

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Barbary Meller
pt.: „Wpływ kwasu β -aminomasłowego na zmiany epigenetyczne w nabytej odporności systemicznej ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) względem *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary”

Wprowadzenie

W uzupełnieniu klasycznych technik ochrony roślin, nowe strategie biotechnologiczne zmierzają do wzmocnienia odporności roślin poprzez mobilizację i właściwe ukierunkowanie endogennych mechanizmów obronnych rośliny - gospodarza. Indukowanie wrodzonych mechanizmów obronnych roślin może dokonywać się poprzez zjawisko nabytej odporności systemicznej, kiedy to roślina w wyniku wstępnego, traktowania skutecznymi induktorami, staje się bardziej odporna w momencie wystąpienia silnego stresu następczego. Najnowsze doniesienia literaturowe zwracają uwagę na zjawisko kondycjonowania lub uwrażliwiania, tj. primingu, gdzie po pierwotnej indukcji uruchamiane są zmiany biochemiczne, które skutkują mobilizacją skutecznych mechanizmów obronnych względem patogenu. Takie nabywanie odporności jest niezwykle cenne, zwłaszcza w kontekście pojawiających się dowodów na to, że informacja o przebytej indukcji może być przekazywana przez roślinę do kolejnych pokoleń. Skuteczny priming z wykorzystaniem induktorów nabytej odporności systemicznej może mieć podłoże epigenetyczne, co jest niezwykle istotne w kontekście długotrwałego utrzymywania się informacji o przebyłym stresie.

Praca doktorska podjęta przez Doktorantkę wpisuje się w ten bardzo ważny kierunek badań i wzbogaca naszą wiedzę o nowe i ważne elementy.

Ocena szczegółowa dysertacji

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Barbary Meller jest opracowaniem zawartym na 116 stronach maszynopisu, zawiera 30 rycin złożonych, 5 tabel, szereg zdjęć i schematów. Tekst ocenianej rozprawy doktorskiej obejmuje istotne części składowe tj. wstęp, przegląd literatury, cel i założenia pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, aneks, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz 272

cytowania, głównie najnowszych pozycji literatury anglojęzycznej. Rozprawa zawiera także wykaz stosowanych skrótów. Napisana jest w formie przyjętej dla prac naukowych.

Praca wykonana pod kierunkiem Pani profesor dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek, w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, stanowi kontynuację wieloletnich badań Jej zespołu nad indukowanymi mechanizmami odporności ziemniaka na *Phytophthora infestans* – sprawcę zarazy ziemniaka. W związku z faktem, iż straty plonów ziemniaka wywoływane przez zarazę są istotne nie tylko dla gospodarki polskiej, ale także światowej, wybór tematyki rozprawy doktorskiej dokonany przez promotora i doktorantkę uważam za uzasadniony, tak ze względów naukowych jak i utylitarnych. Tego typu badania wskazują na możliwość wykorzystania naturalnych mechanizmów obronnych rośliny przed patogenami i mogą mieć znaczenie w ograniczaniu stosowania chemicznych środków ochrony roślin.

Nadrzędnym celem recenzowanej pracy była ocena skuteczności i trwałości nabywania odporności względem *P. infestans* przez rośliny ziemniaka indukowanego kwasem β -aminomasłowym oraz wskazanie znaczników epigenetycznych, powiązanych z regulacją ekspresji genów, kodujących białka kluczowe dla ukonstytuowania się nabytej odporności w ziemniaku.

