



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii

Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
dr hab. Bożena Szal



Warszawa, 19 listopada 2019r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Tomasza Kopczewskiego pt. „Udział chloroplastów i mitochondriów w odpowiedzi ogórka siewnego (*Cucumis sativus*) na infekcję *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*”

Przedstawiona do oceny praca doktorska ma klasyczny podział na kolejne rozdziały: Spis treści, Streszczenie w jęz. polskim i angielskim, Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie wyników i wnioski, Literaturę. W mojej ocenie zabrakło w pracy spisu skrótów stosowanych w pracy ułatwiającego zrozumienie niektórych fragmentów tekstu. Praca zawiera 150 stron tekstu, w tym 31 rysunków i 7 tabel. W rozprawie zacytowano 235 pozycji piśmiennictwa. Tekst jest w większości napisany poprawną polszczyzną, z niewielkimi błędami wynikającymi z zastosowania pewnych skrótów myślowych. Co warto podkreślić, całość tekstu rozprawy jest bardzo starannie edytowana, nie znalazłam w niej praktycznie żadnych literówek.

Praca w założeniu dotyczyła wyjaśnienia roli metabolizmu organelli komórkowych, głównie chloroplastów w odpowiedzi na stres biotyczny wywołany aplikacją patogenów. Ze względu na potencjalnie aplikacyjne znaczenie, mechanizmy odpowiedzi roślin na czynniki stresowe, w tym na biotyczne stresory, są jednym z najczęściej badanych obszarów patofizjologii roślin. Jednak zgodnie z informacjami zawartymi we Wstępie pracy duża część badań jest wykonywana na roślinach modelowych, a nie uprawnych. Z jednej strony poszerza to możliwości warsztatowo-doświadczalne badaczy, z drugiej strony niesie ze sobą niebezpieczeństwo, że wyniki uzyskane na roślinach modelowych nie mogą być bezpośrednio przełożone na rośliny uprawne. Zgodnie z tymi zastrzeżeniami w pracy celowo wybrano model doświadczalny w którym materiałem

badawczym była ważna roślina uprawna, jaką jest ogórek a patogenem *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*, który od lat powoduje obniżenie plonowania ogórka w Polsce. W Pierwszym podpunkcie wstępu Doktorant dosyć sprawnie opisał ogólne mechanizmy odporności roślin na patogeny w oparciu o dostępne dane źródłowe oraz szczegółowe zagadnienia dotyczące znanych interakcji ogórek - *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans*, w tym zagadnień dotyczących prawidłowego rozpoznania zastosowanego w pracy patogena. Pewnym zaskoczeniem dla czytelnika jest zasadność pojawienia się w tekście pierwszej tabeli, w której Doktorant wyszczególnił podstawowe stresory działające na roślinę. Kwestionuję nie tyle przedstawiony podział stresorów ile zasadność pojawienia się tego typu zestawienia w podpunkcie zatytułowanym „Rośliny w warunkach stresu biotycznego”. Dalsze podpunkty Wstępu, zgodnie z tytułem, miały dotyczyć współdziałania regulacyjnego chloroplastów i mitochondriów w odpowiedzi roślin na stres. Niestety nie mogłam oprzeć się wrażeniu pewnego chaosu opisu w tym fragmencie pracy. Już w pierwszym podpunkcie „Znaczenie stanu nadmiaru energii wzbudzenia w chloroplastach w uruchamianiu reakcji odpornościowych” tylko pierwsza część tekstu jest rzeczywiście powiązana tematycznie z tytułem. Znienacka na stronie 23 pracy pojawia się informacja o uszkodzeniach w mitochondriach, a od strony 26 informacje o zmianach metabolizmu reaktywnych form tlenu (RFT) w innych kompartmentach komórkowych (np. w błonie plazmatycznej) bez merytorycznego powiązania z tytułem podrozdziału. W podrozdziale Wstępu „Znaczenie cyklu askorbinian-glutation w stresie biotycznym” tak naprawdę tylko część rozdziału dotyczy tego zagadnienia, większość tekstu jest po prostu omówieniem działania cyklu askorbinianowo-glutationowego. W tym kontekście będę wdzięczna za wyjaśnienie dlaczego Doktorant zaliczył dysmutazę ponadtlenkową do w/w cyklu, co zostało zobrazowane na Rys. 2. Proszę również o wyjaśnienie jakie jest merytoryczne uzasadnienie opisu działania peroksyredoksyn i glutaredoksyn w podrozdziale o cyklu Asa-GSH oraz o wyjaśnienie roli/mechanizmu działania peroksydaz glutationowych u ogórka. Doktorant sugeruje, że aktywność GPX moduluje stan redoks glutationu. W myśl prac opublikowanych np. przez Iqbal i wsp. (2006, FEBS J 273) i Navrot i wsp. (2006, Plant Physiol 142) GSH nie substratem dla białek GPX-like u roślin. Ciekawym wątkiem Wstępu jest opis zmian w metabolizmie cukrów jako sygnałów indukowanych czynnikiem stresowym. Rzeczywiście jest to jeden z gorących tematów w badaniach fizjologii stresu u roślin. O ile większość badań/wyników przytoczonych w tej części wstępu zacytowana niezwykle logicznie nie mogę oprzeć się wrażeniu, że zaliczenie inwertaz do systemu antyoksydacyjnego (strona

