



# INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

**Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań**

Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255 E-mail: office@igr.poznan.pl www.igr.poznan.pl  
NIP: 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

Poznań, 20.08.2021

Prof. dr hab. Małgorzata Jędrzycka  
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 Poznań

## **Recenzja pracy doktorskiej mgr. inż. Daniela Kuźnickiego**

**pt.: „Dziedziczenie nabytej odporności systemicznej ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.)  
na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary”**

Pracę doktorską wykonano w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem pani promotor prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek

## **Uzasadnienie wykonania recenzji**

W dniu 24 czerwca 2021 r. Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo – prof. dr hab. Andrzej Bleharczyk poinformował mnie pisemnie, że w wyniku głosowania Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo zostałam powołana na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej i przekazał mi niniejszą rozprawę.

## **Struktura pracy – ocena formalna**

Pod względem edytorskim pracę wykonano bardzo starannie. Recenzowana praca doktorska obejmuje 162 strony, w tym spis literatury obejmujący 30 stron. Pracę napisano według struktury właściwej dla rozpraw doktorskich. Pracę rozpoczyna 4-stronicowy wstęp zawierający krótkie wprowadzenie do badań, po którym umieszczono przegląd literatury z podziałem na dwa główne podrozdziały zawierające aktualny stan wiedzy na temat odporności roślin oraz dziedziczenia epigenetycznego. W przypadku odporności roślin skupiono się na odporności typu PTI oraz ETI, nabytej odporności systemicznej SAR, a trzeci podrozdział poświęcono roli kwasu  $\beta$ -aminomasłowego (BABA) w indukowaniu reakcji SAR. W podrozdziale na temat dziedziczenia epigenetycznego Doktorant wyjaśnił czym jest epigenetyka, opisał rodzaje modyfikacji białek histonowych, mechanizm i rolę metylacji DNA oraz jej regulację przez RNA (szlak RdDM), a także zmiany zachodzące na poziomie metylacji DNA roślin w odpowiedzi na stresy środowiskowe. Wstęp napisany jest poprawną polszczyzną, bez błędów i żargonu naukowego, terminy stosowane są właściwie.

Wstęp zawiera liczne skróty, z tego względu zdecydowanie lepiej, gdyby wykaz ten poprzedzono spisem skrótów, zamiast umieszczać go w końcowej części pracy. Wstęp zawiera tabele i ryciny przygotowane na podstawie literatury, jednak zmienione przez Doktoranta by uwypuklić procesy, które są opisywane oraz zebrać wiedzę z kilku a nawet kilkunastu prac w jedną całość. Ten sposób przygotowania przeglądu literatury jest wyjątkowo cenny, bowiem nie kopiuje danych innych autorów, lecz przetwarza je by uzyskać nową jakość. Takie postępowanie charakteryzuje osoby o znacznej wiedzy w danym zakresie, potrafiącej w dojrzały sposób przedstawić przegląd literatury, jednak bez nadmiaru szczegółów i wątków pobocznych. Wstęp dobrze przygotowuje czytelnika do następującej po nim treści pracy, jednak zdecydowanie brakuje w nim zagadnień rolniczych związanych z uprawą ziemniaka a także fitopatologicznych, związanych z jego chorobami, zwłaszcza zarazą ziemniaka. Jest to główny przedmiot pracy i materiał badawczy, boleję więc, że nie został opisany.

Cel i założenia pracy przedstawiono w czytelny sposób. Celem badań było wyjaśnienie czy zastosowanie kwasu  $\beta$ -aminomasłowego spowoduje indukcję odporności ziemniaka na stres biotyczny oraz czy uzyskane przystosowania obronne zostaną odziedziczone w kolejnym pokoleniu wegetatywnym i generatywnym, a jeśli tak, to jakie mechanizmy będą zaangażowane w ten proces. Szkoda, że Autor nie przedstawił żadnej hipotezy badawczej, np. czy spodziewał się takiego dziedziczenia, w jakich warunkach, na podstawie jakiego szlaku czy mechanizmu i dlaczego? Ze sformułowań zawartych w tym rozdziale wynika, że Autor założył, iż indukowanie odporności SAR poprzez potraktowanie roślin różnymi stężeniami BABA jest możliwe lecz nie był pewny co do dziedziczenia tego stanu oraz mechanizmów kierujących tym procesem. Bardzo proszę Doktoranta o komentarz na temat przewidywań przed przystąpieniem do doświadczenia oraz informacje na ile uzyskane wyniki potwierdziły lub zaprzeczyły wstępnym przewidywaniom.

