



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, 6 maja 2024

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

Recenzja pracy doktorskiej mgr Andželiki Drozdy

**pt.: „Udział tlenu azotu w epigenetycznej regulacji odporności ziemniaka
(*Solanum tuberosum* L.) na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary”**

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

Uzasadnienie wykonania recenzji

Pismem z dnia 8 marca 2024 roku zostałam poinformowana, że w wyniku głosowania Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu zostałam powołana na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Andželiki Drozdy – studentki Studium Doktoranckiego na Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii (nr albumu 125513). Pismo zostało podpisane przez prof. dr hab. Andrzeja Bleharczyka – przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo. Otrzymałam kopię rozprawy doktorskiej pod tytułem „Udział tlenu azotu w epigenetycznej regulacji odporności ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary”. Otrzymałam ponadto następujące dokumenty: kopię dokumentu potwierdzającego posiadanie tytułu zawodowego magistra, streszczenie rozprawy doktorskiej przygotowane w j. angielskim, pozytywną opinię promotora o rozprawie doktorskiej opinię kierownika studiów doktoranckich o przebiegu kształcenia na Studiach Doktoranckich UPP wraz z informacją o zaliczeniu wszystkich przedmiotów a także wykaz osiągnięć naukowych Doktorantki. Ponadto otrzymałam w formie pisemnej raport z Jednolitego Systemu Antyplagiatowego podpisany przez Panią Promotor. Dokumentom towarzyszył życiorys Doktorantki a także jej kwestionariusz osobowy.

Edukacja i życiorys zawodowy Doktorantki

Zgodnie z przedstawionym życiorysem Kandydatka realizowała studia licencjackie w okresie od października 2013 do września 2016 roku na kierunku Biologia stosowana Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Promotorem pracy licencjackiej był prof. dr hab. Tomasz Pniewski. Pracę tę wykonano w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Tytuł pracy licencjackiej „Badanie reakcji fizjologicznej na stres suszy u sadzonek miskanta otrzymanych w kulturze *in vitro*”.

Studia magisterskie w kierunku Biotechnologia eksperymentalna Kandydatka realizowała na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu. Studia te realizowała od października 2016 r. do lipca 2018 r. Zgodnie z przedstawioną dokumentacją uzyskała dyplom ukończenia studiów drugiego stopnia nr 47151 wydany w Rzeczypospolitej Polskiej przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu. Uzyskała niniejszym kwalifikację pełną na poziomie 7 Polskiej Ramy Kwalifikacyjnej. Obszar kształcenia Kandydatki obejmował nauki przyrodnicze (88%) oraz nauki rolnicze leśne i weterynaryjne (12%). Były to studia stacjonarne ukończone w dniu 6 lipca 2018 r. z wynikiem dobry plus. Dyplom wydał Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu w dniu 13 lipca 2018 r., pod dyplomem podpisali się Rektor UPP prof. dr hab. Jan Pikul a także Dziekan Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, prof. dr hab. Piotr Ślósarz. Kierunek studiów Kandydatki to Biologia, specjalność: Biologia stosowana. Tytuł zawodowy magistra Kandydatka uzyskała na ogólnoakademickim profilu kształcenia. Praca magisterska pani Andżeliki Drozdy wykonana była w Instytucie Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem pana prof. dr hab. Tomasza Pniewskiego jako promotora oraz dr inż. Joanny Ceraży-Waliszewskiej jako opiekuna. Tytuł pracy magisterskiej: “Porównanie potencjału plonotwórczego sadzonek wybranych genotypów miskanta, uzyskanych z rizomów oraz metodą mikropropagacji w I roku uprawy”.

W czasie studiów Kandydatka odbyła praktyki studenckie w IGR PAN w okresie od lipca do września 2014 r. a jej opiekunem był prof. dr hab. Arkadiusz Kosmala. Następnie od października 2017 r. do czerwca 2018 r. była wolontariuszem w Katedrze Fizjologii Roślin na Wydziale Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii UPP w Poznaniu pod opieką prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek, gdzie pomagała w pracach z zakresu epigenetyki roślin. Z kolei po zakończeniu studiów od lipca 2018 r. do sierpnia 2019 r. Kandydatka odbyła staż zawodowy w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie pod opieką prof. dr hab. Jacka Henniga i dr hab. Magdaleny Krzymowskiej, prof. IBB PAN.

Kandydatka na zatem bogate doświadczenie zawodowe w trzech ośrodkach naukowych o dużej renomie co z pewnością przyczyniło się do zwiększenia jej umiejętności w zakresie badań, które tam prowadzono, a jednocześnie częściowo Kandydatka prowadziła samodzielnie w ramach swojej pracy licencjackiej a następnie magisterskiej (IGR PAN).

Studia Doktoranckie kandydatka rozpoczęła w październiku 2018 roku i dotyczyły one zakresu epigenetyki roślin. W tym czasie uczęszczała na zajęcia Studium Doktoranckiego UPP oraz realizowała badania sfinalizowane w ramach rozprawy doktorskiej wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Promotorem pracy była pani prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek. Tytuł rozprawy doktorskiej podano w nagłówku niniejszego dokumentu.

