

Radzików, 27.03.2020.

Recenzent:

Prof. dr hab. Waław Orczyk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Radzików, 05-870 Błonie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Matuszkiewicza pt.:
„Regulatory programowanej śmierci komórki a reakcja rośliny na nicienie
pasożytnicze”

wykonanej pod kierunkiem Profesora dr hab. Marcina Filipeckiego w Katedrze
Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytucie Biologii,
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja doktoratu złożonego z już opublikowanych prac powinna być, siłą rzeczy, zupełnie inna niż recenzja dysertacji, która dopiero będzie publikowana. Tutaj najważniejsze elementy zostały już dopracowane w interakcji z recenzentami a końcowy efekt uznany przez redaktora prowadzącego za spełniający wymogi publikacji w konkretnym czasopiśmie. Oznacza to, że recenzent może już zrezygnować z liczenia stron, opisywania struktury dysertacji czy wyłapywania potknięć językowych. Konsekwentnie, doktorant może być również zwolniony z formułki, że „cenne uwagi itp. będą uwzględnione w opracowaniu wyników do publikacji”. Recenzja doktoratu powinna, razem z obroną, wejść na poziom pogłębionej dyskusji merytorycznej.

Programowana śmierć komórki (PCD) jest nierozłącznym komponentem bardzo wielu procesów rozwojowych roślin. Jest również niezwykle ważnym elementem odpowiedzi rośliny na zagrożenie czynnikami biotycznymi. Mechanizmy obrony przed patogenami lub szkodnikami wykorzystują mechanizm PCD między innymi do lokalizacji infekcji. Aktywacja PCD w regionie bezpośrednio sąsiadującym z infekowaną komórką lokalizuje rozwój patogenów biotroficzných. Obserwowanym efektem jest reakcja nadwrażliwości HR. Molekularny mechanizm regulacji odpowiedzi na infekcję musi bardzo precyzyjnie odróżniać rzeczywisty sygnał od szumu informacyjnego. Gen *LSDI* razem z genami *EDSI* i *PAD4* są ważnymi regulatorami PCD i jednocześnie jednym z ważnych elementów warunkujących precyzję i specyficzność reakcji.

Na dysertację mgr Mateusza Matuszkiewicza składają się trzy opublikowane już współautorskie prace naukowe. W dwóch, opublikowanych we *Frontiers in Plant Science* (IF 4.106, 2018) i *Plant Physiology and Biochemistry* (IF 3.404, 2018), Doktorant jest pierwszym autorem z udziałem oszacowanym na odpowiednio 70%, i 75%. W trzeciej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Protoplasma* (IF 2.633, 2018) jest jednym ze współautorów z udziałem 20%.

W pierwszej publikacji (Matuszkiewicz *et al.*, 2018) badano rolę genów *LSD1*, *LOL1* i *LOL2* negatywnych regulatorów PCD oraz dwóch regulatorów przeciwstawnych *EDS1* i *PAD4*. *LSD1* jest ważnym regulatorem koordynującym liczne szlaki sygnałowe odpowiedzi na **stres oksydacyjny**, będący reakcją komórki na zagrożenia biotyczne i czynniki abiotyczne. Najbardziej charakterystyczną cechą mutantu *lsd1* jest znacznie obniżony próg wyzwalania PCD określanym terminem RCD (Runaway Cell Death). Odpowiednio dobrane tzw. permissywne warunki wzrostu pozwalały utrzymać fenotyp RCD pod kontrolą.

Zastanawiające jest, że ważne elementy interakcji Arabidopsis-mątwik w mutantach *lsd1* zależały od genetycznego tła (ekotypy Ws i Col). Dobrze byłoby wiedzieć czy różne było tylko tło genetyczne czy również same mutacje. Mutacje genu *LSD1* (tj. *lsd1*) uzyskane niezależnie od siebie w różnych genotypach (Ws i Col) mogą mieć inną charakterystykę molekularną. **Czy rzeczywiście tak jest? Jeżeli tak, to czy taka okoliczność nie obciąża wyników porównywania *lsd1* w Ws z *lsd1* w Col?** Może to być ważne pamiętając, że są to niewielkie zmiany ilościowe weryfikowane istotnością statystyczną.

Prosiłbym o komentarz do następującego zestawienia wyników fenotypowania mutantów *lsd1* i analogicznych badań soi.

Pant *et al.* (2015), w pracy niecytowanej przez Doktoranta, badali m.in. rolę ortologa *LSD1* soi (*Gm-LSD1-2*) w odporności/podatności na infestację mątwikiem soi (*Heterodera glycines*). W dużym skrócie, autorzy stwierdzili, że nadekspresja ***Gm-LSD1-2*** soi podatnej na mątwika powodowała wzrost odporności na mątwika i jednocześnie wyciszenie ***Gm-LSD1-2*** w soi odpornej powodowało spadek odporności (silny wzrost infekcyjności).

