



# INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: centr. 61 6550200, sekret. 61 6550255 Fax: 61 6550301 E-mail: office@igr.poznan.pl  
www.igr.poznan.pl NIP: 781-16-21-455 REGON: 000326204

prof. dr hab. Łukasz Stępień  
Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin  
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 Poznań

## Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Barbary Meller

zatytułowanej: „Wpływ kwasu  $\beta$ -aminomasłowego na zmiany epigenetyczne w nabytej odporności systemicznej ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) względem *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary”,

wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem promotora, pani prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek.

Uprawa ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) stanowi ważną część rolnictwa i przemysłu, dostarczając surowca do przetwórstwa żywności, pasz oraz do bezpośredniej konsumpcji. Duże znaczenie gospodarcze wiąże się z zainteresowaniem hodowców i naukowców czynnikami wpływającymi na zdrowotność roślin. Zaraza ziemniaka powodowana jest przez łęgniowca *Phytophthora infestans*, nad którym od lat prowadzono prace badawcze, zarówno w kontekście wirulencji izolatów, jak i genów odporności obecnych w różnych liniach roślin. W świetle globalnych trendów zmierzających do ograniczania stosowania chemicznych środków ochrony roślin poszukiwanie alternatywnych rozwiązań służących polepszeniu zdrowotności upraw jest aktualnym i potrzebnym kierunkiem prowadzonych prac badawczych. Zagadnienie indukowanej odporności systemicznej (SAR) za pomocą efektywnych w działaniu związków chemicznych o stosunkowo prostej budowie wydaje się szczególnie interesujące, zwłaszcza w kontekście poznania potencjalnych czynników

epigenetycznych, zaangażowanych w mechanizmy powiązane z SAR. Przedłożona do recenzji rozprawa porusza aktualny i istotny wątek dziedziczenia nabytej odporności roślin ziemniaka względem *P. infestans*, indukowanej poprzez wcześniejsze ich traktowanie kwasem  $\beta$ -aminomasłowym. Z tego względu realizacja celów postawionych w pracy przez Doktorantkę wydaje się jak najbardziej uzasadniona i potrzebna, jednocześnie będąc z naukowego punktu widzenia niewątpliwie wartościową i kuszącą, dlatego zasadność podjętej w rozprawie problematyki badawczej nie budzi wątpliwości.

### **Ocena formalna rozprawy**

Recenzowana dysertacja została przygotowana na 117 stronach maszynopisu w układzie typowym dla biologicznych prac eksperymentalnych. Po krótkim wstępie następuje wężły opis literatury (21 stron) ściśle powiązanej z tematyką badań, który wprowadza w zagadnienia odporności nabytej i indukowanej, czynników biorących udział w odpowiedzi rośliny na atak patogenów, a także modelu wyjaśniającego ewolucję interakcji roślina-patogen w kontekście zmian ogólnej odporności roślin i agresywności patogenów. Omówione zostały również najczęściej wykorzystywane związki indukujące SAR. Mimo, że kwestie poruszane w rozdziale są skomplikowane, czyta się go stosunkowo łatwo.

W mojej opinii rozdział „Cel i założenia pracy” mógłby być sformułowany w sposób bardziej zwięzły, szczególnie, że zawiera on sporo informacji już wcześniej podanych, formuła zaś przypomina bardziej wniosek projektowy, niż rozprawę naukową. Proszę traktować to jednak wyłącznie jako luźną uwagę, a nie zarzut. Sam cel realizowanej dysertacji jest klarowny i logiczny.

Rozdział „Materiały i metody” liczy 16 stron maszynopisu i szczegółowo opisuje zastosowane, często bardzo skomplikowane metody i procedury. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie rycin, często pomocnych w zrozumieniu idei doświadczeń.

Wyniki rozprawy zostały przedstawione na 26 stronach, po czym Autorka przechodzi do dość obszernej Dyskusji (13 stron) uzyskanych wyników w świetle dostępnej literatury światowej.

Podsumowanie pracy stanowi dziewięć wniosków wyciągniętych na podstawie przeprowadzonych eksperymentów. Po nich następuje aneks, zawierający ryciny przedstawiające zmiany ekspresji dwóch genów odpowiedzialnych za modyfikacje histonów,

streszczenie dysertacji w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, bogaty spis wykorzystanej literatury, oraz lista rycin i tabel.

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

Prace nad mechanizmem nabywania odporności systemicznej przez rośliny ziemniaka, również dzięki indukcji za pomocą specyficznych związków chemicznych, są prowadzone w zespole pani prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek od wielu lat, o czym świadczy szereg znakomitych publikacji. Niniejsza rozprawa stanowi logiczną kontynuację tego nurtu badawczego, przy czym Autorka podjęła się ambitnego zadania stwierdzenia, czy indukowana odporność może być dziedziczona dzięki epigenetycznym modyfikacjom chromatyny i histonów. Podjęta w rozprawie problematyka badawcza wpisuje się w najnowsze i aktualne trendy światowe i zasługuje na najwyższe uznanie.