Część teoretyczna pracy, czyli **Wstęp i przegląd literaturowy**, jest napisany rzeczowo i komunikatywnie, co świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury. Na podkreślenie zasługuje właściwe wyważenie informacji zawartych w poszczególnych podrozdziałach, w pełni wystarczających do dalszego śledzenia wyników pracy, ich interpretacji i wyciągania odpowiednich wniosków. W pierwszej kolejności Doktorantka opisuje rodzaje odporności roślin na patogeny, ogniskując uwagę na nabytej odporności systemicznej (SAR), charakterystyce stosowanych induktorów. W dalszej części Autorka porusza kwestię primingu, omawiając kolejne etapy percepcji bodźca primingu, fazę mobilizacji o podłożu fizjologiczno-biochemicznym i epigenetycznym oraz zdarzenia po silnym stresie właściwym, w postaci generowania skutecznej strategii obronnej minimalizującej ujemne skutki stresu. Wskazuje również na duże prawdopodobieństwo występowania zjawiska primingu w środowisku naturalnym, dzięki czemu rośliny po przetrwaniu niekorzystnych warunków bytowania, mogą nabyć i utrzymać korzystne zmiany przystosowawcze, które mogą być przekazane kolejnym pokoleniom roślin. W podrozdziale „Procesy epigenetyczne a priming”, Doktorantka, w oparciu o szereg przykładów doświadczalnych zaczerpniętych z literatury, wykazuje podłoże epigenetyczne zjawiska primingu, w kontekście precyzyjnej kontroli

ekspresji genów zaangażowanych w utrzymanie tzw. „pamięci postresowej”. Stanowi to jednocześnie dobry punkt wyjścia dla postawionego przez Doktorantkę celu pracy.

W rozdziale **Materiały i metody** scharakteryzowano materiał badawczy, opisano traktowanie ziemniaka odmiany Sarpo Mira kwasem β -aminomasłowym (BABA) oraz podano sposób, w jaki pozyskano rośliny z pokolenia osobników uprzednio indukowanych BABA. Niezależnie opisano inokulację wirulentnym izolatem *P.infestans* i ocenę stopnia rozwoju zarazy ziemniaka. Przedstawiony w tym rozdziale schemat układu badawczego (Ryc.7), ułatwia czytelnikowi zrozumienie i pozwala na prześledzenie kolejno podejmowanych etapów badań.

Wyraźny niedosyt informacji niesie ze sobą lakoniczny opis przeprowadzonych analiz ekspresji genów oraz immunoprecypitacji chromatyny. W tym względzie oceniająca pragnie uzyskać odpowiedzi na następujące pytania:

- Czy/w jakim stopniu zmienność wewnątrzgatunkowa może wpływać na sekwencje, na których opracowane były startery?
- Co należy rozumieć przez "50 cykli denaturacji"? Czy jest tu mowa o cyklach, po których pojawił się produkt? Poprawniej byłoby napisać: 50 cykli obejmujących denaturację..., hybrydyzację... oraz wydłużanie.
- Dlaczego Doktorantka pisząc o potwierdzeniu specyficzności reakcji (np. strona 41.) nie prezentuje uzyskanych wyników. Czy produkty PCR były rozdzielane na żelu?
- Czy i na jakiej podstawie dokonano oceny jakości chromatyny po sonikacji?
- Na jakiej podstawie wnioskowano o specyficie przeciwciał wykorzystanych do immunoprecypitacji chromatyny w prezentowanym układzie eksperymentalnym?
- Dlaczego analizie poddano ciało genu, a nie przeanalizowano jego region promotorowy i/lub region okalający TSS (miejsce startu transkrypcji)?

Rozdział **Wyniki** obejmuje kilka podrozdziałów, w których opisano prowadzone kolejno eksperymenty i uzyskane w ich efekcie wyniki, zamieszczone na 18 rycinach złożonych, niezależnie zilustrowanych dla pokolenia P_0 roślin indukowanych BABA, jak i dla roślin pokolenia P_1 namnażanych z bulw i nasion. W opisie wyników i dyskusji można wyróżnić dwie części. W pierwszej części analizowano skuteczność 5mM induktora BABA w ograniczaniu rozwoju zarazy oraz możliwość nabycia korzystnych przystosowań obronnych rośliny względem wirulentnego patogenu, w kolejnym pokoleniu wegetatywnym i generatywnym ziemniaka. Miernikiem efektywności primingu była analiza poziomu

