

Prof. dr hab. Andrzej Skoczowski  
Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN  
Ul. Niezapominajek 21  
30-239 Kraków  
Tel. 501 22 60 73

Kraków, 07.04.2020 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Macieja Jerzego Bernackiego**

**pt.: „Biotechnologiczne aspekty śmierci komórki zależnej od białek LSD1, EDS1 i PAD4 u *Populus tremula x tremuloides* oraz *Arabidopsis thaliana*”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Mariusza Karpińskiego.**

Przedstawiona do oceny praca doktorska oparta jest o cykl trzech artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych z listy JCR (*Plants*, *Journal of Plant Physiology* oraz *Physiologia Plantarum*) o współczynnikach wpływu (IF), odpowiednio, 2,632; 2,825 oraz 3,000. Pierwsza z prac ma charakter przeglądowy natomiast dwie pozostałe to tzw. oryginalne prace naukowe. Nie mam żadnych zastrzeżeń do tak prezentowanego dorobku, bowiem wchodząca w skład dysertacji praca przeglądowa stanowi odpowiednik przeglądu piśmiennictwa w klasycznej pracy doktorskiej tyle tylko, że jako opublikowana już praca ma znacznie większą rangę.

Z obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że dane trzeciego artykułu podane na liście publikacji są niekompletne – brak numeru zeszytu i numerów stron. Nie ma też podanego procentowego udziału Doktoranta przy powstawaniu przedstawionych publikacji. Udział ten można sobie wyliczyć na podstawie dołączonych do autoreferatu oświadczeń współautorów, ale byłoby bardziej elegancko, gdyby Doktorant policzył to sam. I znowu z obowiązku recenzenta muszę zauważyć, że oświadczenia współautorów dotyczące artykułu drugiego znajdują się w złączniku na pierwszej pozycji, trzeciego na drugiej, a pierwszego na trzeciej. Pewnie bym na to nie zwrócił uwagi, gdyby Doktorant nie zmusił mnie do liczenia swoich udziałów procentowych. Oczywiście uwagi te nie mają charakteru merytorycznego, ale czynię je po to, żeby uświadomić Doktorantowi, że pedantyczne przygotowanie pracy powinno dotyczyć nie tylko jej części *sensu stricto* naukowej.

Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że udział Doktoranta przy powstawaniu kolejnych prac wynosił odpowiednio: **60**, **35** oraz **51%**. Nie mam zastrzeżeń co do tych wartości, poza jedną uwagą kierowaną w najmniejszym stopniu do Doktoranta,

a w większym do Rady Instytutu czy też do innych opiniotwórczych gremiów. Chodzi mianowicie o to, aby wreszcie oświadczenie współautorów prac wykazywanych jako cenzusowe sprowadzało się do stwierdzenia, że udział Doktoranta (lub też habilitanta) w omawianych pracach był znaczący. I tyle! Natomiast informacje o udziale merytorycznym poszczególnych autorów na etapie powstawania pracy znajdują się zawsze w części pracy zatytułowanej „Author Contributions”. A zatem obliczanie udziałów z dokładnością do 1% wg nikomu nieznanym algorytmów, choć oczywiście powszechnie przyjęte jest, moim zdaniem, akceptowane bezkrytycznie.

Ponowne recenzowanie zrecenzowanych już prac jest trudne, bo zważywszy na rangę czasopism zostały już rzetelnie ocenione zarówno przez niezależnych recenzentów jak i edytorów. Skupię się zatem na globalnej ocenie znaczenia i jakości przeprowadzonych badań.

