

Poznań, 07.05.2017 r.

Dr hab. Iwona Morkunas, prof. nadzw.
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Labuddy pt. „Ekspresja arginazy i enzymów proteolitycznych *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na porażenie *Heterodera schachtii*”

wykonanej w Katedrze Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem dr hab. Jolanty Marii Dzik.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dziekana Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie z dnia 9 marca 2017 r. (Rol 20/2017), powołujące się na uchwałę Rady Wydziału z dnia 9 marca 2017 r.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl dwóch monotematycznych publikacji naukowych, które są oryginalnymi pracami, opublikowanymi w 2016 roku w zagranicznych czasopismach naukowych takich jak Plant Pathology oraz Plant Physiology and Biochemistry znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. **Labudda M**, Róžańska E, Cieśla J, Sobczak M, Dzik JM (2016a) Arginase activity in *Arabidopsis thaliana* infected with *Heterodera schachtii*. Plant Pathology 65:1529–1538. doi:10.1111/ppa.12537, IF: 2.383 (2015); IF: 2.723 (5-letni); MNiSW: 35 (2016)
2. **Labudda M**, Róžańska E, Szewińska J, Sobczak M, Dzik JM (2016b) Protease activity and phytocystatin expression in *Arabidopsis thaliana* upon *Heterodera schachtii* infection. Plant Physiology and Biochemistry 109:416–429. doi:10.1016/j.plaphy.2016.10.021, IF: 2.928 (2015); IF: 3.434 (5-letni); MNiSW: 35 (2016)

Łączna wartość tych publikacji według kryteriów MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi 70 punktów a wartość współczynnika IF według listy JCR wynosi 5,311. W wyżej wymienionych pracach Doktorant jest pierwszym autorem i Jego udział w powstaniu tych prac wynosi od 55% do 60%, co wskazuje na dominujący wkład w tworzeniu i realizacji badań.

Doktorant złożył oświadczenia i w każdym z nich przedstawił, że Jego wkład w powstaniu artykułów polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaprojektowaniu doświadczeń, wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu graficznym i statystycznym, interpretowaniu wyników, napisaniu artykułów oraz przygotowaniu manuskryptów do procedur wydawniczych. Współautorzy poszczególnych prac złożyli także oświadczenia, w których przedstawili swój wkład w ich powstanie.

Rozprawa doktorska, której podstawą są wyżej wymienione artykuły naukowe została zatytułowana „Ekspresja arginazy i enzymów proteolitycznych *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na porażenie *Heterodera schachtii*”, obejmuje streszczenie w języku polskim i angielskim oraz została uzupełniona komentarzem liczącym 11 stron w języku polskim, w którym Doktorant wyjaśnia problem badawczy opisany w publikacjach oraz podsumowuje najważniejsze wnioski płynące z wyżej wymienionych prac. Rozdział pierwszy wspomnianego komentarza, tj. *Omówienie wyników na tle obecnego stanu wiedzy* obejmuje następujące podrozdziały: *Przegląd piśmiennictwa*, *Cel rozprawy*, *Wyniki*, *Podsumowanie*. Ponadto załączono podsumowanie w języku angielskim (jest to rozdział drugi *Summary* i spis literatury, tj. rozdział trzeci *Piśmiennictwo*). Wobec powyższego wszystkie kryteria niezbędne do przedstawienia rozprawy doktorskiej zostały spełnione pod względem formalnym.

Należy wspomnieć, że Doktorant w dorobku naukowym posiada także dwa inne artykuły posiadające współczynnik wpływu impact factor (IF), znajdujące się w bazie JCR, poza tymi które stanowią przedmiot rozprawy doktorskiej. Pierwszy jest to praca przeglądowa, w której Doktorant jest pierwszym autorem, opublikowana w *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* (IF₂₀₁₅ 1.213, MNiSW₂₀₁₆ 25pkt,) i drugi oryginalna praca opublikowana w *Journal of Pineal Research* o wysokim wskaźniku cytowań (IF₂₀₁₆ 9.314, MNiSW₂₀₁₆ 40 pkt).