Część metodyczna obejmuje 24 strony i jest podzielona na 9 podrozdziałów, zawierających opis postępowania z materiałem badawczym, w tym materiał roślinny i warunki uprawy ziemniaka, materiał infekcyjny, metodę indukowania odporności roślin kwasem  $\beta$ -aminomasłowym (BABA), metodę inokulacji a także sposób śledzenia procesu infekcyjnego poprzez pomiary objawów. Doktorant oznaczał też transkrypcję genu obecnego w genomie *P. infestans* i ulegającego konstytutywnej ekspresji na wszystkich etapach cyklu życiowego tego patogenu. Autor zanalizował poziom ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Ponadto Doktorant zanalizował poziom metylacji DNA mierząc całkowitą metylację testem ELISA oraz stosując metodę immunochemiczną (ICC) a także sprawdził metylację DNA sekwencji wybranych genów. Ponadto Autor rozprawy oznaczył

ilość transkryptu dojrzałego miRNA. W podrozdziale analiza statystyczna opisano liczbę powtórzeń oraz zastosowany test statystyczny.

W kolejnym rozdziale Doktorat usystematyzował wyniki analiz i opisał kolejno:

- 1) wpływ induktora BABA na odporność roślin matecznych i potomnych;
- 2) poziom ekspresji genów biorących udział w strategii obronnej;
- 3) poziom ekspresji genów biorących udział w procesie metylacji i demetylacji po działaniu BABA i stresu biotycznego;
- 4) zmiany w całkowitej metylacji DNA genomu ziemniaka po działaniu BABA i stresu biotycznego;
- 5) modyfikacje stopnia metylacji DNA fragmentów sekwencji promotorowych i kodujących trzech wybranych genów ważnych w procesie indukcji odporności.

Rozdział Dyskusja zajmuje 15 stron; ułożony jest w interesujący sposób bowiem tytuły podrozdziałów to jednocześnie wnioski z wykonanych badań. Doktorant uniknął typowego błędu wielu młodych pracowników naukowych, polegającego na powtórzeniu wyników i skupił się na podsumowaniu wyników przez siebie uzyskanych oraz dyskusji tych wyników z danymi opisanymi w literaturze światowej. Każdy z podrozdziałów dyskusji bezpośrednio dotyczy omawianego tematu, a uzyskany wynik przedstawiony jest w czytelny i zrozumiały sposób. Rozdział Wnioski zawiera zarówno podsumowanie wyników jak też wnioski, opisy są tu bardzo szczegółowe lecz brak wniosku podsumowującego całą pracę. Proszę Doktoranta o sformułowanie takiego wniosku podczas obrony pracy doktorskiej. Zapewne będzie to stwierdzenie przedstawione na zakończenie streszczenia?

Streszczenie jest obszerne i zawiera wiele szczegółów ale napisane jest konkretnym językiem i skupia się na wynikach badań. Zawiera też odpowiedź na pytanie o hipotezę roboczą, której zabrakło w rozdziale cele badań. Anglojęzyczna wersja językowa odpowiada wersji polskiej. Dopiero po streszczeniach znajduje się wykaz stosowanych skrótów.

Rozdział Literatura zawiera 352 pozycje, ze tego przeważająca większość (98 %) to literatura w j. angielskim (345 publikacji). Publikacji datowanych do 1999 roku jest 31 (95), prac w lat 2000-2009 jest 110 i stanowią one 31% pozycji literaturowych, a prac z okresu 2020-2021 jest 211, co stanowi aż 60% publikacji. Doktorat zaznajomiony jest więc z współczesną literaturą światową związaną z tematyką realizowanych badań.

