



RECENZJA

pracy doktorskiej Pana mgr. inż. Mateusza Matuszkiewicza
pt. *Regulatory programowanej śmierci komórki
a reakcja rośliny na nicie pasożytnicze*

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska, Pana mgr. Mateusza Matuszkiewicza, została wykonana w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, pod kierunkiem pana dr. hab. Marcina Filipeckiego. Od wielu lat tematyka badań prowadzonych w laboratorium Pana Prof. Marcina Filipeckiego dotyczy różnych aspektów odpowiedzi roślin na nicie. Badania te są realizowane w znakomitej współpracy z grupą dr. inż. Mirosława Sobczaka, także z SGGW.

Na pracę doktorską składają się trzy wieloautorskie publikacje, które ukazały się w recenzowanych międzynarodowych czasopismach naukowych (*Frontiers in Plant Science*, *Plant Physiology and Biochemistry* i *Protoplasma*) w 2018 i 2019 roku. Aktualny łączny współczynnik oddziaływania dla tych periodyków wynosi niemal 13. W dwóch pierwszych publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem a jego udział, w oparciu o załączone oświadczenia, jest dominujący i wynosi odpowiednio 70% i 75%. W trzeciej pracy, firmowanej przez grupę dr. inż. Sobczaka, rola Doktoranta oszacowana została na 20%. Oprócz publikacji, w pracy doktorskiej znajdują się także *Streszczenia* w języku polskim i angielskim; *Cel badań i Hipotezy badawcze*; *Materiały i Metody*; *Przegląd literatury*; *Omówienie wyników*; *Wnioski*; *Spis literatury* oraz *Oświadczenia dotyczące udziału kandydata i współautorów*. Forma pracy, jak dla mnie, układem nieco bardziej przypomina klasyczną rozprawę niż tzw. „spinkę”, bo dotychczas nie spotkałam się np. z zamieszczaniem rozdziału *Materiały i Metody*. Niemniej brak jest zalecanego standardu w tej kwestii, stąd moje uwagi mają bardziej charakter doradczy.

Przegląd literatury jest stosunkowo obszerny i dość dobrze wprowadza czytelnika w tematykę prac. Osobiście inne proporcje zastosowałabym przy charakterystyce hormonów, które pełnią rolę w interakcji roślin z nicieniami. Przykładowo opisano fizjologiczne znaczenie cytokinin, natomiast we wstępie nie znalazłam nic o fizjologicznej funkcji etylenu, podczas gdy to właśnie na etylenie koncentruje się jedna z publikacji. Może to przeoczyłam, ale wydaje mi się, że w tej części nie została też wprowadzona pełna nazwa ani dla etylenu ani dla kwasu salicylowego czy jasmonowego, co dla czytelnika spoza naszej dziedziny myślę, że może być sporym utrudnieniem w percepcji tekstu. *Cel* pracy został zakrojony bardzo szeroko i dotyczyć miał wielopłaszczyznowej analizy odpowiedzi roślin wrażliwych na pasożytnicze nicie, ze szczególnym uwzględnieniem roli programowanej śmierci komórkowej. Kolejną część stanowią *Materiały i Metody*. Wbrew nazwie w tej części nie podano spisu materiałów a jedynie opisano niektóre metody. Nie wiem też, jaki był klucz ich wyboru, choć muszę przyznać, że opis sposobu wykonania testów infekcyjnych niewątpliwie przyczynił się do lepszego zrozumienia przeprowadzonych eksperymentów. Następnie zamieszczono kilkunastonicowe *Omówienie wyników*, osobno dla każdej z prac. Myślę, że walor poznawczy i możliwość dyskusji i aktualnych wyników, i postawienia nowych hipotez, byłyby dużo większe, gdyby prace streszczono i

skomentowano wspólnie. Zamieszczone prace ukazały się wcześniej w recenzowanych czasopismach, dlatego też czuję się zwolniona z ich szczegółowej recenzji i tylko pokrótce je tu przedyskutuję.