32 pracy) jest pewnym nadużyciem. Jeśli się mylę proszę o merytoryczne uzasadnienie. Cennym uzupełnieniem tekstu są zawsze rysunki, które doceniam również w rozprawie doktorskiej Pana mgr Tomasza Kopczewskiego. Rozumiem, że na rysunkach szlaków metabolicznych konieczne są uproszczenia, w poczuciu misji dydaktycznej prosiłabym jednak Doktoranta o bardziej logiczne rozmieszczenie fotosystemów (PSII i PSI) w obrębie tylakoidów granowych i stromowych.

Cel pracy ostał w miarę jasno nakreślony mam jednak pewne wątpliwości czy był on realny do osiągnięcia. Zaplanowane doświadczenia z całą pewnością pozwoliły na określenie zmian w poszczególnych elementach metabolizmu komórki roślinnej, ze szczególnym uwzględnieniem metabolizmu chloroplastów w badanych liściach ogórka po inokulacji patogenem. Wnioskowanie jednak ich o roli, w moim mniemaniu, byłoby możliwe tylko przy zastosowaniu szeregu mutantów jako materiału badawczego. Co niestety nie jest możliwe gdy ogórek jest materiałem badawczym. Proszę również o uściślenie w jaki sposób badania metabolizmu cukrów, w tym inwertaz (*de facto* poziomu transkryptów inwertaz) są bezpośrednio powiązane z sygnałami generowanymi w chloroplastach. Szczegółowe zadania badawcze w punkcie 3 również budzą moją wątpliwość, jaki jest np. bezpośrednie powiązanie L-Met w regulacji odpowiedzi obronnej przez organella?

Nie mam dużych zastrzeżeń co do opisu Materiału badawczego i stosowanych metod, rozdział ten jest napisany w sposób, który pozwala bez problemu (w miarę konieczności) powtórzyć doświadczenia wykonywane przez Doktoranta. Na podkreślenie zasługuje szeroki wachlarz metod jakimi posługiwał się Doktorant. Mam jednak kilka pytań szczegółowych. Wg mojej wiedzy badania dotyczące transpiracji, przewodnictwa szparkowego itd. powinny być wykonywane z minimalną ingerencją w strukturę liścia i warunki hodowli roślin. Tego typu doświadczenia są w mojej pracowni prowadzone na liściach nieodciętych od rośliny, w pomieszczeniach fitotronowych bez przenoszenia materiału badawczego do innych warunków. Zgodnie z moją wiedzą i zaleceniami producenta używanego przez nas urządzenia tylko rygorystyczne przestrzeganie tych zasad daje gwarancję na rzeczywisty pomiar parametrów *in vivo*. Proszę o informację czy wykonano doświadczenia pokazujące, że pomiary wykonane na krążkach liściowych odzwierciedlają wyniki wykonywane na nieodciętych roślinach? Mam również wątpliwości co do pomiaru oddychania mitochondrialnego, czy rzeczywiście Doktorant mierzył oddychanie mitochondrialne na świetle z zastosowaniem elektrody tlenowej Clarka?