Poza drobnymi potknięciami językowymi praca jest bardzo czytelna, konkretna, opisy w stopniu niezbędnym dla zrozumienia tematu lecz bez zbędnych szczegółów. Pracę napisano ładną polszczyzną. W opisach ilustracji czasem brakuje szczegółów np. nazwy markera, ale są to bardzo drobne niedociągnięcia.

## Tematyka badawcza

Wobec braku akceptacji dla nadmiernego stosowania pestycydów, a także w obliczu braku akceptacji dla roślin modyfikowanych genetycznie, stymulacja endogennych mechanizmów obronnych roślin w ramach nabytej odporności systemicznej (SAR) jest jednym z najciekawszych i nowoczesnych podejść w ramach strategii ochrony roślin uprawnych. Dzięki jej stosowaniu wspólnie z użyciem odmian z genetyczną odpornością na patogeny występujące na określonym terenie oraz przy wsparciu metody agrotechnicznych oraz biologicznych, w tym nadpasożytów oraz organizmów pożytecznych i sprzyjających dobrostanowi roślin, jest przyzwolenie dla stosowania mechanizmu SAR w ramach integrowanej ochrony roślin i integrowanej produkcji upraw rolniczych. Z racji na wielkie znaczenie ziemniaka oraz zagrożenie jego plonowania przez zarazę ziemniaczaną (*P. infestans*) istnieje wielkie zapotrzebowanie dla włączenia mechanizmu SAR do integrowanej ochrony ziemniaka.

Ku mojemu zdziwieniu we Wstępie do pracy nie zawarto żadnych danych na temat ziemniaka, obszaru i znaczenia jego uprawy w Polsce i na świecie, wartości odżywczych i innych danych o charakterze rolniczym, których można by się spodziewać po Doktorancie Uniwersytetu Przyrodniczego (zwłaszcza z Poznania!). Krótka charakterystyka ziemniaka pojawia się jedynie w streszczeniu pracy i wskazuje iż ziemniak jest jedną z czterech najważniejszych roślin w rolnictwie i stanowi jedno z głównych źródeł pożywienia ludzi i wielu zwierząt. Doktorant zajął się zatem badaniami nad bardzo ważną rośliną uprawną, uprawianą w wielu strefach klimatycznych.

W rozprawie brak też rozdziału dotyczącego chorób tej ważnej rośliny rolniczej i przybliżenia czytelnikom znaczenia zagrożenia ze strony *Phytophthora infestans*. Tymczasem jest to groźny patogen wywołujący zarazę ziemniaka, pomidora a czasami także innych gatunków roślin z rodziny psiankowatych. Co ciekawe patogen należy lęgniowców z królestwa Chromista i jest organizmem grzybopodobnym, tworzy grzybnię w bulwach i obumarłych resztkach po zbiorach ziemniaka i w tej formie zimuje. Sporangiospory pojawiające się na wiosnę, są rozprzestrzeniane z wiatrem i w warunkach sprzyjających rozwojowi patogenu wywołują wyjątkowo silne infekcje. Znanym w historii ludzkości i historii fitopatologii przykładem epifitozy mającej ogromne znaczenie społeczne i gospodarcze jest klęska głodu, która nastąpiła w Irlandii w latach 1845–1849 (Wielki Głód). Masowe porażenie roślin ziemniaka przez *P. infestans* spowodowało wyludnienie kraju w następstwie śmierci półtora miliona osób i wielkiej fali emigracji; populacja Irlandii w ciągu około pół wieku zmniejszyła się prawie o połowę.

Jako osobie zajmującej się fitopatologią, w pracy traktującej o aspektach odporności ziemniaka na zarazę, zabrakło mi opisu tego ważnego patogenu i dramatycznych wydarzeń w skali międzynarodowej, będących podręcznikowym przykładem znaczenia chorób roślin.