Matuszkiewicz M, Sobczak M, Cabrera J, Escobar C, Karpiński S, Filipecki M. (2018) The role of programmed cell death regulator *LSD1* in nematode-induced syncytium formation. *Front Plant Sci.* 9:314.

W pierwszej z prac autorzy podjęli się odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób mechanizmy programowanej śmierci komórkowej roślin przyczyniają się do skutecznej inwazji nicieni. W tym celu wykorzystano mutanty *Arabidopsis* w genach kodujących, znane wcześniej, białka regulujące programowaną śmierć komórkową. Jak wykazano, mutacja w genie *LSD1* prowadziła do zmniejszenia populacji samic i samców na korzeniach, natomiast tylko w tle genetycznym Col-0 (w przeciwieństwie do *Ws-0*) obserwowano także redukcję i wielkości syncytium, i rozmiaru żerującej na nim samicy. Co ciekawe, mutacja w *LOL2* miała przeciwstawny wobec *LSD1* charakter. W pracy tej analizowano też zmiany w transkryptomach podczas rozwoju syncytiów na korzeniach roślin dzikiego typu w odniesieniu do korzeni mutantów. Dane z tych doświadczeń pozwoliły wysunąć przypuszczenie odnośnie znaczenia procesów autofagii dla interakcji roślin z nicieniami, co zweryfikowano doświadczalnie. Co warto podkreślić, wyniki eksperymentów z tej pracy przyczyniły się też do zaproponowania ciekawych hipotez badawczych w trzeciej z załączonych publikacji.

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.

Druga praca zwraca uwagę na parametry techniczne, podczas prowadzenia kultur *in vitro*, które mają wpływ na kondycję roślin, co wpływa z kolei na odpowiedź roślin na nicienie. Jako osoba, które wykonała liczne testy z patogenami dobrze wiem, że powtarzalność wyników zależy od wieku rośliny, stanu fizjologicznego czy nawet położenia liścia, który poddawany jest inokulacji. Także wpływ etylenu jest dobrze znany na proces infekcji, co odpowiednio wykorzystuje się np. przy transformacji roślin z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* (pozostawienie niezalepionych szalek podczas niektórych etapów transformacji czy użycie inhibitorów odpowiedzi na etylen). Obserwowano też wcześniej wydzielanie etylenu przez materiały używane do prowadzenia kultur (Moniuszko i wsp, 2018 *BioTechniques*). Niemniej każda kolejna praca, która zwraca uwagę na takie technikalnia czy systematyzuje fakty jest cenna dla naszego środowiska.

Baranowski Ł, Różańska E, Sańko-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.

W tej pracy autorzy starają się odpowiedzieć na pytanie, jakie jest pochodzenie pęcherzyków, licznie występujących podczas rozwoju syncytium, które pojawiają się w miejsce centralnej wakuoli. Dzięki serii doświadczeń, autorzy w przekonujący sposób pokazują, że i) pęcherzyki te znakowane są markerami typowymi dla wakuoli, potwierdzając tym samym ich zakładaną w literaturze naturę oraz ii) że powstają *de novo* poprzez rozszerzanie struktur retikulum endoplazmatycznego podczas rozwoju syncytium a w dojrzałym syncytium ulegają fuzji. Tym samym ta publikacja wnosi ważny element w zrozumienie mechanizmów tworzenia się syncytiów.

Zważywszy na omówioną tematykę włączonych prac, tytuł dzieła wydaje się nieco zbyt wąski, gdyż odnosi się w zasadzie do pierwszej z tych publikacji.