Celem pracy było zbadanie wpływu nicienia mątwika burakowego (*Heterodera schachtii*) na ekspresję i aktywność arginazy oraz enzymów proteolitycznych w *A. thaliana*. Enzymy te pełnią istotną rolę w metabolizmie azotu, a także w odpowiedzi roślin wyższych na infekcję pasożytniczą. Postawione przez Doktoranta cele badawcze są ważne ze względu na poznanie mechanizmów obronnych roślin aktywowanych w odpowiedzi na infekcję powodowaną przez endopasożytniczego nicienia, w których istotne znaczenie mają wyżej wymienione enzymy. W reakcji katalizowanej przez arginazę poza mocznikiem powstaje ornityna, która służy jako prekursor do biosyntezy ważnych metabolitów glutaminianu, proliny i poliamin, które zaangażowane są w reakcje obronne rośliny-gospodarza w warunkach stresowych. Należy podkreślić, że poza dostarczaniem ornityny i agmatyny, L-arginina służy także jako substrat do syntezy tlenku azotu (NO), który odgrywa istotną rolę w reakcjach

obronnych roślin na infekcje powodowane przez czynniki biotyczne. Ponadto kolejnym celem pracy było zbadanie zmian aktywności peptydaz w *A. thaliana* infekowanej *H. schachtii* i wnioskowanie o interakcjach w badanym układzie roślina-nicień.

Doświadczenia przeprowadzono na modelowym układzie doświadczalnym, gdzie korzenie roślin *A. thaliana* były inokulowane larwami inwazyjnymi stadium J2 mątwika burakowego *H. schachtii*, które po wnikięciu do korzeni żywiciela inicjują tworzenie się syncytium, hipertroficzej struktury, za pośrednictwem, której rozwijające się nicienie pobierają składniki odżywcze. Obiektem badań były zarówno korzenie jak i pędy *A. thaliana*, co pozwoliło na wnioskowanie o poinfekcyjnym systemicznym przesyłaniu sygnału z organu do organu, tj. z korzenia do liścia. W związku z tym, że materiał roślinny był pobierany do analiz w dniu inokulacji oraz po 3, 7 i 15 dniach od momentu inokulacji, Doktorant analizował zmiany ekspresji i aktywności tych enzymów w czasie po infekcji. Kontrolę w tych doświadczeniach stanowiły rośliny nieinokulowane zbierane w tych samych punktach czasowych.

W mojej opinii badanie odpowiedzi rośliny w różnych punktach czasowych po inokulacji czynnikiem biotycznym jest niezwykle cenne, ponieważ reakcja rośliny jest często różna podczas fazy infekcji i w okresie pełnej inwazji czynnika biotycznego. Należy dodać, że w publikacjach naukowych stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej, zaplanowane przez Doktoranta eksperymenty i metodyka wykonanych badań jest prawidłowa. Doktorant realizował badania pod kierunkiem Pani dr hab. Jolanty Marii Dzik, która posiada doświadczenie i dorobek publikacyjny dotyczący oddziaływań roślina – pasożytnicze nicienie rozpoznawalny na arenie międzynarodowej.

W mojej opinii temat pracy doktorskiej mgr Mateusza Labuddy w pełni oddaje problematykę badawczą rozprawy. Poza tym cele badań postawione przez Doktoranta są interesujące i otrzymane wyniki badań nowatorskie.

Ponadto wyniki prezentowanych przez Doktoranta badań są szczegółowo analizowane i szeroko dyskutowane na tle bieżącej literatury zagranicznej, stąd wartość przedstawionych badań w powyższym cyklu publikacji w mojej ocenie jest wysoka. W przedłożonych do oceny publikacjach zostały przedstawione fizjologiczno-biochemiczne i molekularne wyniki badań dotyczące odpowiedzi rzodkiewnika pospolitego (*A. thaliana*) na porażenie *H. schachtii*, jednego z najważniejszych nicieni z rolniczego punktu widzenia oraz rośliny modelowej wykorzystywanej ze względu na w pełni zsekwencjonowany genom. Wyniki prezentowane w pierwszym artykule w znacznej mierze dotyczą ekspresji i aktywności arginazy (Labudda i wsp. 2016a), natomiast w drugim aktywności enzymów proteolitycznych i ekspresji fitocystatyn

(inhibitorów endopeptydaz) u roślin porażonych nicieniem cystowym (Labudda i wsp. 2016b). Duża część wykonanych przez Doktoranta badań dotyczy pędów rośliny żywicielskiej *A. thaliana*, ponieważ skutki porażenia nicieniem cystowym w tej części rośliny są rozpoznane w mniejszym stopniu aniżeli w pierwotnym miejscu infekcji, tj. w korzeniach.

W pierwszej publikacji (Labudda i wsp. 2016a), Doktorant szczegółowo przedstawia rezultaty wykonanych przez siebie analiz takich jak: aktywność arginazy (ARGAH) w pędach i korzeniach *A. thaliana* infekowanych *H. schachtii*, poziom ekspresji genów kodujących arginazę (*ARGAH2*) w pędach i korzeniach *Arabidopsis* po infekcji *H. schachtii*, aktywność dekarboksylazy argininowej (ADC) w korzeniach *Arabidopsis* infekowanych *H. schachtii*, aktywność i poziom ekspresji reduktazy glutationowej (GR) w pędach *Arabidopsis* i zawartość proliny w pędach *Arabidopsis* po infekcji *H. schachtii*.

