

Poznań, 30.11.2019 r.

Prof. dr hab. Iwona Morkunas
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

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

Praca doktorska mgr Tomasza Kopczewskiego zrealizowana została w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (BiOŚ UŁ) pod kierunkiem Prof. UŁ dr hab. Elżbiety Kuźniak-Gębarowskiej. Podjęta przez Doktoranta problematyka jest kontynuacją badań prowadzonych wcześniej przez Prof. UŁ dr hab. Elżbietę Kuźniak-Gębarowską. Należy podkreślić, że badania będące przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej były finansowane z projektu badawczego przyznanego Doktorantowi w ramach konkursu PRELUDIUM 6 (nr projektu 2013/11/N/NZ9/00116) i w ramach dotacji celowej na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich przyznanej przez Dziekana Wydziału BiOŚ UŁ. Praca doktorska jest opracowana zgodnie z wymogami obowiązującymi dla prac eksperymentalnych w dziedzinie nauk biologicznych, obejmuje bowiem w kolejności: *Streszczenie w języku polskim* (2.5 strony) *i angielskim* (2.5 strony), *Wstęp* (27 stron), *Cel pracy* (2 strony), *Materiały i metody* (22 strony), *Wyniki* (41 stron), *Dyskusja* (25 stron), *Podsumowanie wyników i wnioski* (2.5 strony), *Literatura* (235 cytowanych artykułów literatury światowej).

Nadrzędnym celem pracy jak donosi Doktorant było rozpoznanie roli chloroplastów i mitochondriów w indukcji sygnałów metabolicznych i oksydoredukcyjnych u ogórka siewnego (*Cucumis sativus* L.cv. Cezar) po infekcji patogeniczną bakterią *Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* (Psl) i ich znaczenia dla lokalnej i systemicznej odpowiedzi na infekcję.

Cele pracy zostały przez Doktoranta sformułowane na stronach 41-42 rozprawy. Zadania badawcze obejmowały:

1. Ocenę rozwoju infekcji powodowanej przez patogeniczną bakterię Psl na podstawie analizy poinfekcyjnych makroskopowych, mikroskopowych i termicznych symptomów
2. Identyfikację wskaźników związanych z chloroplastami w warunkach stresu biotycznego i ocenę ich znaczenia funkcjonalnego na podstawie analizy:
 - fluorescencji i oznaczenie stężenia chlorofilu a
 - parametrów wymiany gazowej
 - ekspresji genów dużej podjednostki karboksylazy 1,5-bisfosforybulozy (RuBisCO_l), karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (3PGAD) i chloroplastowej tioredoksyny M3 (TrxM3)
 - stężenia wybranych węglowodanów rozpuszczalnych i ich pochodnych oraz aktywności enzymów metabolizmu węglowodanów (dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej G6PDH, heksokinazy HK i inwertazy)
3. Określenie związku pomiędzy reakcjami fotochemicznymi fotosyntezy i odpowiedzią na infekcję powodowaną Psl poprzez zastosowanie inhibitorów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów
4. Określenie poziomu wybranych antyoksydantów enzymatycznych (aktywności katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy askorbinianowej, reduktazy dehydroaskorbinianowej) i nieenzymatycznych (kwasu askorbinowego i glutationu)
5. Rozpoznanie wzajemnych poinfekcyjnych zależności metabolicznych chloroplastów i mitochondriów oraz ich roli w regulacji lokalnej i systemicznej odpowiedzi obronnej na podstawie analizy zawartości dinukleotydów takich jak NAD(P)H i NAD(P)⁺, stężenia wybranych metabolitów cyklu Krebsa (kwasu L-jabłkowego i kwasu szczawiooctowego) i aktywności enzymów (dehydrogenazy L-jabłczanowej i fumarazy), względnej ekspresji genów kodujących dehydrogenazę L-jabłczanową, fumarazę i dehydrogenazę izo-cytrynianową

Pomimo, że w dysertacji hipoteza robocza niniejszej pracy nie jest napisana bezpośrednio można wnioskować na podstawie przedstawionego Streszczenia i obszernego Wstępu, że chloroplasty i mitochondria w komórkach rośliny-gospodarza po infekcji *P. syringae* wykorzystują określone cząsteczki sygnałowe do przekazywania informacji o ich stanie rozwojowym i fizjologicznym do jądra komórkowego modulując odpowiednio ekspresję genów jądrowych. Zatem powstawanie i przekazywanie sygnałów retrogradowych do jądra komórkowego może mieć istotny wpływ na indukcję systemu obronnego rośliny-gospodarza po infekcji patogeniczną bakterią *P. syringae*. W warunkach ataku patogena homeostaza komórkowa rośliny gospodarza ulega zaburzeniu, a aktywacja systemu obronnego i zdolność do odparcia ataku patogena wymaga precyzyjnej komunikacji między różnymi typami organelli

w komórkach roślinnych, w tym komunikacji pomiędzy chloroplastami lub mitochondriami a jądrem komórkowym w celu indukcji genów obronnych, co w konsekwencji wyzwała zmiany metaboliczne. Poza tym wiadomym jest, że chloroplasty i mitochondria są sprzężone z komórkowym statusem redoks.