Działalność naukowo-badawcza Doktorantki

W ramach swojej działalności naukowo-badawczej Kandydatka brała udział w projekcie NCN OPUS numer 2017/25/B/NZ9/00905 pod kierunkiem prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek. Projekt dotyczył tlenu azotu jako epigenetycznego mediatora odporności ziemniaka typu ETI. Kandydatka jest autorką trzech publikacji naukowych przy czym w dwóch jest autorką pierwszą. Wszystkie trzy prace wycenione zostały przez MNiSW na 140 punktów. Prace z pierwszym autorstwem opublikowano w *International Journal of Molecular Sciences* (praca z pierwszym autorstwem Kandydatki) oraz *Frontiers in Plant Science* (dwie prace, w tym jedna z pierwszym autorstwem). Wszystkie te prace związane są tematycznie z odpornością ziemniaka na *P. infestans*. Ponadto Doktorantka przedstawiła 8 abstraktów na konferencjach, przy czym w czterech abstraktach była pierwszą Autorką. Są w tym zbiorze konferencje zagraniczne (Grecja, Ukraina Węgry). W trakcie studiów doktoranckich Kandydatka brała udział w XIX i XXII Poznańskim Festiwalu Nauki i Sztuki (w zajęciach organizowanych przez Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu), w konferencji naukowej "Dni Doktoranta 2018" organizowanej przez Samorząd Doktorantów UPP, brała też czynny udział w promocji swojej uczelni w trakcie X i XI edycji Nocy Naukowców na UPP. Doktorantka była członkinią i przedstawicielką doktorantów Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, w Odwoławczej Komisji Stypendialnej na UPP. Doktorantka uczestniczyła w licznych szkoleniach i kursach zarówno w zdobywaniu kompetencji dydaktycznych dotyczących nauczania w języku polskim oraz języku angielskim, jak też kompetencji miękkich, w tym umiejętności społecznych oraz obsłudze programów do prezentacji multimedialnych.

Doktorantka prowadziła także zajęcia dydaktyczne w ramach takich przedmiotów jak: Anatomia i fizjologia roślin, Botanika z elementami fizjologii roślin, Fizjologia roślin drzewiastych, Ekofizjologia roślin, Rośliny w niekorzystnych warunkach środowiska a także Fizjologia zwierząt.

Na podstawie opisu podejmowanych działań sylwetka Doktorantki przedstawia się bardzo korzystnie. Jest to osoba zaangażowana w liczne działania na rzecz społeczności studenckiej i akademickiej, a także wspomaganie prowadzenia zajęć dydaktycznych przy jednoczesnym intensywnym zaangażowaniu w prowadzenie własnych prac badawczych w ramach projektu naukowego i realizacji zadań związanych z uczestnictwem w Studium Doktoranckim. Działania te znalazły uznanie na macierzystej Uczelni w formie stypendiów Rektora UPP przyznawanych Jej w latach 2019-2022.

Opinie przełożonych

Opinia prof. dr hab. Moniki Jakubus – Kierowniczki Studiów Doktoranckich o przebiegu kształcenia Kandydatki jest pozytywna. Doktorantka systematycznie i zgodnie z terminem zaliczała kolejne semestry na poszczególnych latach studiów i realizowała program Studiów Doktoranckich. Poświadczono wzorowy przebieg tego etapu procesu kształcenia a także wysokie (celujące) oceny uzyskiwane podczas Studiów Doktoranckich. Oznacza to spełnienie kryterium umożliwiającego kontynuację postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. W opinii promotora - prof. dr hab. Jolanty Floryszak-Wieczorek Kandydatka zaangażowana była w pracę o niewątpliwym nowatorstwie i z powodzeniem opanowała wiele najnowszych technik biologii molekularnej. Zdaniem Pani Promotor publikacje Doktorantki spełniają zarówno formalne jak i merytoryczne wymogi stawiane pracom doktorskim.

Analiza oryginalności pracy w Jednolitym Systemie Antyplagiatowym

Analiza prowadzona w JSA zakończyła się protokołem kontroli oraz Rozszerzonym Raportem Podobieństwa wygenerowanym przez ten system. Na podstawie tej analizy Pani Promotor pracy stwierdziła, iż wykazane zapożyczenia nie noszą znamion plagiatu lecz wynikają z użycia sformułowań powszechnie stosowanych w obrębie dyscypliny naukowej dla jednoznacznego i precyzyjnego opisu stosowanych procedur naukowych, zaś w niektórych przypadkach są uprawnionymi cytatami takimi jak wykaz piśmiennictwa. Analiza w JSA nie wykryła nadmiernej ilości zapożyczeń ani też kopii tekstów noszących znamiona plagiatu. Na podstawie opinii promotora można zatem stwierdzić, iż praca jest oryginalna i może być procedowana bez przeszkód.

Finansowanie badań

Pracę wykonano w ramach projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki 2017/25/B/NZ9/00905 pt.: „Tlenek azotu jako epigenetyczny mediator odporności ziemniaka typu ETI” realizowanego w latach 2018-2023.