Do części merytorycznej miałabym kilka pytań i komentarzy:

-polemizowałabym ze stwierdzeniem zawartym w abstrakcie, że „...brak aktywności *LSD1* powodował prawie trzykrotny spadek złożoności odpowiedzi na atak i żerowanie larw...”. Jest ono słuszne jedynie w odniesieniu do zmiany w poziomie transkryptów, bo taką analizę przeprowadzał Doktorant. Natomiast reakcja roślin na nicienie jest, jak zresztą zauważa Doktorant, złożona. Nieuprawnione jest założenie, że zmiany w poziomie transkryptów przekładają się liniowo na inne procesy. Chciałabym, żeby Doktorant skomentował tę kwestię podczas publicznej obrony.

-nie mogę się też zgodzić ze stwierdzeniem, że sekwencjonowanie bibliotek cDNA czyli tzw. RNAseq służy do monitorowania zmian aktywności genów na poziomie transkrypcji. RNAseq, w klasycznej postaci pokazuje zmiany w poziomie RNA, który to poziom jest wypadkową szeregu procesów w tym aktywacji genów na poziomie transkrypcji. Istnieją wprawdzie modyfikacje tej metody, które pozwalają śledzić zmiany w indukcji transkrypcji czy stabilności transkryptów. Jaki warsztat badawczy Doktorant zastosowałby w tym celu?

-ponieważ z badań Doktoranta wynika, że w reakcji roślin na nicienie pasożytnicze zmienia się poziom ekspresji genów związanych z autofagią oraz zmieniona jest podatność na nicienie w testowanych mutantach tego procesu, chciałabym poprosić Doktoranta, aby zaproponował doświadczenia, które mogłyby rozwinąć ten wątek badawczy i żeby przy projektowaniu doświadczeń, nie ograniczył się tylko do technik stosowanych w swoich pracach.

-w oparciu o wyniki trzeciej publikacji, jednym z komórkowych komponentów, na które wpływają nicienie są transportery cukrów SWEET, przy tej okazji chciałabym, żeby Doktorant podał przykłady fitopatogenów, które także manipulują białkami z tej rodziny. W kontekście tej pracy najbardziej interesujące wydają mi się takie przykłady, gdzie cel przejęcia kontroli nad tymi białkami nie ogranicza się do pozyskiwania składników odżywczych. W jaki sposób Doktorant wpisałby ten inny mechanizm uzurpacji białek SWEET w swoje wyniki?

-jaki typ RNA ma spektrum absorpcji przy fali o długości 595 nm? Pytanie to narodziło mi się po przeczytaniu fragmentu *Materiałów i Metod* dotyczącego analizy RNA za pomocą Nanodrop

Od strony formalnej rozprawa zawiera, moim zdaniem, szereg uchybień. Przede wszystkim, sposób prezentacji wyników (tekst pisany w l.mn.), szeroko zakrojony cel (obejmujący wszystkie zadania podjęte w pracach a nie tylko te wykonane przez Doktoranta) oraz przygotowany wzór oświadczeń (często podany tylko procentowy udział autorów a nie zakres przeprowadzonych analiz), nie ułatwiają ustalenia, jaki jest rzeczywisty wkład doktoranta w powstanie poszczególnych prac. Tymczasem, zgodnie z rozporządzeniem ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, recenzja pracy doktorskiej w tej formie ma zawierać ocenę indywidualnego wkładu kandydata w powstanie publikacji. Stąd też przy ewaluacji skoncentrowałam się głównie na dwóch artykułach, w których współuczestnictwo doktoranta było dominujące (min. 70%) oraz podano na czym polegała jego rola w ich powstaniu.