Brak danych na temat obiektów badawczych tj. rośliny i patogena, kompensowany jest ciekawie opracowanym kompendium wiedzy na temat typów odporności roślin, ze szczególnym uwzględnieniem nabytej odporności systemicznej oraz mechanizmów rządzących dziedziczeniem epigenetycznym. W hodowli roślin wprowadzanie genów odporności oraz QTLi z nią związanych to podstawa warsztatu pracy. Ciekawa jestem zdania Doktoranta i jego wizji na temat możliwości praktycznego wykorzystania mechanizmu dziedziczenia epigenetycznego w hodowli i ochronie roślin. Czy firmy hodowlane wprowadzą 'priming' induktorami odporności np. kwasem  $\beta$ -aminomasłowym jako element strategii hodowlanej? Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych w Słupi Wielkiej, tak jak inne ośrodki tego typu na świecie, rejestruje odmianę jeśli różni się ona od pozostałych (cecha odrębności) oraz jest wyrównana i trwała. Skoro dziedziczenie epigenetyczne to stabilne, długoterminowe zmiany obejmujące modyfikacje chromatyny i wywołujące zmiany w potencjale transkrypcyjnym komórek, prowadzące do określonych reakcji roślin m.in. na stresy środowiskowe, to formy zaprogramowane epigenetycznie mają szansę spełnić wymogi instytucji rejestracyjnych. W odróżnieniu od odmian populacyjnych, odmiany mieszańcowe F1 też mają określoną stosunkowo krótką trwałość i wymagają nieustannego odnawiania materiału siewnego, a zatem 'epi-odmianom' też powinno się dać szansę zaistnienia na rynku komercyjnym. Ciekawa jestem przemyśleń Doktoranta na ten temat, gdyż wątek ten nie jest rozbudowany w dyskusji ani wnioskach rozprawy doktorskiej.

Reasumując, Doktorant zajął się niezwykle ważną i aktualną tematyką badawczą związaną z jedną z najważniejszych chorób rośliny uprawnej o globalnym znaczeniu. Badania nad wykorzystaniem dziedziczenia odporności nabytej wpisują się w nurt tworzenia organizmów modyfikowanych epigenetycznie (EMO) poprzez metylację DNA wpływającą na poziom transkrypcji selektywnie wybranych genów, w tym głównie genów odporności i genów związanych z patogenezą u roślin. Tematyka jest aktualna a uzyskane przez Doktoranta wyniki badań przyczyniają się do uwypuklenia wielkiego znaczenia nabytej odporności systemicznej roślin oraz możliwości jej dziedziczenia zarówno na drodze wegetatywnej jak też generatywnej.

## Merytoryczna ocena pracy

Praca doktorska pana mgr. inż. Daniela Kuźnickiego poszerza naszą wiedzę na temat roli odporności nabytej oraz możliwości i mechanizmów jej dziedziczenia. Badania wykonano przy zastosowaniu licznych i zróżnicowanych metod obejmujących współczesny warsztat fitopatologa i biologia molekularnego. Badania prowadzono na starannie dobranym materiale roślinnym ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) odmiany Sarpo Mira w znacznym stopniu odpornym na porażenie lęgniowcem *P. infestans*. Proszę Doktoranta o podanie powodu, dla którego zdecydowano się na zastosowanie tej konkretnie odmiany ziemniaka. W pracy zawarto informacje, że u odmiany Sarpo Mira stwierdzono 5 genów odporności na w/w patogen i zapewne ta dość szczegółowa wiedza była podstawą wyboru odmiany do badań, jednak w pracy nie opisano powodu wyboru tej odmiany ani jej charakterystyki gospodarczej i hodowcy (czy jest to IHAR?).

Eksplantaty ziemniaka namnażano w warunkach sterylnych metodą sadzonkowania *in vitro* i Doktorant szczegółowo i bardzo starannie opisał warunki wzrostu i ukorzeniania roślin. Rośliny traktowano induktorem BABA jednokrotnie, w pokoleniu rodzicielskim. Ze względu na obcocylność roślin, dla uzyskania pokolenia generatywnego rośliny zapytano w warunkach kontrolowanych a kwiaty utrzymywano w izolatorach. Warunki doświadczalne dobrano starannie, zadbano także by rośliny kontrolne zapylane były pyłkiem roślin nie traktowanych induktorem BABA. Na fotografii 12b dopatrzyłam się ciemnego przebarwienia okwiatu i przyległej szypułki. Czy rośliny były wolne od innych patogenów, np. z rodzaju *Alternaria*?

