



SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE
WYDZIAŁ ROLNICTWA I BIOLOGII

Warszawa, 31.01. 2019.

dr hab. Agnieszka Gniazdowska-Piekarska, prof. nadzw. SGGW w Warszawie
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Rolnictwa i Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Izbiańskiej

**pt. „ Funkcje nadtlenoazotynu w odporności liści ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.)
na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary "**

wykonanej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Arasimowicz-Jelonek, prof. nadzw. UAM,
promotor pomocniczy dr hab. Jarosław Gzyl.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowią trzy spójne tematycznie artykuły naukowe o charakterze prac badawczych. Dwie prace opublikowane zostały w 2016 roku w *Plant Physiology and Biochemistry* oraz *Plant Pathology*, czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR), o łącznym współczynniku wpływu IF: 5,311 oraz sumie punktów MNiSW wynoszącej 70. Praca trzecia pochodzi z roku 2018 i została opublikowana w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science* o IF: 3,678; 40 punktów MNiSW.

Sumaryczny IF czasopism, w których opublikowano przedstawione prace wynosi 8,989, a suma punktów MNiSW wynosi 110.

W skład omawianego cyklu wchodzi następujące prace:

1. Floryszak-Wieczorek J., Arasimowicz-Jelonek M., **Izbiańska K.** (2016) The combined nitrate reductase and nitrite-dependent route of NO synthesis in potato immunity to *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108: 468–477 (IF=2,928; 35 pkt MNiSW).

2. Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., **Izbiańska K.**, Gzyl J., Jelonek T. (2016) Implication of peroxynitrite in defence responses of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 65: 754–766 (IF=2,383; 35 pkt MNiSW).
3. **Izbiańska K.**, Floryszak-Wieczorek J., Gajewska J., Meller B., Kuźnicki D., Arasimowicz-Jelonek M. (2018) RNA and mRNA nitration as a novel metabolic link in potato immune response to *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 672 (IF=3,678; 40 pkt MNiSW).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Karoliny Izbiańskiej była finansowana w ramach dwóch projektów badawczych OPUS 2011/01/B/NZ9/00243, oraz OPUS 2014/13/B/NZ/02177 przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki.

Prace stanowiące rozprawę doktorską dotyczą roli reaktywnych form azotu (RNS), w szczególności nadtlenoazotynu (ONOO⁻), w reakcji liści ziemniaka na infekcję patogenem *Phytophthora infestans* i stanowią bardzo dobrą dokumentację przeprowadzonych badań. Przeszły proces oceny merytorycznej dokonany przez niezależnych recenzentów powoływanych przez redakcje renomowanych czasopism naukowych. Wkład mgr. Karoliny Izbiańskiej w powstanie ww. artykułów jest dominujący i wynosi wg. szacunków doktorantki 40% - w przypadku publikacji nr 1 w *Plant Physiology and Biochemistry*, 40% w publikacji nr 2 w *Plant Pathology* oraz 55% w przypadku publikacji nr 3 z *Frontiers in Plant Science*. Sądzę, że w publikacji nr 2 nastąpiło niedoszacowanie wkładu własnego Doktorantki i udział ten powinien wynosić 45%, na co wskazuje wymieniony w oświadczeniu zakres prowadzonych przez nią prac.

Jak wynika z oświadczeń, udział mgr Karoliny Izbiańskiej w przedstawionych jako praca doktorska publikacjach polegał na: wykonaniu ogromnej większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu statystycznym części wyników, interpretacji znacznej części wyników oraz przygotowaniu manuskryptu (praca nr 3) do procedury wydawniczej. Do rozprawy zostały załączone również oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy, określające procentowy wkład każdego z nich w powstanie prac wynoszący od 5% do 20%. Przedstawione oświadczenia stanowiły podstawę uznania przeze mnie zaprezentowanego materiału jako rozprawy doktorskiej.