W mojej opinii problematyka niniejszej pracy doktorskiej jest niezwykle interesująca. W związku z tym, że szlak retrogradowy dotyczy nie tylko powstawania i przekazywania sygnałów retrogradowych do jądra komórkowego, ale jest dynamicznym szlakiem obejmującym także transport pęcherzyków z błony komórkowej, zapewniając pobór cząsteczek i związków zewnątrzkomórkowych, jak i transport nowo zsyntetyzowanych cząsteczek w komórce, kierując je do wakuoli, dlatego interesującym byłoby rozwijanie tej tematyki w przyszłości przez Doktoranta.

Ocena Wstępu

Zagadnienia przedstawione we Wstępie są podporządkowane tematowi i celowi pracy doktorskiej. W kolejnych podrozdziałach Doktorant omówił zagadnienia dotyczące typów odporności roślin na patogeny, interakcji ogórek siewny–*Pseudomonas syringae* pv *lachrymans* (Psl). Ponadto starał się przedstawić zagadnienie dotyczące współdziałania regulacyjnego chloroplastów i mitochondriów w odpowiedzi roślin na stres, w tym znaczenie stanu nadmiaru energii wzbudzenia w chloroplastach w uruchamianiu reakcji obronnych, znaczenie cyklu askorbinian-glutation w stresie biotycznym u roślin, roli węglowodanów i enzymów związanych z ich metabolizmem w warunkach stresu roślin oraz koncepcję przekazywanie sygnałów retrogradowych do jądra komórkowego w komórce roślinnej. Ponadto w podrozdziałach *Wstępu* zostały zamieszczone wartościowe schematy/ryciny. Poza tym wiele z prac cytowanych we *Wstępie* to publikacje z ostatnich lat badań. Należy podkreślić, że opracowanie *Wstępu* przez Doktoranta pokazuje dobrą znajomość tematyki badawczej, którą realizował.

Materialy i Metody

Mgr Tomasz Kopczewski wykonał badania biochemiczno-molekularne na 4 tygodniowych roślinach ogórka odmiany Cezar F1. Nasiona ogórka siewnego pochodziły z Przedsiębiorstwa Hodowlano-Nasiennego W. Legutko. Proszę o wyjaśnienie czym się kierował Autor rozprawy wybierając do badań odmianę Cezar F1 i jaka była przyczyna wyboru stadium rozwojowego rośliny? Poza tym zastanawia mnie sposób inokulacji roślin, proszę o komentarz. Ponadto mam także sugestię dotyczącą sprawdzania czystości i jakości frakcji chloroplastowej, uważam że

należałoby sprawdzić także aktywność markerowych enzymów chloroplastów, aby móc wnioskować o prawidłowo wyizolowanej frakcji chloroplastowej, obok sprawdzania aktywności markerowych enzymów mitochondriów i innych.

Ponadto nie mam uwag, co do opisanych przez Doktoranta metod badawczych stosowanych podczas realizacji pracy doktorskiej. Należy podkreślić, że Doktorant wykonał ogrom pracy laboratoryjnej i potrzebował nauczyć się wielu metod eksperymentalnych, aby zrealizować postawione cele pracy. Rozdział ten jest opisany bardzo dokładnie i jasno, co zasługuje na docenienie.