W badaniach Doktoranta mutanty *lsd1* rzodkiewnika generalnie charakteryzowała silniejsza reakcja obronna. Innymi słowy, *knock-out LSD1* skutkował wyższą odpornością/silniejszą reakcją obronną. Fenotyp mutantów *lsd1* (Ws0) charakteryzował się zgodnie z opisem „zmniejszenie ilości samic i samców żerujących na korzeniach” oraz *lsd1* (Col0) „redukcja wielkości syncytium i żerującej na nim samicy” (dysertacja str. 30 na dole).

Te dwie porcje wyników, uzyskana z badań dwóch różnych gatunków (modelowego rzodkiewnika i uprawnego soi), łączy badanie roli *LSD1* w interakcji korzeni gospodarza z tym samym rodzajem pasożyta. **Uzyskane w jednym i drugim przypadku wyniki zasługują na interpretację i o to prosiłbym Doktoranta.**

Dalsza część publikacji Doktoranta to wyniki analiz transkryptomicznych. W mutantach *lsd1* rzodkiewnika liczba transkryptów regulowanych w czasie infestacji była o 2/3 niższa niż w formie dzikiej. Wynik nie powinien być zaskoczeniem ponieważ *LSD1* jest regulatorem transkrypcji wielu genów a jego brak w mutancie powinien skutkować uboższym zakresem zmian ekspresji w warunkach zagrożenia czynnikiem biotycznym.

Oryginalny wkład doktoranta to i) wyróżnienie 3 grup transkryptów: *LSD1*-zależnych / *LSD1*-niezależnych oraz kompensujących *LSD1* oraz ii) wyróżnienie grupy genów *ATG8* i *MC*, kodujących metakaspazy, związanych odpowiednio z autofagią i degradacją białek. Weryfikowano rolę autofagii w reakcji na mątwika: mutanty *atgf* i *atgh* z wyhamowaną autofagią sprzyjały infestacji (były bardziej podatne na mątwika).

W wyjaśnieniu niektórych mechanizmów odporności bardzo przydatna jest koncepcja genów/białek podatności *S*. Obecności białka *S* gospodarza umożliwia interakcję kompatybilną, natomiast jego zmiana (mutant typu *s*) skutkuje zablokowaniem tej interakcji, fenotypowo odpornością. Tego rodzaju odporność 1) jest cechą dziedziczną recesywnie, 2) jest odpornością szeroką (warunkuje odporność na wiele ras patogena jednego gatunku / patogeny różnych gatunków) oraz 3) jest trwała (warunkująca odporność na nowe formy wirulencji ewoluującego patogena). Znanym przykładem (genu i białka *S*) jest białko błonowe jęczmienia *Mlo*, niezbędne w patogenezie mączniaka (*Blumeria graminis*). Mutacja *mlo* uniemożliwia kolonizację a efektem jest rasowo-niespecyficzna i trwała odporność na mączniaka w jęczmieniu. Podobny efekt fenotypowy opisano dla ortologów *Mlo* w innych gatunkach (Acevedo-Garcia *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

Pytanie problemowe Czy w interakcji roślina-nicień pasożytnicze znane są recesywne geny odporności, potencjalnie spełniające kryteria genów *S*?

Praca druga w kolejności (Matuszkiewicz *et al.*, 2019) jest, moim zdaniem, najbardziej interesująca. Doktorant założył, bardzo słusznie, że warunki eksperymentalne oddziałują na doświadczenie i mogą zmienić obserwacje. Tak postawiona przez Doktoranta hipoteza dotyczyła środowiska gazowego, w szczególności, gazowych regulatorów wzrostu akumulowanych w płytce Petriego i potencjalnie modyfikujących fenotyp. Doktorant zbudował system do rejestracji składu atmosfery, w której rozwijały się siewki rzodkiewnika. Użył dwóch rodzajów materiałów do zaklejania płytek Petriego (nieprzepuszczalnego parafilmu i przepuszczalnej taśmy chirurgicznej), obserwował fenotyp i analizował skład gazów.

Najważniejsze z wyników, które były modyfikowane przez materiał użyty do zaklejenia płytek to: 1) zmieniony fenotyp korzeni w płytkach niewentylowanych - efekt akumulacji etylenu (ET), 2) zmiany parametrów fluorescencji chlorofilu – efekt fluktuacji CO₂ i 3) wpływ elektrolitów - efekt silnego stresu. Często różnice były widoczne dopiero wówczas, gdy badano mutanty (w tym przypadku *lsd1*) a nie były widoczne w formie dzikiej. Należy podkreślić, że duża część wyników badań rzodkiewnika bazuje na fenotypie siewek tego gatunku uprawianych na pożywce agarowej w płytkach Petriego. Interpretacja tych wyników jest podstawą do wnioskowania (czasami daleko idącego) o funkcji genów, roli regulatorów, interakcji procesów itp.