Problematyka prac Doktoranta jest moim zdaniem bardzo ważna z dwóch powodów. Pierwszy to poziom podstawowy, rozszerzający naszą wiedzę na temat roli procesu programowanej śmierci komórki, roli stresu oksydacyjnego w regulacji procesów metabolicznych u roślin i wreszcie, mechanizmów odpowiedzi roślin na ten stres, zresztą nie tylko na poziomie molekularnym. Powód drugi to konieczność poszukiwania sposobów na szybkie doskonalenie odmian roślin uprawnych w obliczu gwałtownych zmian klimatu, o których nikt poważny nie powie, że nie następują. Gwałtowne stepowanie klimatu wymaga szybkiego wprowadzenia do uprawy odmian charakteryzujących się m. in. wysoką efektywnością wykorzystania wody. Szybkie wprowadzenie do uprawy nowych odmian wymaga jednak podania biotechnologii rolniczej narzędzi umożliwiających przyspieszenie żmudnych i czasochłonnych prac hodowlanych. Niezależnie od tego, czy jak napisał Doktorant, liczba ludności w 2050 r. przekroczy 9 miliardów czy też nie, zmiany klimatu spowodują już wcześniej ogromne straty w produkcji rolnej związane z narastającymi stresami bio- i abiotycznymi. W najbliższych kilkudziesięciu latach światu zagraża zatem głód, który złagodzić może m. in. rozwój biotechnologii rolniczej. Czy tak będzie nie wiemy, ale próbować trzeba.

Autoreferat, napisany w języku angielskim, przygotowany został przez Doktoranta bardzo starannie (nie licząc drobnych wpadek, które mu już wypomniałem na samym początku). Jednak tytuł rozprawy trochę mnie zbił z tropu, bo nie bardzo mogłem zrozumieć jak zjawisko programowanej śmierci komórki można wykorzystać w biotechnologii roślin. We wstępie Doktorant wyjaśnia, że białka regulujące proces programowanej śmierci komórki oraz odporność na biotroficzne patogeny regulują także procesy aklimatyzacyjne i obronne w odpowiedzi roślin na różne stresy środowiskowe (abiotyczne i biotyczne). Jeśli zatem białka LSD, EDS1 oraz PAD4 tworzą kompleks zaangażowany w regulację takich molekuł sygnalnych jak kwas salicylowy (SA) oraz reaktywne formy tlenu (RFT), a poprzez regulację homeostazy wyżej wymienionych związków mogą być zaangażowane również w regulację cech użytkowych roślin to tytuł rozprawy powinien być nieco inny. Moim zdaniem Doktorant właściwy tytuł rozprawy zamieścił w pierwszym z prezentowanych w swoim dorobku artykułów: „**Biotechnologiczny potencjał białek LSD, EDS1 oraz PAD4 w poprawianiu wartości użytkowej roślin uprawnych i przemysłowych**”. Doktorant nie badał przecież biotechnologicznych aspektów, zależnej od LSD, EDS1 oraz PAD4, programowanej śmierci komórki. Tak to rozumiem. Jeśli się mylę to proszę Doktoranta o wyjaśnienie, dlaczego moje rozumowanie jest niesłuszne. Jednak niezależnie od tego, że tytuł autoreferatu jest, moim zdaniem niezręczny, nie umniejsza to jakości przeprowadzonych przez Doktoranta badań.

W dobrze napisanym wstępie Doktorant omawia kolejno: definicję i objawy programowanej śmierci komórki; rolę tego procesu w aklimatyzacji do stresów środowiskowych; rolę białek LSD1, EDS1 i PAD4 w regulacji procesu śmierci komórkowej oraz właściwości molekularne ww. białek. Dalej analizuje dane literaturowe wskazujące, że białka LSD1, EDS1 i PAD4 u *Arabidopsis thaliana* tworzą centrum regulacyjne sygnalizacji kwasu salicylowego, etylenu i reaktywnych form tlenu; odgrywają kluczową rolę w reakcji zarówno na stres biotyczny, jak i abiotyczny i wreszcie pokazuje, że białka LSD1, EDS1 i PAD4 są ważne w regulacji kondycji roślin.

W swoich badaniach Doktorant sformułował trzy hipotezy robocze, które poddał testowaniu. W pierwszej z nich przyjął założenie, że rola białka EDS1 w regulacji homeostazy kwasu salicylowego i reaktywnych form tlenu u roślin drzewiastych jest podobna do roli jaką pełni w roślinach zielnych (na przykładzie *Arabidopsis thaliana*), co Jego zdaniem oznacza, że

znacząco wpływa na wydajność fotosyntezy, produkcję biomasy i właściwości ściany komórkowej.