Wyniki i Dyskusja

Rozdział *Wyniki i Dyskusja* zasługuje także na pozytywną ocenę i docenienie. Na ponad 41 stronach rozprawy Doktorant szczegółowo przedstawia rezultaty wykonanych przez siebie analiz takich jak rozwój infekcji Psl, analizę parametrów fluorescencji chlorofilu, indeks zawartości chlorofilu, parametry wymiany gazowej, analizę wybranych antyoksydantów (aktywność katalazy i ekspresję genu kodującego katalazę, aktywność i ekspresję genów enzymów cyklu Halliwella-Asady, aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, ekspresję genu chloroplastowej dysmutazy ponadtlenkowej, aktywność oksydazy askorbinianowej, zawartość kwasu askorbinowego i glutationu, zawartość dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych, zawartość węglowodanów i aktywność enzymów ich metabolizmu, ekspresję genów inwertazy kwaśnej i inwertazy zasadowej, zawartość glukozy-6-fosforanu i aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, ekspresję genów heksokinazy i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, zawartość wybranych metabolitów i enzymów cyklu Krebsa (zawartość kwasu L-jabłkowego i szczawiooctowego, aktywność dehydrogenazy L-jabłczanowej i fumarazy, ekspresję genów dehydrogenazy L-jabłczanowej, fumarazy i dehydrogenazy izocytrynianowej oraz ekspresję genów związanych z fotosyntezą, kodujących dużą podjednostkę karboksylazy 1,5-bisfosforibulozy (RuBisCO_l), karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (PEPC), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (3PGAD) i chloroplastowej tioredoksyny M3 (TrxM3). Otrzymane przez Doktoranta wyniki są opisane dokładnie i jasno, co świadczy o umiejętności właściwej analizy wyników. Rozdział wyniki pokazuje ogrom pracy jaki wykonał Doktorant w ramach tej dysertacji. Poza tym należy zaznaczyć, że potrzebował zapoznać się z obsługą różnych urządzeń, co wymagało czasu. Z przeprowadzonych badań Autor przedstawił 6 wniosków, w tym 4 wnioski ogólne. Przykładowo, Autor posługując się fluorymetrem mierzył fluorescencję chlorofilu, stosując kamerę termowizyjną na podczerwień i mikroskopię fluorescencyjną badał rozkład temperatury w liściach ogórka, przy użyciu analizatora

gazowego podczerwieni określił wewnątrzkomórkowe stężenie dwutlenku węgla (Ci), intensywność netto fotosyntezy (PN), przewodnictwo szparkowe (Gs) oraz intensywność transpiracji (E). Zatem posługując się wyżej wymienionymi urządzeniami wykazał, że rozwój kanciastej plamistości liści ogórka prowadził do zmian nekrotycznych na liściach, obniżenia autofluorescencji i stężenia chlorofilu. Poza tym wykazał, że infekcja *Psl* powodowała zamykanie aparatów szparkowych, co obniżało konduktancję szparkową, utrudniało wymianę gazową i ograniczało transpirację. Udowodnił, że rozwój choroby wywoływał stan nadmiaru energii wzbudzenia i zaburzenia transportu elektronów w łańcuchu fotosyntetycznym w liście inokulowanym. Z kolei stosując elektrodę Clarka określił intensywność oddychania mitochondrialnego (R), wykazując że na skutek infekcji *Psl* występowały zmiany w metabolizmie podstawowym u ogórka, które polegały na stymulacji oddychania mitochondrialnego i obniżeniu intensywności fotosyntezy. Ponadto zawartość antyoksydantów, tj. AA i GSH, aktywności enzymów APX, DHAR, MDHAR, GR i SOD w chloroplastach i zawartość sacharydów były mierzone spektrofotometrycznie.

Doktorant otrzymał ogromną ilość wyników, które przedstawił na 25 rycinach i w 4 tabelach. Ponadto rozdział Dyskusja został napisany w sposób przemyślany przy tak dużej liczbie dyskutowanych wyników badań. Należy podkreślić, że w Dyskusji Doktorant szczegółowo omówił uzyskane wyniki na tle dostępnych pozycji literaturowych. Jednak zabrakło mi w dyskusji i podsumowaniu nawiązania do przekazywania poinfekcyjnych sygnałów retrogradowych do jądra komórkowego, co może stanowić ważny element systemu obronnego rośliny-gospodarza.

Podsumowanie

Wysoko pod względem merytorycznym oceniam całą pracę doktorską napisaną przez mgr Tomasza Kopczewskiego. Stwierdzam, że Doktorant w czasie realizacji celów pracy doktorskiej przeanalizował bogatą literaturę (235 pozycji), co wskazuje na dobrą orientację w problematyce badawczej. Otrzymane przez Doktoranta interesujące wyniki powinny zostać opublikowane w specjalistycznych czasopismach naukowych. Pragnę równocześnie podkreślić, że zawarte w recenzji nieliczne uwagi, komentarze i sugestie nie pomniejszają wartości merytorycznej pracy.

Wnioski końcowe

W mojej ocenie rozprawa mgr Tomasza Kopczewskiego spełnia wszystkie wymagania formalne stawiane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i

tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.). Na tej podstawie wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Tomasza Kopczewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę duży nakład pracy Doktoranta ze względu na ilość otrzymanych wyników badań, zastosowanie wielu metod badawczych i nowatorskie podejście związane z poinfekcyjnym przesyłaniem sygnałów retrogradowych w kontekście obrony rośliny-gospodarza wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. Iwona Morkunas