Ocena układu rozprawy doktorskiej

Przedłożona rozprawa doktorska to dwie anglojęzyczne publikacje, w których Doktorantka jest pierwszą autorką. W obu pracach jej udział był wiodący. Praca rozpoczyna się streszczeniem rozprawy w języku polskim a następnie w języku angielskim. W kolejności znajduje się wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora. Po Wprowadzeniu obejmującym 10 stron następuje hipoteza badawcza oraz opis celu pracy. W kolejności Doktorantka przedstawia Materiał i metody z podziałem na materiał roślinny, materiał infekcyjny, mikrorozmnażanie ziemniaka w kulturach *in vitro*, pasażowanie kultur patogenu i przygotowanie zawiesiny zarodników a także traktowanie roślin różnego rodzaju substancjami z których każda opisana jest w oddzielnym rozdziale. Kolejną część pracy stanowi opis stosowanych metod analitycznych. Po nich następuje opis zadań badawczych oraz wyniki i ich omówienie, dyskusja w języku polskim, wnioski, podsumowanie, spis literatury i aneks. Wszystkie te części pracy łącznie obejmują 76 stron. Po nich Doktorantka przedstawiła wykaz swojego dorobku naukowego oraz włączyła pełne kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Po nich następują oświadczenia współautorów.

Zgodnie z oświadczeniami zarówno Doktorantki jak i współautorów udział Doktorantki w tych pracach jest wiodący i wynosi średnio 55%, wahając się do 54% (publikacja 1) do 56% (publikacja 2). Przedłożono oświadczenia Doktorantki oraz współautorów wskazujące na procent wkładu wszystkich współautorów a także opisujące czynności które związane były z przygotowaniem badań oraz manuskryptu przez każdą z tych osób.

Publikacja 1:

Drozda A., Kurpisz B., Arasimowicz-Jelonek M., Kuźnicki D, Jagodzick P., Guan Y., Floryszak- Wieczorek J. (2022). Nitric oxide implication in potato immunity to *Phytophthora infestans* via modifications of histone H3/H4 methylation patterns on defense genes. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 4051.

W tej pracy Doktorantka deklaruje wkład wynoszący 54%. Prace przez nią wykonane polegały na mikrorozmnażaniu w kulturach *in vitro* oraz prowadzeniu uprawy ziemniaka, prowadzenie kultur patogenu i przygotowanie zawiesiny zarodników, traktowanie liści ziemniaka donorem i zmiataczem tlenu azotu, roztworem inhibitora PRMT5 oraz inokulację zarodnikami *P. infestans*. Doktorantka analizowała ekspresję kluczowych genów trzech typów strategii obronnej, brała udział w analizie ekspresji genu odporności R3a prowadzonej metodą RT-qPCR, oznaczała aktywności białka metylotransferazy argininy po zastosowaniu w/w inhibitora (test ELISA), analizowała wpływ tego inhibitora na rozwój infekcji i ekspresję dwóch badanych genów biorących udział w reakcjach obronnych. Ponadto brała udział w analizie immunoprecypitacji chromatyny (ChiP-qPCR) liści ziemniaka wyprowadzonych z kultur *in vitro* oraz analizie Western blot liści ziemniaka potraktowanych inhibitorem PRMT5. Doktorantka brała także aktywny udział w analizie statystycznej wyników oraz uczestniczyła w ich interpretacji oraz przygotowaniu manuskryptu. Oświadczenia współautorów zgodne są z przedstawionym opisem a deklarowany przez nich procentowy udział w pracy nie przekracza 46%.

Publikacja 2:

Drozda A., Kurpisz B., Guan Y., Arasimowicz-Jelonek M., Pilch J., Jagodzick P., Kuźnicki D, Floryszak-Wieczorek J. (2022). Insights into the expression of DNA (de)methylation genes responsive to nitric oxide signaling in potato resistance to late blight disease. *Frontiers in Plant Science* 13, 1033699.

Doktorantka zadeklarowała wkład w tę pracę wynoszący 56%. Zgodnie z oświadczeniami współautorów ich łączny wkład wynosi 44%. W tej pracy udział Doktorantki obejmował – jak w poprzedniej pracy: mikrorozmnażanie w kulturach *in vitro* oraz prowadzenie uprawy ziemniaka a także prowadzenie kultur patogenu, przygotowanie zawiesiny zarodników i inokulację liści zarodnikami patogenu. Tym razem liście ziemniaka Doktorantka traktowała donorem i zmiataczem tlenu azotu oraz nadtlenuazotynu. W pracy wykonała ocenę całkowitej metylacji DNA w dwóch odmianach ziemniaka (test ELISA), a następnie metodą RT-qPCR wykonała analizę ekspresji wszystkich genów związanych z (de)metylacją histonów i DNA. Uczestniczyła w detekcji tlenu azotu na analizatorze chemiluminescencyjnym oraz w analizie ekspresji genów odporności typu R a także mikroRNA. Doktorantka brała udział w analizie immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) liści ziemniaka wyprowadzonych z kultur *in vitro* oraz analizie nitrowania hydrolazy SAHH w liściach ziemniaka. Udział Doktorantki w przygotowaniu manuskryptu polegał na analizie statystycznej wyników oraz ich interpretacji a następnie przygotowaniu tekstu.