Wyniki Doktoranta w tego cyklu badań i dotyczące ważnych parametrów interakcji pasożyt-gospodarz, w tym: szczegółowa analiza profili ekspresji genów, wielkość syncytium i liczebności samic były różne a czasami przeciwstawne, zależnie od stopnia wentylacji płytek.

Zgodne z powyższymi obserwacjami są dane o roli ET m.in. w rozwoju włośników i związanej z tym podatności na mącznika. Dla przypomnienia - to właśnie ET był akumulowany w niewentylowanych płytkach. Wyciek elektrolitów w korzeniach, 2-2,5 x większy w płytkach niewentylowanych, wskazywał na bardzo wysoki poziom stresu. Wszystko to jest efektem użycia tylko takiej a nie innej taśmy do zaklejenia płytek. Zmiany składu atmosfery w małej zamkniętej przestrzeni, w której uprawiane są rośliny *Arabidopsis* dotyczy wielu innych parametrów niebadanych przez Doktoranta. Jednym z nich jest 100% wilgotność względna i, związany z tym, brak transpiracji.

Omawiając wyniki, Doktorant zwrócił uwagę na różnice, a często brak spójności, z wynikami publikowanymi. Ten właśnie aspekt (tj. warunki uprawy siewek) powinien być znacznie mocniej podkreślony w, diskutowanym przez Doktoranta (str.30, pierwszy akapit), braku spójności wyników w pracach Wubben *et al.* (2008), Mateo *et al.* (2004) i samej pracy Doktoranta, Matuszkiewicz *et al.* (2018). W rzeczywistości nie wiemy o jakie detale eksperymentalne zadbali autorzy pozostałych dwóch prac.

Większość z nas akceptuje konieczność metodologicznego redukcjonizmu. Bardzo ważna jest jednak świadomość skali tego podejścia w konkretnym przypadku oraz, jednocześnie świadomość ograniczeń wnioskowania. Przyjrzyjmy się tylko dwóm poziomom redukcji złożoności: 1) wybór gatunku: modelowy rzodkiewnik czy nie modelowe gatunki uprawne, 2) wybór systemu eksperymentalnego: uprawa siewek w pożywce agarowej w zamkniętej płytce Petriego czy uprawa w doniczce i substracie. Wybór rzodkiewnika i płytek Petriego odpowiadający znacznej redukcji kompleksowości jest racjonalny i czasami niezbędny. Jednak, tak uzyskane wyniki powinny być interpretowane tylko w odniesieniu do tego systemu. Ich stosowalność w innych systemach jest **hipotezą a nie wnioskiem**.

Niby oczywiste ale – tylko jeden przykład - praca np. Wubben *et al.* (2008) pt.: „Cyst Nematode Parasitism of *Arabidopsis thaliana* Is Inhibited by Salicylic Acid and ...” jest opatrzone długim wprowadzającym akapitem o szkodach powodowanych przez nicienie. Jedno ze zdań tego wstępu dramatycznie oznajmia „cyst and root-knot nematodes account for >\$100 billion in annual yield losses worldwide on an enormous variety of crops” i jednocześnie sugeruje, że to co za chwilę przeczytamy odnosi się do tego problemu. Nic podobnego. To tylko *Arabidopsis*.

Na dodatek, z pracy Doktoranta, dowiadujemy się, że istnieje możliwość błędów metodycznych popełnionych przez tych badaczy na etapie np. zaklejania płytek Petriego. Rodzi się pytanie o wartość tych wyników.

Sam Doktorant też nie ustrzegł się przed tą pokusą. Tytuł dysertacji doprecyzowany nazwą gatunku rośliny i gatunku nicienia straciłby walor uniwersalności, ale lepiej oddawałby rzeczywistość. Podsumowując na tym etapie – chcę podziękować Doktorantowi za inspirację jego pracą.

Trzecia z prac doktoratu (Baranowski *et al.*, 2019) wyjaśnia mechanizm powstawania małych wakuoli w syncytium oraz wskazuje ich potencjalną rolę w procesie pasożytnictwa. Obserwacje wykazały istnienie ciągłego procesu powstawania małych wakuoli z cystern retikulum endoplazmatycznego. Identyfikacja białka γ -TIP pozwoliła przypisać te struktury do klasy wakuol litycznych. Profilowanie ekspresji genów oraz ukierunkowana na określone geny i białka re-ewaluacja wcześniejszych wyników transkryptomicznych (Matuszkiewicz *et al.*, 2018) wykazały, że zmiany w metabolizmie syncytium dotyczą, wzajemnie powiązanych, gospodarki wodą, regulacji turgoru i poziomu osmolitów.