Sugerowałabym jednak na przyszłość, żeby i Promotor i Rada Jednostki, bardziej precyzyjnie określili wytyczne odnośnie formy pracy, w tym aby został opracowany wzór oświadczenia zawierający szczegółowy udział poszczególnych autorów w planowaniu i zdobyciu funduszy na badania, przeprowadzeniu poszczególnych eksperymentów, ich analizie czy przygotowaniu manuskryptu. Z kolei wspólne omówienie wszystkich prac tworzących osiągnięcie, wpisanie ich w szerszy kontekst z nakreśleniem kierunków dalszych badań oraz z zaznaczeniem, które doświadczenia były wykonane przez doktoranta, niewątpliwie umożliwiłoby doktorantowi wykazanie się wiedzą, zdolnością do osadzenia własnych wyników w aktualne trendy, umiejętnością analizy i syntezy a równocześnie stanowiłoby formę znacznie ułatwiającą dokonanie oceny. Ponadto, część oświadczeń powstała na

zasadzie powielania pewnego wzorca, stąd też sam doktorant wyraża zgodę na wykorzystanie jednej z publikacji we własnym przewodzie doktorskim, a sądząc po tytule innych dokumentów „oświadczenia doktoranta”, zarówno prof. M. Filipecki, jak i dr M. Koter, zostali zdegradowani do roli doktorantów.

Kontynuując uchybienia formalne, z obowiązku recenzenta, muszę wspomnieć, że przy przygotowaniu pracy nie dochowano należytej staranności: interpunkcja w zasadzie nie istnieje, znalazłam szereg literówek, błędów gramatycznych (zła forma, brak konsekwencji w stosowaniu czasów), nieprawidłowy zapis genów i ich produktów. Godna pochwały jest natomiast staranność Doktoranta w unikaniu wyrażen żargonowych i właściwym dobieraniu polskich odpowiedników dla terminów czy pojęć stworzonych w literaturze obcojęzycznej. Wymienię tylko przykładowe uwagi, ponieważ na niektórych stronach pracy doktorskiej naniósłabym nawet ok. 10 drobnych poprawek, stąd też wykazanie wszystkich przerosłoby tę recenzję w opasły tom.

I tak, nie partogeneza a partenogeneza, nie rozetka a rozeta u *Arabidopsis*, nie papina a papaina (choć tu muszę zwrócić uwagę na niejaką konsekwencje w niepoprawności, tj. i po polsku, i po angielsku jest podobna forma, odpowiednio papina i papin). ...transkrypty grupowane są nie podłóg a podług klasyfikacji

Wprawdzie Słownik Języka Polskiego PWN, dopuszcza stosowanie podwójnych nawiasów okrągłych, jednak rekomenduje unikanie nawiasu w nawiasie, ponieważ utrudniają one odbiorcy orientację w tekście. Mi pozostaje tylko dołączyć się do tej opinii.

Chciałabym zwrócić uwagę, że niektóre błędy czy braki, które wydawać mogą się błahe, mogą zaburzać zrozumienie tekstu. Przykładowo poniższe zdanie, można zrozumieć przynajmniej dwojako. Natomiast już wstawienie przecinków a najlepiej jeszcze zmiana szyku, nadałyby mu jednoznaczny wydźwięk.

„Szczep *Pseudomonas syringae*, który nie wytwarza korotyny (*powinno być koronatyny*) imitującej JA poprzez efektor HopX1 promuje degradację białek JAZ, które są represorami JA.”

Uchybienia te, mimo wszystko, nie wpływają na mój całościowy pozytywny odbiór pracy. Należy też zwrócić uwagę, że Doktorant jest współautorem innych publikacji a jego aktualny współczynnik Hirscha wynosi 3, co jak na ten etap kariery naukowej, jest bardzo dobrym osiągnięciem. Moja internetowa kwerenda pozwoliła mi też ustalić, że Doktorant odbył kilka krótkoterminowych staży w różnych zagranicznych ośrodkach naukowych, co jest bardzo dobrym prognostykiem dla jego dalszego rozwoju naukowego.

Biorąc zatem pod uwagę wypełnienie w mojej opinii wszystkich ustawowych wymogów oraz bezspornie znaczący wkład doktoranta w powstanie artykułów tworzących tę rozprawę, zwracam się do Rady Instytutu Nauk Ogrodniczych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przyjęcie pracy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr. inż. Matuszkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Magdalena Krzymowska, prof. Jednostki

Warszawa, 24.04.2020