W obu pracach punktacja MNiSW jest taka sama i wynosi 140 punktów, identyczny jest też współczynnik wpływu Impact Factor wynoszący 5,6 a zatem sumarycznie 11,2. Wymienione czasopisma są cenione w środowisku naukowym a punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego odpowiada ich wysokiej randze.

Struktura pracy doktorskiej jest poprawna. Praca zawiera nie tylko wykaz publikacji, ich pełne kopie oraz szczegółowe oświadczenia współautorów ale także obszerne wprowadzenie, przedstawienie celu pracy i hipotezy badawczej, materiałów i metod, wyniki i ich dyskusję oraz wnioski i spis literatury, a zatem wszystkie elementy tradycyjnie umieszczane w pracach doktorskich. Streszczenia dobrze oddają treść znajdującą się w pracy a wersja anglojęzyczna odpowiada wersji polskojęzycznej. Pod każdą z nich Doktorantka umieściła te same, odpowiednio dobrane słowa kluczowe. Praca napisana jest poprawnym językiem i bez błędów, nie zawiera żargonu naukowego ani określeń z języka potocznego.

Podsumowując, pod względem formalnym nie mam najmniejszych zastrzeżeń co do struktury i zawartości pracy. Załączone w ramach rozprawy doktorskiej publikacje naukowe opublikowano w uznanych czasopismach, udział Doktorantki jest dominujący, uczestniczyła ona we wszystkich etapach badań i w przygotowaniu manuskryptu, a oświadczenia podpisane w celu zebrania publikacji do rozprawy doktorskiej znajdują pełne pokrycie w opisach udziału w publikacjach.

Tematyka badawcza

W pracy podjęto oryginalną i nowatorską tematykę mającą na celu poznanie wpływu tlenku azotu (NO) na odporność liści ziemniaka na zarazę powodowaną przez *Phytophthora infestans*. Zważywszy na kluczową rolę ziemniaka w uprawach rolniczych na świecie wynoszącą około 20 milionów hektarów oraz jego olbrzymią produkcję w celach konsumpcyjnych, paszowych i technicznych zagadnienie dotyczące podstaw mechanizmów odporności na jedną z głównych chorób tej uprawy i jawi się jako temat niezwykle istotny. Choroba powoduje znaczne straty ilości i jakości zebranego plonu. Przy stale i dramatycznie rosnącej populacji ludzi poprawianie wydajności upraw ziemniaka jest odpowiedzią na wyzwania związane z bezpieczeństwem żywnościowym. W tym względzie istotne jest rozpoznanie mechanizmów odporności na choroby. Liczne procesy fizjologiczne w tym także te które związane są z procesem patogenezы zależą w znacznej mierze od cząsteczek sygnałnych, wśród których ważną rolę zajmuje tlenek azotu. Jego udział w epigenetycznej regulacji odporności ziemniaka na zarazę nie jest znany.

W ekspresji genów biorących udział w odpowiedzi na stres biotyczny ważna jest dostępność chromatyny dla czynników transkrypcyjnych a zatem regulacja i deregulacja epigenetyczna. W tym względzie informacje dotyczące potencjalnego udziału tlenu azotu w ekspresji tych genów stanowią ważny problem teoretyczny a także aspekt praktyczny związany z mechanizmem odporności. Problem poruszany w rozprawie doktorskiej jest istotny. Metody analityczne stosowane do weryfikacji przyjętej hipotezy były trudne warsztatowo. **Podjęta tematyka badawcza jest zatem istotna z wielu względów a rozwiązywany problem teoretyczny w swoim nowatorskim ujęciu może stanowić podstawę dysertacji, której celem jest uzyskanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych i ogrodniczych.**

Merytoryczna ocena pracy

Wprowadzenie

We wprowadzeniu Doktorantka zapoznaje czytelników z rolą ziemniaka na świecie oraz możliwościami zwiększenia jego plonowania. Kolejnym omawianym tematem są mechanizmy obronne roślin w odpowiedzi na ich porażenie przez patogeny. W tym względzie Kandydatka pokrótce opisała wzorce molekularne związane z patogenami począwszy od ich wykrycia poprzez mechanizmy obronne u roślin. W kolejności opisała mechanizmy stwierdzone w dzikich genotypach *Solanum* omówiła odporność warunkowaną genami R, a także możliwość ich przełamania przez patogen *P. infestans* wywołujący zarazę ziemniaka. Kolejnym elementem wprowadzenia jest opis tlenu azotu jako bioaktywnej molekuly sygnałowej zaangażowanej w procesy fizjologiczne oraz reakcje roślin w odpowiedzi na patogeny. Ta część pracy opisana jest bardzo szczegółowo z powołaniem na liczną literaturę badawczą. Opis skupia się przede wszystkim na tlenu azotu ale nie pomija innych cząsteczek spełniających podobną rolę. Cytacje literaturowe odnoszą się w bardzo dużej mierze do prac zespołu w którym działała Doktorantka. Ważnym elementem pracy są mechanizmy epigenetyczne w związku z czym Doktorantka opisała procesy metylacji histonów, DNA oraz szlak metylacji DNA zależny od RNA (RdDM). Ważny element pracy dotyczy zrozumienia potencjalnego wpływu tlenu azotu na aktywność genów R poprzez regulację tego szlaku. W kolejności, Doktorantka skupia się w swoim opisie na metylacji białka argininy poprzez metylotransferazy PRMT z których jedna katalizuje symetryczną dimetylację na histonie H4. Ten opis pozwala czytelnikowi zrozumieć poszczególne elementy prac badawczych realizowanych przez Doktorantkę. Doktorantka przytacza informacje dotyczące określonego wzoru metylacji który może działać jako ważny element