Z kolei w drugiej publikacji (Labudda i wsp. 2016b), Doktorant przedstawił wyniki zawartości białek rozpuszczalnych w korzeniach *Arabidopsis* po infekcji *H. schachtii*, aktywności proteaz, wpływu jonów wapnia (Ca^{2+}) na aktywność endopeptydazy cysteinowej, profil aktywności proteaz na zymogramie, poziom ekspresji mRNA fitocystatyn w korzeniach, pędach i syncytiach, poinfekcyjną zawartość polifenolowych związków w pędach *Arabidopsis*, wpływ związków fenolowych na aktywność proteaz *in vitro*, stężenie białek karbonylowanych w pędach *Arabidopsis* infekowanych *H. schachtii*.

W mojej opinii niezmiernie interesującymi wynikami tej dysertacji jest odnotowanie znaczącego obniżenia aktywności arginazy i enzymów proteolitycznych oraz ekspresji genu arginazy I w porażonych korzeniach we wszystkich badanych punktach czasowych po inokulacji. W dyskusji Doktorant uzasadnia, że obniżenie aktywności tych enzymów jest spowodowane obecnością efektorów wydzielanych przez *H. schachtii*, które blokują reakcje obronne rośliny-gospodarza. Z kolei wykazał także, że aktywność niskocząsteczkowych oraz zależnych od jonów wapnia endopeptydaz cysteinowych w infekowanych korzeniach była stymulowana.

Ponadto analizując pędy roślin porażonych Doktorant wykazał, że ekspresja genu arginazy II była stymulowana we wczesnym czasie po inokulacji (3 i 7 dniu), zaś aktywność enzymatyczna była istotnie zwiększona jedynie w 3 dniu po infekcji.

Kolejnym interesującym wynikiem było pokazanie, że aktywność proteolityczna (oznaczana z użyciem azokazeiny jako substratu) w pędach roślin porażonych była niższa w porównaniu z roślinami kontrolnymi, ale znacząco w późnym okresie po inokulacji. Ponadto bardzo wartościowym wynikiem jest pokazanie profilu proteaz na zymogramie i ujawnienie różnic w ilości izoenzymów w przypadku pędów i korzeni.

Następnie badając poziom ekspresji mRNA roślinnych endogennych inhibitorów endopeptydaz cysteinowych (fitocystatyn) można było wnioskować o regulacji proteolizy w korzeniach i pędach *A. thaliana* po infekcji *H. schachtii*. W tych badaniach Doktorant wykazał, że ekspresja *AtCYS1*, *AtCYS5* i *AtCYS6* była stymulowana po porażeniu nicieniami. Jednak poziom ekspresji powyższych genów *AtCYS* był wzmagany w różnym stopniu w badanych organach roślin i w syncytiach oraz zależny od czasu po inokulacji. Powyższe zmiany uzasadniano jako niezbędne dla metabolizmu białek w roślinach porażonych nicieniami. Uważam, że są to bardzo cenne wyniki badań, pokazujące regulację aktywności proteolitycznej kompleksowo poprzez wykrycie zmian w różnych organach rośliny i różnym czasie po inokulacji.

Niezależnie od powyższego pomimo, że Doktorant nie oznaczał bezpośrednio wskaźników stresu oksydacyjnego, w dysertacji pokazał także, że aktywność reduktazy glutationowej (GR), enzymu pełniącego istotną rolę w utrzymaniu statusu redoks w komórkach, poinfekcyjnie wzrastała w pędach *Arabidopsis*. Stwierdził także istotnie podwyższoną ekspresję mRNA dla reduktazy glutationowej w 7 dniu po inokulacji w pędach roślin porażonych.

Doktorant odnotował także znaczący wzrost w zawartości białek rozpuszczalnych, poziomie karbonylacji białek oraz ilości polifenoli w pędach roślin porażonych. Ważnym wynikiem tej pracy, poszerzającym poznanie mechanizmów systemicznej odpowiedzi rośliny na porażenie nicieniem było wykazanie, że kwasy fenolowe mogą uczestniczyć w regulacji aktywności endopeptydaz.

W mojej opinii ważnym osiągnięciem tej pracy jest także pokazanie przez Doktoranta, że w następstwie infekcji *H. schachtii* wzrasta zawartość proliny w pędach (związku mogącego pełnić funkcję zmiataacza wolnych rodników i osmolitu), pomimo, że odnotował poinfekcyjnie niższą aktywność dekarboksylazy argininowej (ADC), enzymu dzielącego substrat (L-argininę) z arginazą i katalizującego reakcję do agmatyny, prekursora syntezy poliamin.

