

Waldemar Marczewski, prof. dr hab.
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –
Państwowy Instytut Badawczy
Młochów



RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Daniela Kuźnickiego

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

Rozprawa doktorska mgr. inż. Daniela Kuźnickiego została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Wprowadzenie

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary to grzybopodobny patogen należący do klasy Oomycetes, który powoduje zarazę ziemniaka - jedną z najważniejszych pod względem ekonomicznym chorób ziemniaka (*Solanum tuberosum*). W połowie XIX wieku epidemia zarazy ziemniaka doprowadziła do głodu, śmierci milionów ludzi. Szacuje się, że to tragiczne wydarzenie stało się bodźcem do rozwoju badań nad odpornością ziemniaka na patogeny i hodowlą ziemniaka. Priorytetem było i nadal jest rozszerzenie wąskiej puli genetycznej ziemniaka uprawnego o geny odporności na *P. infestans*, głównie pochodzące z dzikich gatunków *Solanum*. Postęp hodowlany uzyskany przy zastosowaniu metod konwencjonalnych przebiegał w ziemniaku bardzo powoli, niemalże przez cały XX wiek. Wprowadzenie do badań roślin metod biologii molekularnej i narzędzi biotechnologicznych, co obserwujemy od 2-3 dekad, skutkuje jakościowym postępowaniem wiedzy o podłożu molekularnym interakcji patogenów z roślinami. Odkrycia związane z epigenetyczną kontrolą dziedziczenia odporności roślin na stesy mają stosunkowo niedługą historię, są wciąż intensywnie badane, znaków zapytania jest mnóstwo, pojawiają się nowe pytania badawcze. Opisane w pracy doktorskiej badania nie dotyczą zatem pobocznego zagadnienia, a są w nurcie bardzo istotnych obszarów badawczych roślin.

Praca obejmuje 162 strony, w tym tekst pracy, 57 rycin, 5 tabel, spis aż 351 pozycji literaturowych oraz wykaz stosowanych skrótów. Tekst pracy obejmuje spis

treści, wstęp, przegląd literatury, cel pracy, materiał, metody, wyniki i dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim.

Ocena merytoryczna pracy

Tytuł pracy został jasno sformułowany. Wstęp i przegląd literatury obejmują 37 stron maszynopisu. Informacje w nich zawarte są bardzo szczegółowe. W mojej ocenie nawet zbyt szczegółowe jak na wprowadzenie, które ma ułatwić śledzenie części eksperymentalnej pracy. Z pewnością świadczy o rozległej wiedzy Autora i o jego umiejętności spojrzenia na omawiane zagadnienie z szerszej perspektywy. Jednak tekst zyskałby na przejrzystości w kontekście postawionych celów, gdyby niektóre informacje, np. o modyfikacjach białek histonowych, były pominięte, na rzecz dodatkowych informacji o specyfice genomu ziemniaka tetraploidalnego, czy złożoności dziedziczenia cech w tym gatunku. Uwaga szczegółowa: strona 27: *Solanum physalifolium* to nie jest diploidalna odmiana ziemniaka a chwast występujący w Ameryce Południowej.

Doktorant sformułował cele pracy w formie dwóch zadań badawczych: (1) wykazanie skuteczności indukowania nabytej odporności systemicznej (SAR) w odmianie ziemniaka Sarpo Mira na skutek działania kwasu β -aminomasłowego (BABA) względem wirulentnego izolatu *P. infestans*; (2) przeprowadzenie analizy poziomu metylacji cytozyny dla wybranych genów pod kątem pamięci stresowej SAR w pokoleniach wegetatywnym i generatywnym. Uwaga szczegółowa: strona 46: „...metylacja cytozyny docelowych loci DNA”. Metylacji mogą podlegać sekwencje DNA, loci to ich pozycje chromosomowe. Działanie indukcyjne BABA w roślinach opisano w licznych publikacjach naukowych. Cele badawcze pracy zawierają elementy nowatorskie, jednak nie można ich postrzegać przez pryzmat nowej hipotezy badawczej.

Część eksperymentalna pracy jest poprzedzona 24 – stronicowym rozdziałem Materiał i Metody. Autor opisał w sposób uporządkowany procedury niezbędne do ewentualnego powtórzenia przedstawionych w pracy doświadczeń, z jedną uwagą: strona 48: ziemniak tetraploidalny nie posiada barier samoniezdgodności. Obcopleyność może dotyczyć genotypów, a w tym wypadku poszczególne rośliny odmiany Sarpo Mira mają ten sam genotyp. Ten sam efekt zostałby uzyskany po samozapyleniu lub zapyleniem mieszaniną pyłku z wielu roślin. Każda roślina wyprowadzona z nasion po samozapyleniu to inny genotyp, w swej złożoności odmienny od odmiany Sarpo Mira. Z

uwagi na wysoką heterozygotyczność ziemniaka zróżnicowanie alleliczne w poszczególnych loci będzie istotnie rzutować np. na poziom transkrypcji genów. Czy fakt ten został uwzględniony w metodyce badawczej?