Ponieważ cenię sobie konsekwencję w edycji tekstu proszę również o informację dlaczego tylko część metod jest zobrazowana odpowiednimi schematami reakcji.

Generalnie opis uzyskanych przez Doktoranta wyników jest poprawny jednak mam pewne zastrzeżenia co do szczegółowości. Nie widzę merytorycznego uzasadnienia dlaczego Doktorant nie pokusił się, przynajmniej w niektórych fragmentach o uogólnienie zaobserwowanych różnic, przykładowo na str. 70 Doktorant opisuje „w kolejnych dniach analizy (...) stwierdzono odpowiednio o 29, 33, 31, 30% wyższe NPQ” zamiast podsumować że NPQ było o ok. 30% wyższe. Taka szczegółowość (i długość) opisu utrudnia zrozumienie ogólnych trendów. Nieszczęśliwym dosyć wyborem było również założenie porównywania wyników umieszczonych na Rysunkach oddalonych o kilka stron (porównania Rysunku 9 i 10). Może warto byłoby w takich przypadkach skonstruować dużą tabelę? Z założenie nie widzę logicznego uzasadnienia porównywania w niniejszej pracy wyników dla liści K5 i K3, czyli liści na różnych etapach rozwojowych. Niejasne jest dla mnie również jakimi założeniami Doktorant się kierował grupując wyniki. Dlaczego np. parametry fizjologiczne metabolizmu fotosyntetycznego są opisywane jako jedne z pierwszych a poziom transkryptu Rubisco jako jeden z ostatnich wyników? Proszę również o wyjaśnienie kilku szczegółów informacji zawartych w sekcji Wyniki: a) co to za enzym „cytozolowa katalaza”. Zgodnie z moją wiedzą i założeniami pracy Doktoranta używającego aktywności katalazy jako specyficznego markera peroksysomów, katalazy w tkankach liści są związane z tymi właśnie organellami; b) jaką izoformę koduje „gen chloroplastowej dysmutazy” (wynik na Rys. 19); c) na jakiej podstawie zaliczono oksydazę askorbinianową do antyoksydantów; d) dlaczego jabłczan, aktywność MDH oraz aktywność fumarazy są zaklasyfikowane *stricte* jako elementy związane z cyklem Krebsa podczas gdy wszystkie te elementy występują w co najmniej dwóch kompartmentach komórkowych i nie są specyficzne dla mitochondriów.

W części Dyskusja Doktorant starał się omówić uzyskane wyniki na tle dostępnej literatury, w dużej mierze z bardzo dobrym skutkiem. Głównym moim zastrzeżeniem do tej części rozprawy jest brak danych dotyczących parametrów, stanowiących podwaliny wnioskowania. Ponieważ spora część dyskusji opiera się na założeniu, że obserwowane zmiany wynikają ze zmian w stopniu redukcji plastochinonu oraz zmian w wytwarzaniu RFT uważam za słuszne, żeby Doktorant podjął próbę oznaczenia tych parametrów.

W podsumowaniu recenzji chcę podkreślić, że mimo zawartych w niniejszej opinii uwag krytycznych (mających służyć głównie jako wskazówki na co należałoby zwrócić uwagę przy publikacji otrzymanych wyników) doceniam ważkość podjętego przez Doktoranta tematu, nie tylko ze względu na walory poznawcze ważne dla biologa zajmującego się badaniami podstawowymi, za jakiego się od lat uważam ale również ze względu na potencjalne znaczenie aplikacyjne. Nie mam żadnych wątpliwości, że uzyskane przez Doktoranta wyniki mają w większości nowatorski charakter i przyczyniają się do lepszego zrozumienia mechanizmów interakcji roślina - patogen. W świetle powyższych stwierdzeń uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 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). Z pełnym przekonaniem wnioskuję zatem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana mgr Tomasza Kopczewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

-Bożena Szal-

Bożena Szal