Rozdział omawiający dostępną literaturę jest obszerny i dotyka wszystkich aspektów związanych z odpowiedzią roślin na stres. Ze zrozumiałych względów momentami może się wydawać chaotyczny, gdyż mnogość czynników biorących udział w tych mechanizmach praktycznie uniemożliwia ich szczegółowe omówienie w jednej rozprawie. Jednocześnie należy zauważyć, że Doktorantka porusza się w tym temacie swobodnie, prezentując rozległą wiedzę w temacie prowadzonych przez siebie badań. Z przyjemnością studiuje się wysokiej jakości ryciny, choć przyznać muszę, że ich opis mógłby być czasem nieco bardziej wyczerpujący. Epigenetyczne modyfikacje, jak również mechanizmy odpowiedzialne za dziedziczenie tych zmian, zostały opisane w sposób klarowny i przystępny, podobnie jak podrozdział traktujący szczegółowo o modyfikacjach histonów, wpływających na zmiany w ekspresji konkretnych genów. Wydaje się, że korzystnym byłoby przeniesienie ryciny 5 o kilka stron wcześniej, gdyż podsumowuje ona treść rozdziału, który czytelnik właśnie przeczytał. Osobiście preferuję odwrotną kolejność, ale proszę to potraktować jedynie jako luźną uwagę. Bardzo ostrożnie i dojrzałe przygotowany został rozdział dotyczący dziedziczenia modyfikacji epigenetycznych. Przytoczone argumenty, oparte na wcześniejszych pracach badawczych, są trafne i przekonujące, jednocześnie pozostawiając pole do dyskusji. Nie bardzo rozumiem zabieg włączenia podrozdziału opisującego materiał badawczy do sekcji dotyczącej przeglądu literatury. Być może logiczniej byłoby przenieść ten podrozdział na sam początek „Przeglądu literatury”. Prosiłbym tutaj o krótkie uzasadnienie podczas obrony rozprawy.

Rozdział przedstawiający cele rozprawy, jak wcześniej wspomniałem, mógłby być nieco bardziej syntetyczny, ale założenia i hipotezy w nim przedstawione są logiczne i przekonujące. Zaplanowane do realizacji zadania badawcze zaprojektowano ściśle dla realizacji postawionych celów.

Materiały i Metody zostały opisane w sposób bardzo szczegółowy i wyczerpujący. Rozdział ten został przygotowany znakomicie, z wykorzystaniem czytelnych i pomocnych rycin. Na stronie 36 Autorka pisze, że grzybnicę *P. infestans* pasażowano w celu pozyskania właściwej wirulencji patogenu. Prosiłbym o wyjaśnienie, co konkretnie miało to oznaczać, zakładam bowiem, że wirulencja nie jest cechą nabywaną, a dziedziczną. Mam również pytanie odnośnie informacji podanej na stronie 39, dotyczącej temperatury przechowywania ekstraktów RNA. Czy w  $-20^{\circ}\text{C}$  nie ulega ono degradacji? Dla porównania cDNA, które jest znacznie stabilniejszym materiałem, przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  (strona 40). Proszę o komentarz w tej kwestii.

Rozdział „Wyniki” został przygotowany przejrzyście i konsekwentnie. Mam kilka pytań dotyczących wyników przedstawionych na rycinie 11. W treści można przeczytać, że pokolenie  $P_1$  otrzymano z bulw oraz nasion. Rozdział „Materiały i metody” (strona 34) sugeruje, że rośliny nie poddawane indukcji BABA (próby oznaczone K i P na rycinie 11B i 11C) pochodziły z pokolenia  $P_1$  uzyskanego z roślin nie poddanych indukcji. Czy były to odrębne grupy? A konkretniej: czy rośliny pokolenia  $P_1$  oznaczone na rycinach 11B i 11C jako K zostały zebrane z roślin oznaczonych jako K w pokoleniu  $P_0$ ? Drugie moje pytanie dotyczy różnic w intensywności objawów chorobowych pomiędzy roślinami infekowanymi pochodzącymi z pokoleń  $P_0$  i  $P_1$  (próby P z rycin 11B i 11C). Czy Autorka mogłaby zasugerować jakieś wytłumaczenie obserwowanej zmienności?

