały nie jest saprofagiem pierwszorzędownym (nie posiada ekspresji genów kodujących celulazę) oraz 2) wazonkowiec biały jest saprofagiem drugorzędowym (wykazuje ekspresję genów kodujących enzymy potrzebne do lizy bakterii lub grzybów).

Kolejnym etapem badań były próby amplifikacji wybranych genów kodujących enzymy trawienne wazonkowca metodą RT-PCR oraz identyfikacja i analiza ekspresji genów za pomocą techniki RNA-Seq. Analizy te złożyły się na drugą pracę wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej, w której Doktorant był wiodącym autorem niemal na wszystkich etapach, począwszy od analiz laboratoryjnych i bioinformatycznych, po wszystkie dalsze

etapy prowadzące do opublikowania manuskryptu. Wśród wielu interesujących wyników należy wskazać wykrycie obecności dwóch genów kodujących α -amylazy, które są prawdopodobnie jedynymi w obrębie rodzaju *Enchytraeus*, przy czym jeden z nich charakteryzuje się wysokim polimorfizmem. Jest to ważne odkrycie, gdyż obecność dwóch kopii genów kodujących ten sam enzym może mieć duże znaczenie adaptacyjne i wpływać na kształtowanie się bioróżnorodności sieci troficznych w glebie. Doktorant zaproponował również filogenezę głównych grup pierścienic na podstawie sekwencji białkowych badanych enzymów.

Dla określenia pozycji troficznej wazonkowca białego w glebie Doktorant analizował jego profil enzymatyczny na podstawie danych uzyskanych z analizy transkryptomów, co stanowi trzecią pracę rozprawy doktorskiej. Ponownie Doktorant jest autorem wiodącym w większości etapów powstawania pracy. Dzięki tym badaniom udało się zidentyfikować ponad 50 różnych enzymów trawiennych. Wśród genów ulegających ekspresji wykryto m. in. enzymy celulolityczne oraz enzymy biorące udział w trawieniu mikroorganizmów. Bardzo dobrze wykonane analizy filogenetyczne i bioinformatyczne rzucają światło nie tylko na pozycję troficzną wazonkowca białego, ale na wiele innych grup w obrębie skąposzczetów. W końcu dane te dają odpowiedź, która z dwóch hipotez postawionych przez Doktoranta jest bliższa prawdy - wazonkowiec biały łączy w sobie cechy saprofaga pierwszo- i drugorzędowego.

Podsumowując przedstawione przez Doktoranta publikacje niewątpliwie przyczyniły się do poznania pozycji troficznej wazonkowca białego, niezwykle ważnego w kontekście prawidłowego funkcjonowania tak złożonego siedliska, jakim jest gleba. Badania Doktoranta dostarczyły również innych pobocznych wyników, jak chociażby umożliwiły analizy filogenetyczne skąposzczetów. Nie mam właściwie uwag negatywnych do przedstawionej rozprawy, a poniższe zagadnienia/pytania wynikają głównie z ciekawości recenzenta. W autoreferacie moim zdaniem brakuje podsumowania omawiającego obie zaproponowane na wstępie hipotezy. Oczywiście, odpowiedź można znaleźć w samym tekście, jednak takie podsumowanie mogłoby stanowić dopełnienie i tak bardzo dobrze napisanego autoreferatu. Badane wazonkowce pochodziły z hodowli; czy istnieją badania, ewentualnie czy Doktorant przeprowadzał jakieś badania, podobne do przedstawionych w rozprawie (np. barkodowanie), na dzikich populacjach? Czy uzyskane barkody były porównywane w bazie danych BOLD Systems, czy są jakieś zbiorcze analizy pokazujące filogenezę/filogeografię wazonkowców dla COI lub innych fragmentów (podobnie jak dla wybranych enzymów trawiennych)? Czy istnieją dane pokazujące obecność konkretnych mikroorganizmów żyjących w układzie

pokarmowym wazonkowca (ewentualnych symbiontów?), czy Doktorant lub ktoś inny próbował takie mikroorganizmy wykazać, np. metodami molekularnymi? Według Doktoranta wazonkowiec biały to grupa gatunków kryptycznych, nasuwa się więc pytanie, czy zostały one opisane? Co to znaczy, że posiadają „subtelne różnice morfologiczne”? Czy różnią się w sekwencjach fragmentów używanych w barkodowaniu (jak COI), a jeśli tak, to jak duże są takie różnice? Skoro wazonkowce są używane jako zwierzęta modelowe w wielu dyscyplinach, czy też do produkcji pożywienia dla ryb, może warto opracować szybką metodę genetyczną dla identyfikacji tych gatunków, np. wymagającą namnożenia jedynie 2-3 fragmentów DNA (np. COI i kilku genów jądrowych).

Konkluzje

Rozprawa doktorska mgr. Łukasza Gajdy stanowi bez wątpienia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, na co wskazują niezwykle istotne wyniki obejmujące bardzo ważną (i jednocześnie słabo poznaną) grupę organizmów pełniących niebagatelną rolę w ekosystemach glebowych. Badania Doktoranta przyczyniły się m. in. do poznania pozycji troficznej wazonkowca białego, identyfikacji genów kodujących jego enzymy trawienne, określenia powiązań filogenetycznych w obrębie wazonkowców i grup pokrewnych. Wszystkie te wyniki mają nie tylko znaczną wagę poznawczą, ale również praktyczną. Pozwolą one lepiej poznać związki troficzne wśród organizmów glebowych i pokazują drogę, jaką należy badać inne organizmy, w tym jak wykorzystywać nowoczesne metody sekwencjonowania wielkoskalowego.

Przedstawione prace oraz autoreferat niewątpliwie świadczą o dużej wiedzy Doktoranta z zakresu nauk biologicznych. Wybór modelu badawczego, dogłębna analiza wstępna prowadząca do postawienia celów badań i hipotez naukowych, ich realizacja i testowanie, odpowiedni wybór metod badawczych (w tym nowoczesnych metod molekularnych), sprawne posługiwanie się literaturą naukową i wyciąganie wniosków oraz dyskusja otrzymanych wyników są wykonane na najwyższym poziomie. Wybór ważnego z naukowego, ale również praktycznego punktu widzenia, tematu pracy i zastosowanie odpowiednich metod umożliwiających testowanie zaplanowanych hipotez, świadczy również o samodzielności badawczej Doktoranta.

Biorąc pod uwagę, że podjęte badania stanowią oryginalne rozwiązanie ważnego problemu naukowego, posiadają znaczne wartości poznawcze, świadczą o dużej wiedzy

Autora z zakresu nauk biologicznych i jego umiejętnościach niezbędnych do samodzielnego prowadzenia badań oraz wyciągania wniosków, stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska mgr. Łukasza Gajdy spełnia wszelkie warunki ustawowe stawiane pracom doktorskim, na podstawie art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr. Łukasza Gajdy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Jednocześnie ze względu na duże znaczenie poznawcze i praktyczne uzyskanych wyników, poprawne przeprowadzenie badań przy zastosowaniu nowoczesnych metod badawczych oraz dużą wiedzę naukową Doktoranta wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. Sebastian Hofman, prof UJ