Rozdział *Wyniki* w analizowanych publikacjach jest napisany precyzyjnie i jasno, co świadczy o umiejętności właściwej analizy wyników przez Doktoranta. Ponadto na szczególną uwagę zasługuje rozdział *Dyskusja* w przedstawionych do oceny publikacjach, należy podkreślić, że jest bardzo dobrze napisany, co świadczy o dobrej orientacji Doktoranta w problematyce badawczej, dobrej znajomości literatury i dojrzałości naukowej. Poza tym *Konkluzje* prezentowane w ocenianych artykułach jak i *Podsumowanie* w załączonym komentarzu są syntetyczne.

Uwagi ogólne

Oceniając całokształt niniejszej rozprawy powinnam podkreślić, że cała rozprawa, tj. zarówno oceniane publikacje jak i komentarz uzupełniający w języku polskim, są napisane prawidłowo, przejrzyste i dobrze pod względem stylistycznym.

Mam kilka pytań do Kandydata:

1. W publikowanych pracach nie podano dokładnej informacji o sposobie inokulacji korzeni, jest tylko informacja o przygotowaniu inokulum, a zatem proszę o wyjaśnienie
2. Uważam, że prowadząc badania na poziomie fizjologiczno-biochemicznym i molekularnym, warto byłoby w badaniach dotyczących inwazji czynnika biotycznego włączyć obserwacje mikroskopowe, zatem czy wykonywane były przez Doktoranta badania testowe z wykorzystaniem technik mikroskopowych?
3. Czy obserwowano symptomy chorobowe na roślinach *A. thaliana* po inokulacji *H. schachtii*?
4. Czym spowodowane jest obniżenie aktywności dekarboksylazy argininowej (ADC), pomimo wzrostu poliamin w infekowanych tkankach?
5. W związku z tym, że same nicienie wydzielają enzymy proteolityczne, można wnioskować, że aktywność tych enzymów odnotowana w tkankach roślinnych jest wypadkową aktywności rośliny-gospodarza i nicienia, zatem czy podejmowano próby doświadczalne określenia w jakim stopniu aktywność tych enzymów dotyczy rośliny gospodarza czy samego nicienia?

Podsumowanie

1. Wysoko pod względem merytorycznym oceniam napisane przez mgr Mateusza Labuddę opublikowane oryginalne prace twórcze i załączony komentarz w języku polskim. Należy podkreślić, że *Dyskusja* wyników w ocenianych pracach jest bardzo dobrze napisana, Doktorant szczegółowo omówił uzyskane wyniki na tle dostępnych pozycji literaturowych
2. Stwierdzam, że mgr Mateusz Labudda w czasie realizacji celów pracy doktorskiej przeanalizował bogatą literaturę, co wskazuje na dobrą orientację w problematyce badawczej
3. Uzyskane przez Doktoranta wyniki zasługują na zainteresowanie i uwagę badaczy zajmujących się tematyką dotyczącą odpowiedzi roślin na czynniki biotyczne, w tym na pasożytnicze nicienie
4. Otrzymane przez Doktoranta interesujące wyniki zostały opublikowane w prestiżowych, specjalistycznych czasopismach naukowych o stosunkowo wysokim współczynniku cytowania, co wskazuje, że badania zostały docenione także przez Recenzentów *Plant Pathology* i *Plant Physiology and Biochemistry*

Uważam, że otrzymane przez mgr Mateusza Labuddę wyniki badań, stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej, z pewnością wniosą nowe informacje dla współczesnej biologii roślin w zakresie mechanizmów obronnych roślin aktywowanych w odpowiedzi na infekcję powodowaną przez endopasożytniczego nicienia *H. schachtii*, żerującego na korzeniach roślin. Dodatkowo w znaczący sposób przyczynią się do lepszego zrozumienia wzajemnych zależności między pasożytem a żywicielem.

Pragnę równocześnie podkreślić, że zawarte w recenzji nieliczne komentarze i sugestie nie pomniejszają wartości merytorycznej pracy.

Wnioski końcowe

W mojej ocenie rozprawa mgr Mateusza Labuddy spełnia wszystkie wymagania ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Mateusza Labuddę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nakład pracy Doktoranta i włączenie szeregu metod badawczych do realizacji celów pracy oraz ze względu na nowatorstwo wyników badań wnoszę o wyróżnienie pracy.

Dr hab. Iwona Morkunas, prof. nadzw.

I. Morkunas