Brak wcześniejszej charakterystyki patogenu we wstępnej części pracy powoduje, iż trudno jest ocenić czy wybór tego konkretnie patogenu był najwłaściwszy. Czy eksperyment przeprowadzony z innymi izolatami, typami kojarzeniowymi, dałby podobne wyniki? Proszę o poszerzenie mojej wiedzy na temat zmienności genetycznej patogenu w Polsce i na świecie, liczby typów kojarzeniowych *P. infestans* i innych ważnych cech patogenu, które wpływają na odporność ziemniaka.

Zastosowano trzy stężenia induktora BABA. Można by się spodziewać, że największe stężenie (10 mM) będzie najbardziej efektywne, jednak tak się nie stało ze względu na widoczne chlorozy, punktowe nekrozy oraz spadek turgoru liści. Stężenie induktora opisywano czasem jako mM a czasem mmol, tymczasem jednostki powinny być jednolite w całej pracy. Wybór stężenia induktora oparto nie tylko na analizie wizualnej lecz także na wynikach analizy ekspresji genu *AspRS* (syntaza aspartylo-tRNA), odpowiedzialnego za syntezę białka enzymatycznego, które podlega bezpośredniej interakcji z BABA. Na podstawie uzyskanych wyników najwyższą dawkę induktora wykluczono z dalszych analiz.

Ten etap był kluczowy dla wszystkich dalszych badań, bowiem niewłaściwy dobór dawki induktora wpłynąłby na wyniki wszystkich analiz. Wybór stężenia dokonano trafnie, bowiem zarówno powierzchnia plam chorobowych po działaniu *P. infestans* zmniejszyła się istotnie statystycznie, jak też istotnie zmniejszył się poziom transkryptu genu *Pitef*, świadczący o zmniejszeniu ilości biomasy patogenu. Wyżej wymienione wyniki pokazano na wyraźnych i wyczerpująco opisanych wykresach, zaznaczając nie tylko odchylenie standardowe, ale też warianty statystycznie istotnie różniące się od kontroli. Takie czytelne ryciny przygotowano w całej pracy. Brawo!

Widzę sprzeczność w stwierdzeniu, że analizy przeprowadzono po 1,3,6 i 24 godzinach po indukcji BABA ale inokulacje patogenem poprzez spryskanie liści wykonano trzy dni po indukcji BABA, dlaczego nie wcześniej a jeśli nie, to dlaczego analiz nie wykonano także 72 godziny po indukcji? Taka analiza byłaby bardzo wartościowa i kompatybilna z testem inokulacyjnym. Z tekstu na stronie 54 wynika, że takich analiz nie przeprowadzono, natomiast z ryciny 15 wynika, że takie próby pobrano. Tabela ryciny 15 na stronie 56 jest niezrozumiała, dlaczego wartości w nawiasie to nie 73 (1+72), 75 (3+72) oraz 78 (6+72) skoro inokulacja nastąpiła po 3 dobach od czasu „0”, od którego policzono kolejne wartości 96 (24+72) oraz 120 (48+72)?

W pracy zastosowano standardowe i poprawne metody inokulacji oraz jej skuteczności, poprzez pomiar objawów chorobowych w wyniku analizy histochemicznej po wybarwieniu tkanek błękitem tryptofanowym, odbarwieniu wodzianem chloralu, zeskanowaniu obrazu i obróbce w programie ImageJ. Zmierzono także poziom transkryptu genu *Pitef1*, występującego w jednej kopii w genomie patogenu i ulegającego konstytutywnej ekspresji na wszystkich etapach jego rozwoju.

Ekspresję genów badano standardową metodą PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR), po izolacji całkowitego RNA, którego ilość określono na urządzeniu typu NanoDrop a następnie rozcieńczano do ustalonego stężenia. Z prób usuwano DNA. Proces odwrotnej transkrypcji i utworzenie bibliotek cDNA przeprowadzono przy zastosowaniu zestawu firmy Fermentas w obecności inhibitora RNaz. Wszystkie niezbędne kroki przygotowawcze przy badaniu RNA prowadzono na łaźni lodowej, unikając tym samym zmian struktury RNA. Sekwencje, nazwy i temperatury topnienia produktów reakcji RT-qPCR przedstawiono w tabeli (16 par starterów). Specyficzność amplifikacji oceniono na podstawie analizy krzywych topnienia, co także jest standardową i poprawną metodą, właściwą dla tego eksperymentu. Genami referencyjnymi były *ef1a* oraz *18S rRNA*, a ilość transkryptu obliczano względem wariantów kontrolnych, co także jest właściwym trybem postępowania.

