



INSTYTUT DENDROLOGII

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

62-035 KÓRNIK, ul. Parkowa 5
e-mail: idkornik@man.poznan.pl

tel. 61 817 00 33, fax 61 817 01 66
www.idpan.poznan.pl

dr hab. Tomasz Pawłowski, prof. ID PAN

Kórnik, 06.05.2024

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Andżeliki Drozdy pt. „Udział tlenu azotu w epigenetycznej regulacji odporności ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary” (*Participation of nitric oxide in epigenetic regulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) D+e Bary*) wykonanej na Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek

Dane o kandydacie

Tytuł magistra biologii, uzyskany 06.07.2018, Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.

Kandydat nie ubiegał się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

Studia doktoranckie z zakresu epigenetyki roślin, od 10.2024, Katedra Fizjologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.

Ocena formalna

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Andżeliki Drozdy było poznanie roli tlenu azotu w regulacji epigenetycznej ekspresji genów zaangażowanych w odpowiedź na stres biotyczny. Podjęte badania wyjaśniają funkcje sygnałową tlenu azotu jako bezpośredniego regulatora metylacji histonów i DNA zależnego od aktywności reduktazy GSNOR odpowiedzialnej za regulację poziomu NO i w konsekwencji ekspresję genów obronnych przeciwko patogenowi. Doktorantka prześledziła cały szlak sygnałowy od infekcji patogenem, poprzez wybuch NO, zmiany w metylacji DNA i histonów oraz ekspresji miRNA, do wzrostu ekspresji genów zapewniających odporność ziemniaka na *Phytophthora infestans*. Wybór tematyki pracy z powodu całościowego ujęcia badań na różnych poziomach regulacji

epigenetycznych uważam za bardzo interesujący i zasadny. Badania przeprowadzone w trakcie wykonywania recenzowanej pracy doktorskiej w znaczącym stopniu wpływają na poszerzenie wiedzy o zjawiskach związanych z obroną roślin przeciwko zarażeniom patogenem. Wyniki pracy pokazały nieznaną rolę NO jako epigenetycznego regulatora odporności ziemniaka na zarazę. Z tych względów tematykę rozprawy mgr inż. Andżeliki Drozdy uważam za bardzo aktualną i ważną naukowo.

Strona formalna układu rozprawy doktorskiej nie budzi większych zastrzeżeń. Rozprawa została przygotowana na podstawie dwóch artykułów naukowych opublikowanych w International Journal of Molecular Sciences i Frontiers in Plant Science. Są to czasopisma o ustalonej renomie, publikujące recenzowane prace opisujące wartościowe wyniki naukowe. Mgr inż. Andżelika Drozda jest pierwszym autorem wszystkich artykułów wchodzących w skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Z dołączonych do pracy oświadczeń współautorów wynika, że miała znaczący udział nie tylko w wykonaniu opisanych w obu artykułach doświadczeń, ale również w interpretacji uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów do druku. Opublikowane prace stanowiące najważniejszą część rozprawy są spójne tematycznie i w pełni odpowiadają jej tytułowi. Badania wymagały zastosowania szerokiej gamy metod fizjologii roślin, biochemii i biologii molekularnej.

Do artykułów naukowych wchodzących w skład ocenianej rozprawy mgr inż. Andżelika Drozda dołączyła rozdziały napisane po polsku opisujące cały zakres wykonanych badań: Streszczenie rozprawy doktorskiej, Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora, Wprowadzenie, Hipotezy badawcze, Cel pracy, Materiały i Metody, Zadania Badawcze, Wyniki i ich omówienie, Dyskusja, Wnioski, Podsumowanie, Spis literatury. Aneks, Wykaz dorobku naukowego, Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i Oświadczenia współautorów stanowią załączniki pracy.

W rozdziale Wprowadzenie, Doktorantka omówiła aktualny stan wiedzy na temat produkcji ziemniaka, zagrożeń związanych z zarazą oraz metodami jej zwalczania. Podkreśliła rolę badań podstawowych w zrozumieniu procesów epigenetycznych w kształtowaniu odporności roślin w interakcji z mikroorganizmami i w dalszej kolejności wykorzystania ich praktycznego w poprawie plenności ziemniaka w ramach strategii epi-hodowli, czyli

wytworzenia roślin o zwiększonej odporności poprzez manipulację procesami epigenetycznymi. Mgr inż. Andżelika Drozda następnie omówiła mechanizmy obronne roślin przeciwko atakowi patogenu, w tym rolę szlaku sygnałowego NO, regulacji epigenetycznych i kontroli ekspresji genów, wprowadzając do tematu pracy doktorskiej. Na końcu Wprowadzenia Doktorantka omówiła cele szczegółowe pracy. Doktorantka w sposób zwięzły i logiczny przedstawiła ogólny zarys i tło badanego zagadnienia wyjaśniając podstawę podjętych badań.