Druga z testowanych hipotez zakładała, że białka LSD1, EDS1 i PAD4, poprzez ich udział w regulacji homeostazy kwasu salicylowego i reaktywnych form tlenu, wpływają na produktywność roślin i ich gospodarkę wodną (tj. efektywność wykorzystania wody), a regulacja ta zależy od warunków wzrostu i czynników stresowych.

I wreszcie hipoteza trzecia, w której Doktorant zakłada, że za pomocą wzorów matematycznych można opisać zależności pomiędzy zawartością cząsteczek sygnalizujących stres, takich jak SA i RFT, a produktywnością roślin.

Badania przeprowadzone zostały na topoli (*Populus tremula x tremuloides* – typ dziki i dwie linie transgeniczne eds1–7 i eds1–12) oraz na *Arabidopsis thaliana* (typie dziki - ekotyp Wassilewskija oraz jego pojedyncze i podwójne mutanty (lsd1, eds1, pad4, eds1/lsd1, i pad4/lsd1). Taki dobór materiału roślinnego uważam za bardzo trafny. Jeśli mówimy bowiem o znaczeniu różnorodności biologicznej dla życia na Ziemi i chcemy tą różnorodność badać to nie wyobrażam sobie, aby można to było robić wyłącznie w oparciu o badania prowadzone na rzodkiewniku pospolitym. Porównanie roślin drzewiastych i zielnych w badanych kwestiach uważam za odważny i znakomity pomysł.

Spektrum zastosowanych w pracy metod dobrano prawidłowo. Obejmuje ono zarówno pomiary kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* oraz wymiany gazowej, ale także szeroko pojęte badania molekularne (tym ilościowy PCR w czasie rzeczywistym) i klasyczne badania biochemiczne (oznaczenia ilości kwasu salicylowego, nadtlenu wodoru czy też aktywności enzymów antyoksydacyjnych).

Nie chcę szczegółowo odnosić się do wszystkich wyników uzyskanych przez Doktoranta, a jedynie do tych, które uważam za szczególnie ważne lub sporne.

Jeśli chodzi o badania dotyczące regulacji fenologicznej u topoli, to uzyskane w tej pracy wyniki (*de facto* trudnych do przecenienia badań także o charakterze podstawowym) były możliwe do uzyskania wyłącznie w naturalnych warunkach. Takich badań na świecie robi się relatywnie niewiele, bo są związane z trudami pracy terenowej. Ja takie badania uważam za najcenniejsze, bo pokazujące prawdziwą, a nie „fitotronową” fizjologię roślin. Do tego

zagadnienia pozwolą sobie jednak powrócić przy omawianiu drugiej pracy Doktoranta. W omawianej pracy pokazano, że drzewa topoli z wyciszonym genem EDS1 wykazały znaczne opóźnienie starzenia się liści w porównaniu z tymi typu dzikiego. Opóźnione starzenie się liści w drzewach transgenicznym z wyciszonym EDS1 może wskazywać, że EDS1 topoli wpływa na programowaną śmierć komórki podobnie jak ortolog *Arabidopsis*. W tym badaniu po raz pierwszy pokazano rolę białka EDS1 w zmianach aparatu fotosyntetycznego zależnych od starzenia się liści. Generalnie można stwierdzić, że Doktorantowi udało się pokazać podobieństwa w tym względzie na poziomie roślin zielnych i drzewiastych. Podsumowując tą część pracy Doktorant napisał, że uzyskane wyniki wskazują na konieczność badania roli genów roślinnych, nie tylko w laboratorium, ale także w warunkach polowych.

Konsekwentnym rozwinięciem tej myśli jest układ doświadczalny zastosowany w Jego kolejnej pracy, wykonanej na *Arabidopsis thaliana*, nad zależną od białek LSD1, EDS1 i PAD4 regulacją produktywności roślin, efektywnością zużycia wody oraz korelacjami pomiędzy tym parametrem, a ilością kwasu salicylowego oraz nadtlenkiem wodoru. W eksperymencie tym rośliny uprawiano w trzech znacząco różnych warunkach wzrostu: stabilnych warunkach laboratoryjnych, warunkach laboratoryjnych z pojedynczym czynnikiem stresowym w postaci naświetlania UV-C oraz w środowisku naturalnym w terenie.