systemu immunologicznego ziemniaka ściśle związanego z innymi zmianami epigenetycznymi takimi jak metylacja DNA, zarówno w postaci wzrostu całkowitej metylacji DNA jak i hipometylacji w promotorze genu R, który może zostać przekazany następnemu pokoleniu roślin. We wprowadzeniu opisany jest także mechanizm regulowania ekspresji genów R poprzez małe interferujące RNA oraz mikro RNA. Doktorantka wyjaśnia, że miRNA mogą przemieszczać się na znaczne odległości w obrębie rośliny dzięki czemu mogą ograniczać aktywność R genów, przy czym uruchomienie tego mechanizmu w dużej mierze zależy od gatunku rośliny. Doktorantka zwraca też uwagę czytelników na fakt, iż aktywacja ekspresji niektórych genów obronnych nie musi wynikać bezpośrednio z tych mechanizmów lecz wynika z nich pośrednio poprzez zależne od metylacji zmiany w sieci transkrypcyjnej lub kontroli procesu metylacji.

Przy braku wiedzy dotyczącej fizjologicznych konsekwencji działania tlenu azotu w odniesieniu do stanu metylacji DNA w warunkach porażenia ziemniaka przez *P. infestans* wywołującego zarazę, Doktorantka uznała konieczność kontynuacji badań w tym zakresie. Doktorantka objaśnia że jej zainteresowanie potencjalnym wpływem tlenu azotu na modyfikację aktywności genów odporności typu R mającym podłoże epigenetyczne wynika z potrzeby poznania czy (i w jakim zakresie) uruchomione są te geny po rozpoznaniu patogenu przez roślinę. Celem tych badań było stwierdzenie czy tlenek azotu działa w relacji do genów R u ziemniaka oraz czy te interakcje mają podłoże epigenetyczne.

W mojej opinii zdecydowanie lepiej czytałoby się ów rozdział, gdyby podzielony był na podrozdziały a poszczególne elementy opisu nie mieszały by się ze sobą. Pomógłby także schemat pokazujący jakie elementy są już znane i na którym etapie tego schematu skupia się Doktorantka. We wprowadzeniu znajdują się bardzo liczne informacje na temat genów, enzymów i innych białek oraz skróty dotyczące poszczególnych ścieżek fizjologicznych. Zazwyczaj w takiej sytuacji w pracy umieszczany jest słownik skrótów, którego w tym przypadku zabrakło. Ponadto we wstępie pracy zdecydowanie zabrakło części fitopatologicznej tj. opisu patogenu i sposobów jego działania, jego zróżnicowania oraz szkodliwości. Praca dotyczy mechanizmów odporności, które w dużej części koewoluowały w roślinach wraz z ewolucją patogenu, stąd moje zdziwienie jako fitopatologa, że te elementy opisu zostały prawie zupełnie pominięte. W pracy realizowanej w Katedrze Fizjologii Roślin zrozumiałe jest skupienie się na tym kierunku opisu. Z mojej perspektywy do pełnego wprowadzenia czytelnika w świat odporności ziemniaka na stesy biotyczne brakuje listy i charakterystyki genów odporności, zwłaszcza, że unikalny materiał z tymi genami badany był w niniejszej pracy.

Nie umniejsza to bardzo wysokiej wartości naukowej wstępu, dobrze wprowadzającego w temat badań związanych z fizjologią roślin. Odpowiednio napisane wstępy znajdują się ponadto w Publikacjach 1 i 2 stanowiących główny trzon dysertacji doktorskiej. Wprowadzenie napisane jest bardzo ciekawie i objaśnione szczegółowo oraz odnoszone do starszej a także najnowszej literatury naukowej. Ten rozdział wskazuje na głęboką znajomość tematu oraz swobodne poruszanie się Doktorantki w badanym zagadnieniu. Rozdział ten napisany jest czytelnie, prawidłowym językiem, bez żargonu naukowego.

W trakcie obrony pracy doktorskiej proszę o informacje na temat patogenu (we Wstępie) oraz listy i ogólnej charakterystyki genów odporności wykorzystywanych historycznie i obecnie w hodowli ziemniaka oraz w niniejszej pracy.