Po tym interesującym wprowadzeniu w tematykę rozprawy mgr inż. Andżelika Drozda przedstawiła hipotezę badawczą oraz cel nadrzędny swojej pracy. Doktorantka postawiła hipotezę badawczą zakładającą, że tlenek azotu pośredniczy w epigenetycznej kontroli odporności liści ziemniaka względem *avr Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Myślę, że słowo liści jest tutaj zbędne, jako że odporność dotyczy całej rośliny. Celem podjętych badań była identyfikacja, wraz z analizą funkcjonalną, biomolekuł modyfikowanych przez NO, o istotnym wpływie na rearanżację chromatyny i ekspresję genów związanych z odpornością. Rozprawa doktorska wpisuje się zatem w szeroki zakres badań fizjologiczno-molekularnych nad odpornością roślin na stres biotyczny.

W kolejnym rozdziale pracy Doktorantka opisała materiał i metody. Wydaje się, że zaplanowano bardzo dobrze etapy przeprowadzania badań, korzystając z różnorodnych i nowoczesnych technik analitycznych. W podrozdziale Stosowane metody analityczne i statystyczne zabrakło opisu zastosowanych testów statystycznych do oceny istotności wyników ilościowych. Bardzo pozytywnym aspektem pracy jest dołączenie Tabeli 2, która zestawia szczegółowy opis etapów realizacji zadań badawczych z uwzględnieniem metod analitycznych, co ułatwia poruszanie się po kolejnych etapach dysertacji.

W kolejnym rozdziale Zadania badawcze Doktorantka szczegółowo omówiła poszczególne etapy wykonywania prac badawczych. Poszczególne zadania badawcze zostały opisane jasno i zwięźle, w sposób czytelny i logiczny wprowadzając do przeprowadzonych eksperymentów obejmujących temat pracy.

W pracy zaprezentowano także szczegółowe opisanie i omówienie wyników badań zamieszczonych w dwóch artykułach wchodzących w skład rozprawy. W Dyskusji wyniki badań zostały uzupełnione o ich interpretację w świetle danych uzyskanych i opublikowanych

przez innych autorów. Omówienie artykułów kończy rozdział Wnioski, w którym mgr inż. Andżelika Drozda przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej. Mówiąc bardzo ogólnie, najważniejszymi osiągnięciami Doktorantki jest wykazanie epigenetycznej roli NO w odporności ziemniaka na zarazę. Wykazała wpływ zakażenia patogenem na zmianę statusu *redox* komórki, związek funkcjonalny pomiędzy metylotransferazami lizyny i argininy histonu H3 i H4, metylacji DNA i miRNA w przeprogramowaniu aktywności genów obronnych i ograniczeniu rozwoju zarazy ziemniaka. Podkreśliła też rolę reduktazy GSNOR w regulacji poziomu NO i wynikającej stąd epigenetycznej kontroli ekspresji genów. Chciałbym zwrócić uwagę, że przedstawione w pracy wyniki zostały w zwięzły i czytelny sposób omówione i podsumowane, również w postaci graficznej. Szczególnym osiągnięciem pracy jest wykazanie nowej funkcji sygnałowej tlenu azotu jako pośredniego regulatora epigenetycznego ekspresji genów odporności roślin na stres biotyczny. Po zapoznaniu się z wynikami mogę stwierdzić, że Doktorantka bardzo sprawnie poradziła sobie z realizacją wyznaczonego wcześniej celu pracy oraz zweryfikowała pozytywnie postawioną hipotezę.

Do części poprzedzającej artykuły naukowe dodano także najnowszą dobrze dobraną literaturę naukową, na podstawie której Doktorantka przygotowała omówienie wyników zawartych w opublikowanych pracach stanowiących podstawę pracy doktorskiej.

Stwierdzam, że rozprawa przygotowana przez mgr inż. Andżelikę Drozdę spełnia formalnie wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim. Do rozprawy dołączono oświadczenia, w których Doktorantka i współautorzy artykułów naukowych dokładnie opisują swój udział w przygotowaniu manuskryptów. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że wkład Doktorantki w przygotowaniu prac do druku był znaczący (wynoszący odpowiednio 54 i 56%) i w pełni uzasadnione jest, aby mgr inż. Andżelika Drozda doktoryzowała się na podstawie tych artykułów. Wszystkie opublikowane prace ukazały się w znanych czasopismach, których redakcje akceptują prace na podstawie recenzji przygotowanych przez pracujących w podobnym temacie naukowców. Zarówno temat rozprawy, jak i jej cele mają charakter nowatorski, co również jest ważnym wymogiem stawianym przed rozprawami doktorskimi.

W pracy znalazłem stosunkowo niewiele niedociągnięć. Np. zabrakło rozwinięcia skrótu *R* w genach odporności. Posługuje się też Doktorantka czasami żargonem np. falkony. Na Rycinie 16 brak jest litery C opisującej ekspresję genów *R3a* i *HSR203J*.