Podsumowaniem dysertacji jest 10 wniosków sformułowanych poprawnie, do których nie mam uwag.

Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta zaliczyłbym:

1. Wykazanie, że programowa śmierć komórki regulowana przez *LSDI* oraz procesy autofagii są ważnymi elementami interakcji Arabidopsis-mątwik.
2. Warunki kultury *in vitro* siewek rzodkiewnika i akumulacja gazowych produktów metabolizmu (m.in., etylenu i CO₂) jest ważnym, często nieuwzględnianym elementem fenotypowania. W konsekwencji może to obniżać wartość wniosków i interpretacji.
3. Funkcjonowanie syncytium związane jest ze przekształceniem wakuoli centralnej w małe wakuole lityczne, zmiany gospodarki wodą, turgoru i poziomu osmolitów.

Podsumowanie oceny

Wysoko oceniam wartość merytoryczną wyników składających się na rozprawę doktorską.

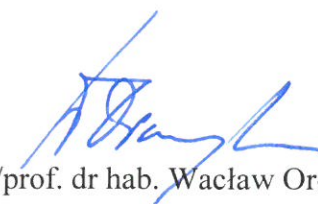
Bardzo duży udział Doktoranta w dwóch publikacjach oraz istotny w publikacji trzeciej pozwalają stwierdzić, że spełnione zostały wymagane kryteria merytoryczne i formalne dla tego rodzaju dysertacji doktorskich.

Przedstawiona dysertacja spełnia wszystkie wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym. Jej analiza oraz pozytywna ocena wskazują, że Autor jest dojrzałym naukowcem zasługującym na awans naukowy i nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych i ogrodniczych, dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Wnoszę o dopuszczenie mgr Mateusza Matuszkiewicza do dalszych części przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie doktoratu

Uwzględniając **i)** wysoką merytoryczną wartość wyników, potwierdzoną ich opublikowaniem w trzech artykułach w uznanych czasopismach naukowych, **ii)** opanowanie i biegłe posługiwanie się różnorodnym i złożonym warsztatem eksperymentalnym, **iii)** zdolność do krytycznej oceny tego warsztatu oraz umiejętność jego twórczego korygowania oraz **iv)** ugruntowaną wiedzę kandydata, pozwalającą krytycznie dyskutować własne i publikowane wyniki, wnioskuję o wyróżnienie tego doktoratu stosowną nagrodą.


/prof. dr hab. Wacław Orczyk/

Literatura

Acevedo-Garcia J, Kusch S, Panstruga R. 2014. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist* **204**, 273-281.

Baranowski L, Rozanska E, Sanko-Sawczenko I, Matuszkiewicz M, Znojek E, Filipecki M, Grundler FMW, Sobczak M. 2019. Arabidopsis tonoplast intrinsic protein and vacuolar H(+)-adenosinetriphosphatase reflect vacuole dynamics during development of syncytia induced by the beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* **256**, 419-429.

Mateo A, Muhlenbock P, Rusterucci C, Chang CC, Miszalski Z, Karpinska B, Parker JE, Mullineaux PM, Karpinski S. 2004. LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol* **136**, 2818-2830.

Matuszkiewicz M, Koter MD, Filipecki M. 2019. Limited ventilation causes stress and changes in Arabidopsis morphological, physiological and molecular phenotype during in vitro growth. *Plant Physiol Biochem* **135**, 554-562.

Matuszkiewicz M, Sobczak M, Cabrera J, Escobar C, Karpinski S, Filipecki M. 2018. The Role of Programmed Cell Death Regulator LSD1 in Nematode-Induced Syncytium Formation. *Frontiers in Plant Science* **9**, 314.

Pant SR, Krishnavajhala A, McNeece BT, Lawrence GW, Klink VP. 2015. The syntaxin 31-induced gene, LESION SIMULATING DISEASE1 (LSD1), functions in Glycine max defense to the root parasite *Heterodera glycines*. *Plant Signal Behav* **10**.

Wang YP, Cheng X, Shan QW, Zhang Y, Liu JX, Gao CX, Qiu JL. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* **32**, 947-951.

Wubben MJE, Jin J, Baum TJ. 2008. Cyst nematode parasitism of *Arabidopsis thaliana* is inhibited by salicylic acid (SA) and elicits uncoupled SA-independent pathogenesis-related gene expression in roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 424-432.