Niespecyficzne produkty pomijano w obliczeniach; czy doktorant może przytoczyć na ile często takie produkty się pojawiały?

Ocenę efektywności nabywania odporności po indukcji przez BABA badano na podstawie ekspresji genów *PR1* i *PR2* oraz genu odporności *R3a*, opisanego w części wynikowej jako główny gen odporności w odmianie ziemniaka Sarpo Mira. Skoro gen *R3a* pełni taką ważną rolę to obowiązkowo powinien być scharakteryzowany (lub choć wymieniony w sposób szczególny). Jednakże w części poświęconej materiałom i metodom brak tego opisu, stad pytania o znaczenie genów odporności nasuwają się same. Dlaczego nie badano poziomu transkryptów genów *R3b*, *R4*, *R8* oraz *Rpi-Smiral*, czyli pozostałych (poza *R3a*) genów odporności obecnych w odmianie Sarpo Mira? Czy ich sekwencje nie są znane? W rozdziale metodycznym nie wyjaśniono czym kierowano się wybierając pozostałe 12 genów, dopiero lektura części wynikowej objaśnia ten wybór.

Doktorant wykazał, że po zaindukowaniu, u roślin poddanych inokulacji ekspresję genów *PR1*, *PR2* oraz genu odporności *R3a* stwierdzano szybciej i była ona silniejsza. Te zależności także były istotne statystycznie, nie tylko u form rodzicielskich ale także u roślin rozmnożonych wegetatywnie i generatywnie.

Procedury analizy metylacji DNA, w tym całkowitej metylacji metodą ELISA oraz metodą immunochemiczną (ICC), poprzedzone izolacją całkowitego genomowego DNA liści, wykonaną metodą fenolowo-chloroformową a wyniki poddano analizie statystycznej w celu stwierdzenia różnic pomiędzy próbą kontrolną a określonym wariantem z zastosowaniem inokulacji. Poza oznaczeniem poziomu całkowitej metylacji (niezbyt zręcznie określanej w pracy doktorskiej jako „globalna”) Doktorant określił też zmiany w metylacji DNA sekwencji genów *PR1*, *PR2* i *R3a*, posługując się w tym celu metodą MS-HRM, a zatem wysokorozdzielczą analizą krzywych topnienia w połączeniu z traktowaniem nici DNA wodorosiarczynem, powodującym zmianę niezmetylowanej cytozyny w uracyl, co wpływało na zmianę temperatury topnienia produktu. Sekwencje promotorowe wyznaczono arbitralnie (1000 pz przed miejscem startu transkrypcji). Rozdział PCR sekwencji promotorowej genu *PR1* pokazany na rycinie 17 wskazuje na długość produktu 200-250 pz, jednak sam rozdział jest słabej jakości, nie opisano jaki zastosowano marker, a wszystkie ścieżki to ten sam produkt powtórzony trzykrotnie; informacja byłaby pełniejsza gdyby pokazano produkty sekwencji promotorowych trzech badanych genów. W badaniach Doktorant oznaczył także ilość transkryptu dojrzałego miRNA. Względna ilość transkryptu oznaczano w stosunku do kontroli oraz do genów referencyjnych *ef1a* i *18S rRNA*.

Wszystkie doświadczenia miały trzy powtórzenia biologiczne i trzy techniczne; dane poddawano analizie statystycznej, a zatem wnioski były oparte na podstawach naukowych.