Zanim odniosę się krótko do uzyskanych rezultatów pragnę stwierdzić, że wyniki uzyskane w tej pracy powinny wejść do kanonu wykładów z fizjologii roślin dla studentów biologii starszych roczników, a zwłaszcza dla studentów szkół doktorskich. Nie popełnię też większego błędu, jeśli powiem, że wyniki te powinny być także memento dla wielu młodych pracowników naukowych uważających, że badania z zakresu fizjologii roślin można robić na roślinach rosnących byle gdzie, a często w „warunkach parapetowych”. Figura nr 1 z omawianej pracy, pokazująca różnice w pokroju mutantów *Arabidopsis thaliana* rosnących przez ten sam okres czasu w zróżnicowanych warunkach środowiska powinna być obowiązkowym przezroczem na wykładach na temat wpływ warunków wzrostu na metabolizm roślin. Nie ukrywam, że widząc te wyniki z radością poczułem, że nie tylko ja rozumiem pojęcie tzw. „mutacji fitotronowych”. Nie wchodząc w szczegóły uzyskanych przez Doktoranta danych, krótko mówiąc wykazał on, że w warunkach polowych charakteryzujących się występowaniem tzw. multistresu niektóre mutacje nie mają żadnego znaczenia dla wzrostu i rozwoju roślin.

Innym problemem jest kwestia matematycznego opisu stwierdzonych w tej pracy zależności pomiędzy zawartością  $H_2O_2$  lub kwasu salicylowego w liściach, a współczynnikiem wykorzystania wody (WUE) lub produktywnością roślin *Arabidopsis thaliana* (wyrażoną liczbą nasion na roślinę). W paragrafie 4.3 pt.: „Korelacje między zawartością SA/ROS w tkankach roślinnych a produktywnością roślin” (str. 46) Doktorant nie pierwszy raz używa w tytule określenia ROS, czyli określenia obejmującego wszystkie reaktywne formy tlenu, podczas gdy omawia głównie, lub bierze jako zmienną do modelowania wyłącznie zmiany w zawartości  $H_2O_2$ . Nie robię z tego większego problemu myślę jednak, że byłoby zgrabniej nazywać rzeczy po imieniu, czyli zamiast ROS pisać po prostu  $H_2O_2$ .

Doktorantowi udało się co prawda stworzyć algorytmy matematyczne opisujące ww. zależności tylko, że mam tu kilka uwag.

O ile dobrze pamiętam (jako absolwent chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego), to zmienną zależną odkładamy na osi „y”, a zmienną niezależną na osi „x”. Wynika to ze wzoru na zależność funkcyjną pomiędzy wartościami dwóch zbiorów:  $y = f(x)$ . A zatem w przypadku zależności pokazanych na Fig. 16 (str. 46) i na podstawie zamieszczonego tam równania mogę powiedzieć, że zmiany zawartości  $H_2O_2$  w liściach tłumaczą blisko 94% zmienności parametru WUE ( $R^2=0,938$ ). Niezależnie od mojego stosunku do uniwersalności takich algorytmów (o czym za chwilę) to, z biologicznego punktu widzenia, nie widzę tu żadnych sprzeczności. Gorzej jest natomiast w przypadku danych zamieszczonych na Fig. 17A i B (str. 48), z których wynika, że całkowita zawartość kwasu salicylowego w liściach (A) oraz zawartość  $H_2O_2$  (B) zależy od wielkości plonu wyrażonego w ilości nasion na roślinę. Tego nie rozumiem, bo z biologicznego punktu widzenia nie ma to moim zdaniem sensu, i mam nadzieję, że Doktorant mi to wyjaśni. Nie rozumiem też biologicznego znaczenia przebiegu krzywej opisującej zmiany zawartości kwasu salicylowego od plonu nasion po wartościach ujemnych (Fig. 17A). Co mam przez to rozumieć? Moim zdaniem tylko tyle, że tak wynika z równania regresji wielomianowej.