Cel badań i hipoteza badawcza

Doktorantka podaje że nadrzędnym celem jej pracy była identyfikacja oraz funkcjonalna analiza biomolekuł modyfikowanych przez tlenek azotu o istotnym wpływie na aranżację chromatyny i ekspresję genów związanych z odpornością. W tym przypadku brakuje zarówno nazwy badanego gatunku roślin a także informacji o jaką odporność chodzi. Nie wspomniano nawet czy jest to odporność na stres abiotyczny czy biotyczny. Sformułowanie celu pracy powinno być obszerniejsze i bardziej precyzyjne. Dobrą praktyką jest podanie celu ogólnego oraz celów szczegółowych, których zrealizowanie składa się na wypełnienie głównego celu pracy.

Hipoteza badawcza jest ambitna jednak także określona dość enigmatycznie. Autorka nie precyzuje jaki rodzaj epigenetycznej kontroli odporności ma na myśli, ani nie precyzuje genów, których będzie dotyczyła praca. Jest to jednak o tyle zrozumiałe że hipoteza jest śmiała a badania są nowatorskie; w związku z tym w pracy poruszono wszystkie główne rodzaje epigenetycznej kontroli odporności. Uważam że lepiej byłoby wspomnieć o wirulencji patogenu zamiast podania skrótu *avr*.

Czy w trakcie obrony Doktorantka mogłaby bliżej i obszerniej opisać cel pracy z podziałem na cel główny i cele szczegółowe i nazwać etapy zmierzające do jego osiągnięcia? W tym miejscu można było przedstawić uproszczone opisy przedstawione w podrozdziale 5 (Zadania badawcze). Rozumiem, że oddzielenie hipotezy i celu pracy od zadań badawczych spowodowane było potrzebą objaśnienia materiałów i metod pracy.

Doktorantka postawiła sobie ambitne cele, których realizacja możliwa była wyłącznie poprzez wykorzystanie nowoczesnych narzędzi badawczych z zakresu fitopatologii i fizjologii roślin, genetyki, biologii molekularnej, statystyki matematycznej i wykorzystania narzędzi bioinformatycznych.

Materiały i metody

Materiał roślinny stanowiły dwa genotypy ziemniaka charakteryzujące się wysokim stopniem odporności na *P. infestans*, warunkowanej w odmienny sposób, a mianowicie poprzez piramidyzację genów R w obrębie jednej odmiany a także unikalny gen odporności R.

Czy zdjęcie przedstawione w tym podrozdziale na Rycinie 1 pochodzi z pracy Osowski i in. 2016 czy też jest to zdjęcie własnego autorstwa? Nie jest to doprecyzowane, choć powinno.

Zamiast symptomy proponuję posługiwać się polskojęzycznym określeniem objawy.

Materiał infekcyjny to trzy izolaty patogenu *P. infestans* z kolekcji IHAR. Geny awirulencji opisywane są w literaturze literami *Avr*, w odróżnieniu od wirulencji opisywanej *avr*. Świadczy o tym choćby nazwa kodowanych białek efektorowych na przykład *AvrR3a*, związanych z odpornością typu ETI. Z tego względu opis izolatu MP946, który jest awirulentny a opisany literami *avr* uważam za niepoprawny. Czy tak jest w istocie czy też nazewnictwo związane z badaniami ziemniaka jest inne od tego który znam z literatury i badań własnych (na innych patogenach i ich roślinach żywicielskich)?

W związku z opisem mikrorozmnażania ziemniaka mam pytanie czy stosowano klasyczne pożywki opisane przez Murashige i Skooga (1962)? Wszelkie dodatki odbiegające od opisu powinny być wymienione. Charakterystyka warunków wzrostu roślin ziemniaka w komorze vegetacyjnej opisana jest bardzo szczegółowo i poprawnie. Dodatkowa pochwała za wysokiej jakości ilustracje. Ziemniaki przed zastosowaniem inokulacji były w bardzo dobrej kondycji co wskazuje, że badania dotyczyły rzeczywiście tego stresu który był celem eksperymentu a nie innych stresów wynikających z zaniedbań związanych z nieodpowiednimi warunkami wzrostu lub mineralnego żywienia roślin.

Uzyskanie materiału infekcyjnego i inokulacja roślin

Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie co to jest pożywka groszkowa, jaki jest jej skład, sposób przygotowania i kto ją pierwszy opisał? Te dane powinny znaleźć się w metodycznej części pracy. Dlaczego patogen dobrze czuje się na pożywce z groszku a nie na pożywce z ziemniaka, takiej jak na przykład standardowa pożywka PDA?

Filterków z porami o oczkach 40 mikrometrów nie nazwałabym sitem.

Dlaczego obliczano stężenie zarodni a nie zarodników (str. 29)? Jakie było stężenie zoospor?

Przy traktowaniu liści ziemniaka roztworami donorów i zmiataczy tlenu azotu oraz nadtlenoazotynu nie ma objaśnień skrótów nazw roztworów ani objaśnienia dotyczącego różnic w stężeniach tych związków. Bardzo dobrze, że wyjaśnienie takie podano przy opisie traktowania liści roztworem inhibitora PRMT5.