Mam również pytanie dotyczące sposobu odnoszenia wyników ekspresji badanych genów do wariantów kontrolnych opisanych na stronie 52. Z przedstawionych rycin wynika, że próby kontrolne (czyli warianty nietraktowane BABA/nieinokulowane) zbierano w tych samych punktach czasowych. Czy pochodziły one za każdym razem z tych samych roślin? To samo pytanie dotyczy również roślin indukowanych/inokulowanych. Czy prezentowane na rycinach odchylenia standardowe dotyczą powtórzeń biologicznych, czy technicznych?

Wydaje mi się, że sposób zaprezentowania wyników począwszy od ryciny 13A jest dość niefortunny. Sugeruje on mianowicie ciągłość eksperymentu (czas po indukcji, a następnie po inokulacji), podczas gdy, o ile dobrze zrozumiałem opis zamieszczony na początku rozdziału, prezentowane wyniki są odnoszone do innych prób kontrolnych. Jeśli tak

faktycznie było, proszę Doktorantkę o komentarz podczas obrony rozprawy. Poza tym wyniki (oraz jak mi się wydaje również odchylenia standardowe) zaprezentowane dla prób kontrolnych na kilku rycinach (począwszy od trzynastej) się praktycznie nie zmieniają. Czy to oznacza, że próbę kontrolną pobierano tylko raz? A jeśli tak, czy to mogło mieć wpływ na interpretację wyników? Wyniki ukazujące przeciwstawne działanie regulatorów aktywności transkrypcyjnej chromatyny zrobiły na mnie bardzo dobre wrażenie. Zostały one opisane i zilustrowane w sposób czytelny i przekonujący.

Rozdział „Dyskusja” jest rozbudowany, ale czyta się go dobrze. Autorka zwięźle zarysowała uzasadnienie dla podjętych badań, celnie argumentując przytaczanymi przykładami z opublikowanych dotychczas prac naukowych. Uzyskane wyniki zostały krytycznie porównane z dostępnymi źródłami literaturowymi. Zdarzają się jednak drobne potknięcia. Na stronie 77 Doktorantka odnosi się do dziedziczenia SAR indukowanej pod wpływem indukcji BABA na podstawie trzech prac opublikowanych w roku 2012, podczas gdy, jeśli dobrze zrozumiałem, jedna z tych prac dotyczy bardziej interakcji z owadami niż indukcji chemicznej.

Fragment dyskusji dotyczący antagonistycznych regulatorów SAR został napisany z dużym wyczuciem, był zresztą podparty solidnymi i przekonującymi wynikami badań własnych, przedstawionymi w poprzednim rozdziale. Do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczyłbym stwierdzenie, że podwyższony i dziedziczony poziom znacznika H3K4me2 w pokoleniu P<sub>0</sub> poddanym indukcji BABA oraz pokoleniu P<sub>1</sub> przed infekcją *P. infestans* można uważać za dowód na postresowy zapis „pamięci”, przydatny w szybkim uruchomieniu odpowiedzi rośliny podczas infekcji patogenem.

Dysertację podsumowuje rozdział „Wnioski”, których sformułowano aż dziewięć. W moim odczuciu niektóre z nich (konkretnie pierwszy i szósty) są bardziej podsumowaniem uzyskanych wyników i mogły zostać wplecione w pozostałe punkty tego rozdziału.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Rozprawa jest napisana ładnym, zrozumiałym językiem, choć Autorka podczas redakcji pracy nie ustrzegła się błędów gramatycznych (prawdopodobnie wynikających z zastosowania opcji autokorekty). Sporo jest też błędów interpunkcyjnych (głównie są to przecinki w niewłaściwych miejscach), zdarza się Doktorantce stosowanie skrótów myślowych i kolokwializmów laboratoryjnych typu „akumulacja genów”, niekonsekwencji

w nazewnictwie (przedrostek hipo- vs. hypo-, recesywny vs. represywny stan chromatyny) i oznaczeniach genów, transkryptów i białek, czy błędnie oznaczony gen *JMJ706* (strona 66). Można też mieć zastrzeżenia do formy przygotowania spisu literatury (brak konsekwencji w formatowaniu i stosowaniu pełnych tytułów/skrótów nazw czasopism), ale nie jest to oczywiście zarzut, a jedynie drobna uwaga.

### **Podsumowanie**

W toku realizacji dysertacji pani mgr inż. Barbara Meller dowiodła sprawnego posługiwania się szerokim wachlarzem technik laboratoryjnych. Z całą pewnością potrafi także właściwie planować i wykonywać eksperymenty służące realizacji założonych zadań. W trakcie prac zręcznie wykorzystywała posiadaną wiedzę, zarówno praktyczną, jak i teoretyczną, przekonująco dyskutując uzyskiwane wyniki.

Konkludując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr inż. Barbary Meller do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie stawiam formalny wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

*Arkadiusz Stepień*