Żeby było jasne od razu chcę stwierdzić, że nie tylko nie mam nic przeciwko próbom matematycznego opisu zjawisk biologicznych, ale wręcz sam je w swoich badaniach stosowałem. Nawiasem mówiąc pierwszy raz, podobnie jak Doktorant teraz, zastosowałem analizę korelacyjną w biochemii w swojej pracy doktorskiej w 1984 roku, a później

w rozprawie habilitacyjnej. Mam zatem nadzieję, że nie zostaną posądzeni o to, że krytykują, bo nie rozumiem albo dlatego, że nie wiem o co chodzi.

Uważam, że to bardzo dobrze, iż Doktorant takie próby podjął. Z nich zawsze wypływa jakaś dodatkowa i ważna informacja, tak jak w tym przypadku, mówiąca o powiązaniach pomiędzy efektywnością zużycia wody, a zawartością  $H_2O_2$  liściach czy też związkach pomiędzy plonem a zawartością kwasu salicylowego lub  $H_2O_2$  (po wyjaśnieniu moich wątpliwości zasygnalizowanych powyżej). Uważam jednak, że w takich razach jak ten mamy do czynienia ze „studium przypadku”, a nie z tworzeniem uniwersalnych matematycznych modeli pozwalających prognozować plon na podstawie prostych pomiarów.

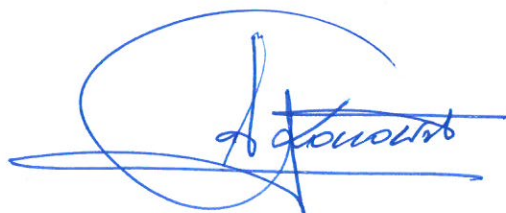
Doktorant dobrze wie (bo przecież pisze o tym w swojej pracy), że rośliny w warunkach naturalnych poddawane są całemu zespołowi różnych czynników stresowych (zarówno abiotycznych jak i biotycznych), których nie będę tu, z oczywistych względów wymieniał. To jedno. Drugie to fakt, że czynniki te występują (w zależności od sezonu wegetacyjnego) nie tylko w różnej sekwencji, ale i z różnym natężeniem. To bardzo ważna i niemożliwa do przewidzenia, zmienna wpływająca na procesy wzrostowo-rozwojowe roślin. Dlatego też chcąc opisać rzetelnie plonowanie roślin, wyniki doświadczeń rolniczych publikuje się najczęściej po trzech, lub lepiej, pięciu latach badań. Co więcej, rośliny uprawne rosną zazwyczaj w łanie, gdzie panują skomplikowane warunki świetlne (niedobór światła niebieskiego oraz stosunek czerwieni do dalekiej czerwieni) które determinują ich odpowiedź na czynniki stresowe (polecam choćby przeglądówkę: *iScience* 22, 441-452, z 2019 roku – pt. „Light Quality Modulates Stress Response in Plants”). I wreszcie na koniec. Proszę sobie uświadomić, że okres wegetacyjny roślin uprawnych to nie jak w przypadku *Arabidopsis thaliana* kilka tygodni tylko najczęściej kilkanaście miesięcy obejmujących, od siewu do zbioru, wszystkie pory roku. A zatem, każda roślina ma niepoliczalną ilość powodów do zmiany składu i ilości tzw. reaktywnych form tlenu czy też innych metabolitów. To uświadamia skalę problemu, z którym przyjdzie się zmierzyć próbując napisać algorytm plonowania. Nawiasem mówiąc jak trudne jest modelowanie i przewidywanie zjawisk biologicznych uświadomiła nam, na nieszczęście, pandemia koronawirusa.

Mam nadzieję, że ta część recenzji stanie się przedmiotem mojej ciekawej wymiany poglądów z Doktorantem, którego przedstawione do oceny osiągnięcia naukowe oceniam generalnie bardzo dobrze.

### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że przedstawiony do oceny cykl trzech prac stanowiących podstawę przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej pt. „**Biotechnologiczne aspekty śmierci komórki zależnej od białek LSD1, EDS1 i PAD4 u *Populus tremula x tremuloides* oraz *Arabidopsis thaliana*”** spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity DZ.U. z 2017 r. poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669).

Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Instytutu Nauk Ogrodniczych Szkoły Głównej Gospodarstw Wiejskiego o dopuszczenie mgr. Macieja Jerzego Bernackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Skoczowski