Ekspresja genów biorących udział w procesach metylacji cytozyny wykazywała zmienne tendencje (np. silny wzrost ekspresji genu *SAMS* (syntaza S-adenozylometioniny) do 24 godziny po potraktowaniu BABA a następnie spadek). Co więcej wpływ na tę ekspresję miała także inokulacja *P. infestans*, zwłaszcza w połączeniu z zastosowaniem induktora BABA. Wzrost ekspresji dotyczył także genu *SAHH* (hydrolaza S-adenozylhomocysteiny, będącej silnym inhibitorem metylacji). Doktorant prześledził także ekspresję genu *MET1* (metylotransferaza DNA), *CMT3* (chromometylaza) i *DRM2* (metylotransferaza rearanżująca domeny). Wyniki przedstawiono opisowo i na rycinach; w podpisach zabrakło pełnych nazw omawianych genów.

Dla unaocznienia wyników Autor zaprezentowało obrazy jąder komórkowych uzyskanych metodą ICC dla komórek roślin kontrolnych i traktowanych BABA. Metylacja DNA jest tam ukazana w formie zielono lub żółtozielono zabarwionych jąder po zastosowaniu BABA. W niektórych przypadkach wyniki testu ICC były nieco odmienne od wyników testu ELISA, jednak szczęśliwie były zbieżne z rezultatami analizy poziomu ilości transkryptu genów metyltransferaz oraz demetylaz DNA. Badania różnymi technikami mogą dać nieco rozbieżne wyniki w poszczególnych punktach czasowych, jednak końcowy obraz jest bardzo zbliżony.

Doniesienia na temat metylacji roślin i jej związków z odpornością roślin na patogeny są obecne w literaturze naukowej, natomiast czasem związek z odpornością ma spadek poziomu metylacji. Autor dysertacji przytacza różne pozycje literatury naukowej na ten temat, nie ograniczając się wyłącznie do przykładów zbieżnych z wynikami jego pracy, co jest uczciwym i rzetelnym podejściem naukowym. W przypadku niniejszej rozprawy Doktorant wykazał, że u analizowanych genów metylacja nastąpiła w ich sekwencjach kodujących i została przekazana zarówno do pokolenia wegetatywnego jak i generatywnego. Autor rozprawy zaproponował schemat ilustrujący wpływ BABA na metylację wybranych genów ziemniaka. Na podstawie zmian ekspresji dwóch genów szlaku RdDM Doktorant wykazał, że uzyskanie odporności nabytej odbywa się dzięki działaniu mechanizmów tego szlaku.

**Reasumując**, w pracy zastosowano wiele różnorodnych technik obejmujących metody klasyczne, molekularne z elementami bioinformatyki, stosowane w szeroko pojętych badaniach fitopatologicznych. Jeśli były to badania wykonane samodzielnie a nie zlecone w serwisach zewnętrznych lub innych laboratoriach, to Doktorantowi składam najwyższe wyrazy uznania za opanowanie tak wielu metod badawczych. Stosunkowo rzadko spotyka się młodych badaczy, których warsztat naukowy jest tak bogaty i zróżnicowany.

W swojej pracy Doktorant dowiódł że indukcja roztworem BABA powoduje odporność systemiczną ziemniaka na wirulentny izolat *P. infestans*. Najciekawszym elementem pracy jest moim zdaniem wykazanie, iż odporność ta jest dziedziczona na zasadzie zmian epigenetycznych, zarówno w pokoleniu wegetatywnym jak i generatywnym, a molekularnym nośnikiem trwałości tej odporności jest metylacja cytozyny w sekwencjach kodujących genów *PR1*, *PR2* oraz *R3a*, kierowana przez RNA (RdDM).

## **Wnioski**

Doktorant przeprowadził poprawne rozumowanie, jednak sformułowane wnioski są raczej podsumowaniem wyników. W rozdziale Wnioski zabrakło wniosku końcowego, jednak szczęśliwie pojawia się on w streszczeniu pracy, choć w tym przypadku nie było już możliwości omówienia aspektów praktycznych. W dyskusji zabrakło mi szczegółowego omówienia potencjału aplikacyjnego wykonanych badań. Proszę o kilka słów na ten temat.