Rozdział Wyniki obejmuje 35 stron maszynopisu, który można podzielić na cztery części. W pierwszej części Doktorant opisał wyniki badań nad ustaleniem optymalnego stężenia induktora BABA w aspekcie rozwoju infekcji ziemniaka po zakażeniu *P. infestans*. Badania fenotypowe były wspomagane przez ekspresję dwóch genów markerowych. Główna część wyników dotyczy badań przesiewowych ekspresji 10 genów związanych z reakcją obronną roślin na stresse biotyczne i abiotyczne, genów związanych z procesami metylacji DNA, metylotransferaz i demetylaz, oraz genu odporności na zarazę *R3a*. Wykonano badania ekspresji dla 4 grup roślin: kontroli, roślin poddanych działaniu BABA, roślin inokulowanych *P. infestans* oraz roślin poddanych działaniu induktora i patogena. Dla 3 genów, *PR1*, *PR2* i *R3a*, Doktorant przedstawił wyniki ich ekspresji w pokoleniu rodzicielskim, roślinach uzyskanych z rozmnożenia wegetatywnego oraz generatywnego. W przypadku pozostałych 7 genów zaprezentowano dane o ekspresji genów tylko w roślinach pokolenia rodzicielskiego. Od strony molekularnej ta część wyników została opisana w sposób właściwy. Wątpliwości dotyczą doboru materiału do badań roślin pokolenia generatywnego. Zmienność genetyczna roślin uzyskanych z nasion wymaga innego podejścia metodycznego w badaniach fitopatologicznych i molekularnych niż to opisane w rozdziale Materiał i Metody. Proszę o ustosunkowanie się do tej kwestii podczas publicznej obrony. Trzecia część Wyników dotyczy badań związanych z metylacją DNA. Przedstawiono dane pomiarów całkowitej metylacji DNA metodami ELISA i ICC dla 4 wymienionych powyżej grup roślin. Niestety brak jest informacji, które pokolenie było przedmiotem badań, rodzicielskie, kolejne pokolenie wegetatywne czy generatywne? Szkoda, iż zmiany w poziomie metylacji sekwencji promotorowych i kodujących dla genów *PR1*, *PR2* i *R3a* zostały opisane jedynie w roślinach przed inokulacją *P. infestans*. Nie sposób zatem ustosunkować się do problematyki ewentualnego dziedziczenia nabytej odporności systemicznej odmiany ziemniaka Sarpo Mira na infekcję *P. infestans*. Proszę o stosowny komentarz podczas publicznej obrony. Ostatnia część Wyników dotyczy badań ekspresji genów *AGO3* i *DCL3* oraz poziomu transkryptu miRNA, *miR482e*, w pokoleniu rodzicielskim. Podsumowując, część eksperymentalna pracy wzbudza pewien niedosyt. Doktorant przyłożył zbyt duży nacisk

na mnogość wykonanych badań kosztem ich spójności w kontekście zasadniczego celu pracy.

Dyskusja pracy jest obszerna, z licznymi odniesieniami literaturowymi do wyników uzyskanych dla innych modeli doświadczalnych. Doktorant poczynił próby interpretacji uzyskanych wyników w kontekście mechanizmów obronnych na stresy biotyczne i abiotyczne, opisanych w ziemniaku i innych gatunkach roślin. Nie zawsze są to próby uprawnione. Rejestracja zmian ekspresji genów w badaniach przesiewowych, a takie dominują w recenzowanej pracy, nie daje wystarczających podstaw do wyciągania ogólnych konkluzji o mechanizmach biologicznych, funkcjonujących na styku roślina – stres. Z uwagi na wspomniane powyżej zastrzeżenia, co do sposobu badań roślin w pokoleniu generatywnym i braku analizy metylacji DNA po infekcji *P. infestans*, zaproponowany schemat na Rycinie 57 wpływu BABA na metylację DNA wybranych genów jest nieuprawniony.

Podsumowanie

Generalnie należy podkreślić bardzo poprawny styl pracy, w której zagadnienia molekularne są opisane bez stosowania żargonowych określeń laboratoryjnych. Zauważyłem dosłownie pojedyncze błędy edytorskie. Biorąc pod uwagę całość pracy, dogłębną wiedzę Doktoranta o odporności roślin na patogeny, epigenetycznych uwarunkowaniach reakcji na stresy, umiejętności wykorzystania w badaniach wielu technik molekularnych, oceniana praca spełnia wymogi formalne i naukowe, zawarte w art. 13 ust 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr. inż. Daniela Kuźnickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