Stosowane metody analityczne i statystyczne

W pracy zastosowano dość nietypowy zabieg umieszczenia podstawowych elementów pracy w formie tabeli (Tabela 2, str. 33-34). Zamieszczenie publikacji z pełnym opisem metodycznym uprawniło doktorantkę do takiego rozwiązania niemniej jednak bardziej szczegółowe opisy ORAZ dodatkowe umieszczenie podstawowych elementów badań w formie tabeli umożliwiłoby szczegółowszy wgląd w zastosowane metody bez potrzeby odwoływania się każdorazowo do określonej publikacji. Pod tabelą nie ma żadnych objaśnień a w pracy nie ma tabeli skrótów w związku z czym niemożliwe jest odczytanie zawartości Tabeli 2 bez poszukiwania informacji w treści pracy. Tymczasem tabela powinna być w pełni zrozumiała bez czytania tekstu. Ponadto umieszczenie jej na dwóch stronach bez powtórzenia nagłówek na drugiej stronie (str. 34) dodatkowo komplikuje korzystanie z tej Tabeli.

Jakie metody statystyczne stosowano? Wbrew tytułowi podrozdziału na str. 32 w wyżej opisaney Tabeli 2 nie odniesiono się w żadnym z zapisów do zastosowanych metod statystycznych.

Nie mam zastrzeżeń co do stosowanych metod badawczych lecz ich opisy mogły by być obszerniejsze. Szkoda, że są zawarte wyłącznie w publikacjach, bez obszernego opisu w języku polskim.

Wyniki i ich dyskusja

Przeprowadzone badania podzielono na pięć etapów, w tym:

1. ocenę generowania tlenu azotu;
2. analizę ekspresji kluczowych genów strategii obronnej oraz genów odporności R;
3. oznaczenie pośredniego wpływu tlenu azotu na procesy (de)metylacji histonów; ten etap badań obejmował ocenę ekspresji metylotransferaz lizyny histonu H3 oraz metylotransferazy argininy histonu H4;
4. oznaczenie pośredniego wpływu tlenu azotu na metylację DNA (*de novo*)
5. oznaczenie wpływu tlenu azotu na zmianę wzorca metylacji chromatyny biorąc pod uwagę zarówno histony jak też DNA.

Każdy z tych etapów składał się z pod-etapów odpowiednich do każdego z zadań. Prace zostały zaplanowane logicznie oraz w odpowiedniej kolejności a użyty materiał dawał szansę na sprawdzenie przyjętej hipotezy badawczej.

W Publikacji 1 wykazano że po infekcji odpornej odmiany ziemniaka przez *P. infestans* początkowo intensywnie syntetyzowany był tlenek azotu (3 hpi) a następnie po sześciu godzinach stężenie tego związku w roślinie spadało by ponownie wzrosnąć po 24-48 godzinach po infekcji (hpi). Doktorantka określiła to dwufazowym generowaniem tlenu azotu. Poziom tlenu azotu ulegał okresowemu obniżeniu z powodu czasowego wzrostu aktywności enzymu GSNOR (3 hpi). Tymczasem podstawowe geny obronne a także gen *R3a* osiągały najwyższy poziom ekspresji w 6 hpi, a aktywność genu *PR1* regulowana przez *NPR1* wzrastała w 24 hpi. Transkrypcja genów metylotransferaz lizynowych następowała dopiero w okresie 6-24 hpi. Wykazano, że zarówno patogen jak i donor tlenu azotu wpływał na wzrost ekspresji *PRMT5* co następowało szczególnie 6-24 hpi, jednak nie stwierdzono korelacji czasowej między zmianami ekspresji tego genu a aktywnością kodowanego przezeń białka *PRMT5*. Doktorantka stwierdziła nawet że wzrostowi ekspresji genu *PRMT5* w 6 hpi nie towarzyszyły zmiany w aktywności a nawet odnotowała spadek aktywności białka *PRMT5*. Jak Doktorantka tłumaczy to zjawisko?

Inhibitor *PRMT5* znacznie ograniczał ekspresję genów odporności, osłabiał reakcję nadwrażliwości i wiązał się ze znacznym wzrostem biomasy patogenu. Taki wynik upoważnia do wyciągnięcia wniosku o istotnej roli *PRMT5* w odporności liści ziemniaka na zarazę. Dlaczego gen odporności *HSR203J* silniej reagował na inhibicję z zastosowaniem *PRMT5* (Rycina 16D)?

Wyniki testu TUNEL na Rycinie 16E nie są dobrze widoczne na wydruku.

Na podstawie przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała istnienie pośredniego związku pomiędzy spadkiem generowania tlenu azotu a epigenetyczną modyfikacją ekspresji genów strategii obronnej oraz genu odporności *R3a*. Ponadto Doktorantka udokumentowała związek pomiędzy procesami metylacji histonów H3 i H4.

W Publikacji nr 2 stwierdzono około dwukrotny wzrost poziomu metylacji DNA po inokulacji obu genotypów ziemniaka. Podobny wzrost dotyczył transkrypcji metylotransferazy histonowej i metylotransferazy DNA tuż po infekcji. Ważny komponent cyklu metylacji (tyrozyna SAHH) była silnie nitrowana w odpowiedzi na *P. infestans*. Po pierwszych trzech godzinach po inokulacji ekspresja genów *DCL3* i *AGO4* silnie rosła (geny szlaku RdDM).