transkryptów genów kodujących kluczowe białka strategii obronnej, tj. PR1 i PR2, czynnika transkrypcji WRKY1 oraz regulatorów SAR, tj. NPR1 i SN1, po indukcji BABA i infekcji vr *P. infestans*. W tych eksperymentach Doktorantka sprawdziła ekspresję genów w różnych godzinach po indukcji i inokulacji, w co najmniej trzech powtórzeniach biologicznych oraz w niezbędnej liczbie powtórzeń technicznych. W odniesieniu do tej kwestii nasuwa się pytanie - co stanowiło kontrolę dla różnych kombinacji doświadczalnych? Czy wszystkie wyniki dla danego genu były normalizowane względem genów referencyjnych?

Z kolei w drugiej części zaplanowanych eksperymentów Doktorantka badała ekspresję genów kodujących białka zaliczane do rodziny metylotransferaz (ATX2 oraz SUVH4) oraz demetylaz (JMJ706), a także acetylaz (HAT) i deacetylaz (HDAC) histonowych. W tym miejscu proszę Autorkę o ustosunkowanie się do obecnego w pracy stwierdzenia, że wymienione geny kodują białka odpowiedzialne za remodelowanie chromatyny? Proszę również o komentarz do ryciny 22., przedstawiającej względną ekspresję genu CAF1 w roślinach ziemniaka w pokoleniu P₀ oraz P₁ pozyskanego z bulw i nasion: jak wytłumaczyć wzmożoną ekspresję CAF1 po podaniu BABA oraz po infekcji roślin traktowanych BABA, podczas gdy w roślinach kontrolnych poddanych inokulacji nie obserwujemy żadnych zmian?

Na zakończenie tego rozdziału Doktorantka zamieściła wyniki eksperymentów, celem wskazania efektywnych znaczników epigenetycznych primingu. W tym miejscu prosiłabym Autorkę o szczegółową prezentację układu doświadczalnego obejmującego ryciny 27 i 28.

Na uznanie zasługuje fakt, że każdy podrozdział kończy myśl podsumowująca uzyskane wyniki, co podnosi czytelność i porządkuje uzyskane rezultaty badań.

W rozdziale **Dyskusja** Autorka w sposób kompleksowy i wnikliwy analizuje otrzymane wyniki, konfrontując je z najnowszymi danymi literaturowymi dotyczącymi poruszanych zagadnień nabywania odporności względem stresów biotycznych. Gruntowna analiza wyników dała podstawy do sformułowania 9 wniosków końcowych. Moim zdaniem wnioski dotyczące metylacji Doktorantka mogła z powodzeniem rozbudować.

W odniesieniu do całej pracy należy stwierdzić, że Autorka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości czy błędów edytorskich, które nie pomniejszają wartości merytorycznej pracy. Z powinności recenzenta uwagi te przekazałam Autorce pracy.

Na podsumowanie stwierdzam, że treść i forma przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej odpowiada w pełni wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. Praca stanowi element nowości naukowej w dociekaniach badawczych nad poznaniem mechanizmu nabytej odporności ziemniaka na *Phytophthora infestans*.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam przede wszystkim udokumentowanie, że ziemniak 'Sarpo Mira' pod wpływem indukcji 5mM kwasem β -aminomasłowym nabył odporność względem wirulentnego izolatu *P. infestans*, a cecha zwiększonej odporności została przekazana kolejnemu pokoleniu mnożonemu z bulw i nasion. Uzyskanie potwierdzenia, że hamowanie rozwoju zarazy ziemniaka ma związek ze zmianą profilu ekspresji genów kodujących białka PR1 i PR2, zarówno w pokoleniu P₀, jak i P₁. Wskazanie znacznika metylacji H3K4me₂, jako markera epigenetycznego, mającego związek z nabywaniem przez ziemniak odporności systemicznej.

Wniosek końcowy

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny pracy doktorskiej Pani mgr inż. Barbary Meller wnoszę do Rady Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

S. Polowinski Wawle