Recenzja pracy nasunęła mi też parę pytań. Czy wykonywanie części badań na materiale świeżym, a części na mrożonym nie miało może wpływu na wyniki badań? Czym mogą być spowodowane różnice w ekspresji i aktywności PRMT5? Jaki inhibitor PRMT5 został użyty do represji *R3a* (Abstract 1 publikacji)? W badaniach skupiono się na epigenetycznej kontroli ekspresji genów na poziomie metylacji DNA, histonów i miRNA. Czy rola kompleksów modyfikujących chromatynę nie byłaby też warta przebadania aby uzyskać bardziej kompletny obraz działania NO?

Ocena merytoryczna

1. Drozda A., Kurpisz B., Arasimowicz-Jelonek M., Kuźnicki D., Jagodzick P., Guan Y., Floryszak-Wieczorek J. 2022. Nitric oxide implication in potato immunity to *Phytophthora infestans* via modifications of histone H3/H4 methylation patterns on defense genes. *Int. J. Mol. Sci.* 23:4051.

Pierwsza praca, która wchodzi w skład ocenianej rozprawy doktorskiej opisuje wyniki badań nad zaangażowaniem NO w odporność roślin poprzez wpływ na ekspresję genów obronnych, w tym modyfikacje histonów. Doktorantka zbadała efekt dwufazowego wytwarzania NO regulowanego przez aktywność reduktazy S-nitrozoglutationu (GNSOR) po inokulacji avr *Phytophthora infestans*. Wykazała, że faza spadku NO w 6 h po inokulacji była skorelowana ze wzrostem ekspresji genów obronnych wzbogaconych w aktywny znak H3K4me3 za pośrednictwem TrxG w ich regionach promotorowych. Stwierdziła, że metylotransferaza argininy PRMT5, katalizująca dimetylację histonu H4R3 (H4R3sme2), jest niezbędna do zapewnienia odporności ziemniaka na patogen. Zarówno patogen, jak i S-nitrozoglutation (GSNO) zmieniły status metylacji H4R3sme2 poprzez przejściową redukcję znaku represyjnego w promotorze genów obronnych, *R3a* i *HSR203*, podnosząc w ten sposób ich transkrypcję. Ważnym podkreślenia jest stwierdzenie, że obniżenie poziomu NO może być decydujące dla ułatwienia indukowanej patogenem regulacji ekspresji genów poprzez metylację lizyny histonowej i PRMT5 kontrolujących odporność ziemniaka na zarazę.

2. Drozda A., Kurpisz B., Guan Y., Arasimowicz-Jelonek M., Plich J., Jagodzick P., Kuźnicki D. and Floryszak-Wieczorek J. 2022. Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Front. Plant Sci.* 13:1033699.

Druga praca, która weszła w skład rozprawy opisuje wpływ NO na geny regulujące (de)metylację DNA, w interakcji z metylacją histonów. Doktorantka stwierdziła wybuch NO po traktowaniu patogenem lub GSNO co wymusiło przejściową regulację metylacji histonu SUVH4 i hipermetylację DNA. Zmniejszona biodostępność NO zmniejszyła supresyjny znak H3K9me2 na promotorze genu *R3a* za pośrednictwem SUVH4 i zwiększyła jego transkrypcję. Stwierdziła, że gen *R3a* jest prawdopodobnie kontrolowany przez szlak metylacji RdDM. Dane ujawniły zależną od czasu regulację w dół genów *DCL3*, *AGO4* i *miR482e*, wywierając wpływ na regulację w górę docelowego genu *R3a* skorelowanego z nadekspresją *ROS1*. Interesujące jest wykazanie w pracy, że dwufazowe fale wybuchu NO w odpowiedzi na patogen wydają się kluczowe w ustanowieniu odporności ziemniaka na zarazę poprzez szlak RdDM kontrolujący ekspresję genu *R*.

Wartym podkreślenia w tych pracach jest zastosowanie szeregu analiz biochemicznych i molekularnych z wykorzystaniem nowoczesnych metod RT-qPCR, ChIP-qPCR, ELISA, Western blot i immunoprecypitacji. Artykuły są dobrze napisane, wiele aspektów gruntownie zostało przedyskutowanych, w końcowym momencie postawione zostały właściwe wnioski oraz perspektywy dalszych badań.

Wnioski końcowe

Podsumowując, wymienione wyżej uchybienia nie wpływają w istotny sposób na ocenę pracy. Stanowi ona ważny wkład w poznanie mechanizmów obronnych roślin. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że mgr inż. Andżelika Drozda jest sprawnym badaczem posiadającym szeroką wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i zawiera oczywisty element nowości naukowej. Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Naukowej

Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Andżeliki Drozdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Andżeliki Drozdy, w związku ze szczególnymi walorami poznawczymi i nowatorskimi pracy. Wyniki pracy doktorskiej prezentują nowe światło na fizjologiczny i epigenetyczny mechanizm obrony roślin przed patogenem, wzbogacając wiedzę na temat udziału tlenu azotu w odporności na czynniki stresowe.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a horizontal line followed by a stylized, cursive 'P' and 'W'.

Tomasz Pawłowski