Wybiegając w przyszłość: jakie są możliwości zastosowania BABA w praktyce? Czy możliwe jest opryskiwanie roślin na polu w celu uzyskania efektu odporności i jakie byłyby koszty takiego zabiegu? Na polu choroby często występują w kompleksie, poza zarazą ziemniaka jest kilka innych ważnych gospodarczo chorób wywoływanych przez grzyby, i powodujących nekrozy zielonych części roślin, np. alternarioza (czern) powodowana przez grzyb *Alternaria solani*. Czy w przypadku zastosowania BABA można spodziewać się kompleksowej ochrony ziemniaka przed kilkoma patogenami jednocześnie, niezależnie od królestwa z którego pochodzą? Plamistości liści i inne choroby ziemniaka wywoływane są przez bakterie, lęgniowce, grzyby a także wirusy. Wspólny mechanizm obrony przed wszystkimi tymi patogenami byłby wielkim osiągnięciem. Czy mechanizm ten łatwo można przezwyciężyć? Co dzieje się w roślinie gdy brak jest chorób? Czy i jaki jest koszt pre-kondycjonowania systemu obronnego roślin, wiemy co rośliny zyskują mając taki system jako oręż, a czy coś tracą? W badaniach Lankinena i in., opublikowanych w 2016 roku dziedziczenie odporności indukowanej BABA w znacznym stopniu zależało od genotypu. Czy i w jakim stopniu opracowana strategia sprawdzi się na innych odmianach ziemniaka aniżeli Sarpo Mira?

## **Podsumowanie**

Eksperymenty zaplanowano logicznie, badania były pracochłonne, wymagające technicznie, wykonano je z zastosowaniem tradycyjnych i nowoczesnych technik laboratoryjnych. Dokumentacja wyników jest rzetelna i staranna. Badania dotyczą ważnej tematyki i wpisują się obecnie preferowany nurt poszukiwań i analizy bioróżnorodności

tkwiącej w naturze. Badane związki, po rozwikłaniu tajemnic tkwiących w ich budowie i właściwościach, mogą przyczynić się nie tylko do poszerzenia naszej wiedzy, lecz także do jej wykorzystania w praktyce.

Pan mgr. inż. Daniel Kuźnicki zajął się ważną i aktualną problematyką badawczą. W ramach swojej pracy doktorskiej zastosował bardzo logicznie ułożone podejście badawcze i konsekwentnie zrealizował poszczególne etapy swojego planu. Wykonując poszczególne doświadczenia optymalizował warunki reakcji, wybierał najbardziej wartościowe warianty badawcze. Opis wykonanych badań jest czytelny, warsztat metodyczny poprawny i bardzo nowoczesny. Wnioski szczegółowe i wniosek ogólny wynikają z wykonanych eksperymentów.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Daniela Kuźnickiego w istotny sposób przyczynia się do poszerzenia wiedzy na temat niezwykle istotnej roli dziedziczenia nabytej odporności systemicznej oraz mechanizmów przy pomocy których zachodzi to zjawisko.

Na podstawie jakości rozprawy doktorskiej pan mgr inż. Daniel Kuźnicki jawi się jako ambitny młody pracownik naukowy, którego rozwój powinien być nadal wspierany.

Nie mam najmniejszych wątpliwości, że przesłana do oceny praca doktorska pana mgr. inż. Daniela Kuźnickiego pt. „Dziedziczenie nabytej odporności systemicznej ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary” **spełnia wymagania ustawy o stopniach i tytule naukowym**. Badania dotyczą dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych w obrębie dyscypliny nauk rolniczych i ogrodniczych.

Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr. inż. Daniela Kuźnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Przez wzgląd na wysoki poziom merytoryczny i edytorski pracy, jej nowatorstwo, zastosowanie zaawansowanych technik badawczych oraz istotność uzyskanych wyników, wskazujących na możliwość dziedziczenia nabytej odporności systemicznej na drodze wegetatywnej i generatywnej wnoszę o **wyróżnienie pracy** powołując się na argumentację przytoczoną powyżej. Prace uważam za nowatorską, rzetelną a jej wyniki za ważne dla rozwoju dyscypliny. W perspektywie badania mają istotny potencjał aplikacyjny, możliwy do wykorzystania w integrowanych systemach ochrony roślin uprawnych.



Małgorzata Jędrzycka