Doktorantka wykazała także pośredni wpływ tlenu azotu na ekspresję wybranych mikroRNA (*miR482e*) związanych z regulacją ekspresji genów odporności typu R. W obu odpornych odmianach ziemniaka Doktorantka wykazała zaangażowanie szlaku metylacji DNA zależnego od RNA (RdDM). Wzrost aktywności genu *R3a* sprzyjał odporności ziemniaka na zarazę powodowaną przez *P. infestans*.

Wymienione badania ilustrowane są rycinami z opisem statystycznym w postaci wykazania różnic pomiędzy poszczególnymi wartościami obliczeń względnej ekspresji danego genu liczonej jako -krotność jego ekspresji. Nie objaśniono na rycinach na jakim poziomie istotności wykazywane są różnice statystycznie istotne; zapewne istotności były standardowe, niemniej powinny być co najmniej raz opisane. Dyskusja wyników badań poprowadzona jest prawidłowo i rozpoczyna się od najważniejszego wyniku uzyskanego przez Doktorantkę a następnie jego omówienia na tle badań wykonywanych przez inne zespoły naukowe. Doktorantka odnosi się do wszystkich etapów pracy najpierw podając wyniki własne a następnie wyniki uzyskane przez innych autorów.

Wnioski i podsumowanie wyników

Doktorantka w dziewięciu punktach przedstawia wnioski z wykonanej przez siebie pracy. Niektóre z nich stanowią raczej podsumowanie wyników np. wniosek 7. Odnotowuję to jednak z kronikarskiego obowiązku bowiem zależności wykazane przez Doktorantkę stanowią ważny element dokumentacji nowej funkcji sygnałowej tlenu azotu jako pośredniego regulatora metylacji histonów i DNA. Niezwykle cennym elementem pracy jest opracowanie schematu przedstawiającego wpływ dwufazowego generowania tlenu azotu na geny regulujące (de)metylację DNA. Na schemacie przedstawiona jest oś czasowa przedstawiająca godziny po inokulacji 1-6 hpi oraz zmiany zachodzące w ekspresji genów a także miRNA aktywnych w odpowiedzi na porażenie przez *P. infestans*. Na schemacie w czytelny sposób przedstawiono zależności pomiędzy poszczególnymi elementami ekspresji genów skutkującymi wytworzeniem określonych reakcji obronnych.

Spis literatury

Spis ten obejmuje 15 stron pozycji literaturowych po około 11 na stronę co daje ok 165 publikacji wydanych najczęściej po roku 2000. Zdecydowana większość prac to publikacje w języku angielskim. Spis literatury przygotowany jest bardzo starannie a wszystkie prace cytowane są według tego samego wzoru

Wniosek końcowy

Oceniana dysertacja doktorska pani mgr Andżeliki Drozdy składająca się z dwóch publikacji we współautorstwie lecz z wyraźnie dominującym udziałem Doktorantki jako pierwszej autorki (wycenianej na średnio 55% udziału) stanowi rozwiązanie problemu naukowego. Praca zawiera obszerne wprowadzenie i opis metodyczny. Celem pracy było wyjaśnienie wpływu tlenu azotu na odporność liści ziemniaka na zarazę a także poznanie relacji tlenu azotu do epigenetycznego podłoża regulacji odporności ziemniaka na wspomniany stres biotyczny. W pracy tej wpływ tlenu azotu omawiany jest w aspekcie wpływu na ekspresję genów R oraz genów strategii obronnej związanej z mechanizmem metylacji histonów i metylacji DNA kierowanej przez RNA (RdDM). Doktorantka jest drugą osobą na świecie która prowadziła pracę na temat pośredniego wpływu tlenu azotu na metylację DNA, przy czym wcześniej prowadzone badania opublikowano w 2021 roku, a zatem jedynie dwa lata przed dwoma publikacjami które stanowią przedmiot niniejszej dysertacji. Wyniki poprzedników i prac opublikowanych z pierwszym autorstwem pani mgr Andżeliki Drozdy są spójne i wskazują na nową funkcję sygnałową tlenu azotu jako regulatora metylacji histonów i DNA. Nie mam najmniejszych wątpliwości co do **pozytywnego zarekomendowania tej pracy doktorskiej Radzie Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu**. Jednoznacznie stwierdzam że rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a także dobrze prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w zakresie dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo. Pani mgr Andżelika Drozda spełnia wymagania określone w artykule 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (tekst jednolity Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późniejszymi zmianami). Jednocześnie z uwagi na wyjątkowo wysoką wartość merytoryczną pracy, oryginalną hipotezę badawczą oraz wykorzystanie najnowszych technik biologii molekularnej w celu jej potwierdzenia **wniosuję do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo UPP w Poznaniu o wyróżnienie pracy**. Pani mgr Andżelika Drozda jest zdolną młodą badaczką z szerokim zakresem wiedzy w szeroko pojętym obszarze nauk rolniczych, a jej wiedza teoretyczna i umiejętności prowadzenia pracy eksperymentalnych są imponujące. Przygotowana rozprawa doktorska jest niezwykle starannie opracowanym dokumentem. Opisane badania opublikowano w 2023 roku w dwóch renomowanych czasopismach naukowych.



Małgorzata Jędryczka