Wszystkie prace stanowiące rozprawę doktorską zostały opublikowane niedawno, tym bardziej należy podkreślić, że pierwsza z nich (z 2016) ma już 6 cytowań, druga (także z 2016) 4 cytowania, a trzecia ukazała się w maju 2018 (stąd nie ma jeszcze informacji o cytowaniach). Artykuły są dostępne w sieci (open access), a czasopisma, w których zostały opublikowane cieszą się dobrą opinią można się zatem spodziewać licznych cytowań w przyszłości, szczególnie dotyczy to pracy nr 3, która zawiera absolutnie nowatorskie wyniki.

Rozprawa doktorska, której podstawą są wyżej wymienione artykuły naukowe została zatytułowana „**Funkcje nadtlenoazotynu w odporności liści ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary**”. Obejmuje ona streszczenie w języku polskim i angielskim oraz została uzupełniona komentarzem liczącym 12 stron w języku polskim, w którym Doktorantka wyjaśnia problem badawczy opisany w publikacjach oraz podsumowuje najważniejsze wnioski płynące z wyżej wymienionych prac. Rozdział pierwszy wspomnianego komentarza to *Wprowadzenie* zawierające przegląd piśmiennictwa, zakończone wyodrębnionym *Celem* prowadzonych badań. Kolejne podrozdziały zawierają *Omówienie wyników*, *Wnioski* i *Podsumowanie* oraz spis literatury. Wobec powyższego wszystkie kryteria niezbędne do przedstawienia rozprawy doktorskiej zostały spełnione pod względem formalnym.

Należy podkreślić, że poza pracami które stanowią przedmiot rozprawy doktorskiej, Doktorantka w dorobku naukowym posiada także aż 9 innych prac opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR. Doktorantka jest ponadto współautorką jednego rozdziału w monografii w j. angielskim. Sumaryczny współczynnik wpływu IF czasopism, w których mgr Karolina Izbiańska jako współautorka, opublikowała prace nie wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wynosi 22,651, co odpowiada 280 punktom MNiSW. Zatem dotychczasowy dorobek naukowy Kandydatki (nie biorąc pod uwagę jej licznych (38) doniesień konferencyjnych) jest imponujący.

Ocena merytoryczna

Trzy prace oryginalne wchodzące w skład rozprawy uzyskały już pozytywną ocenę recenzentów, a także redaktorów dobrych i bardzo dobrych czasopism z zakresu Plant Science. Z tego względu nie widzę potrzeby ponownej recenzji merytorycznej już opublikowanych artykułów. Z powinności recenzenta przytoczę tylko najważniejsze osiągnięcia poszczególnych prac oraz odniosę się do ich syntetycznego omówienia w przedstawionej rozprawie.

Doświadczenia opisane w publikacjach prowadzono na odciętych liściach ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.), odmian różniących się odpornością na zarazę ziemniaka *Phytophthora infestans*. Odmianą podatną była odmiana Bintje, odmianami odpornymi Bzura i Sarpo Mira. Taki układ badawczy pozwolił Doktorantce określić, na ile zdarzenia metaboliczne zależne od ONOO⁻ towarzyszą aktywacji odpowiedzi obronnych w odporności typu ETI - indukowanej przez efektory, a na ile odpowiedziom obronnym związanym z tzw. odpornością bazową (PTI).

W pracy nr 1 badano, która z postulowanych w literaturze dróg biosyntezy NO odpowiada za wzmożoną emisję tej cząsteczki w infekowanych patogenem liściach ziemniaka. Wykazano, że emisja NO obserwowana w liściach ziemniaka w odpowiedzi na *P. infestans*, była skorelowana w

czasie ze wzrostem poziomu transkryptu genu *NR* kodującego reduktazę azotanową, jak i ze zwiększeniem aktywności enzymatycznej tego białka. Dodatkowo zastosowanie wolframianu (inhibitora *NR*) oraz L-NAME (inhibitora NOS-podobnej aktywności) pozwoliło na potwierdzenie dominującego udziału *NR* w biosyntezie NO w liściach ziemniaka w odpowiedzi na infekcję.

W pracy nr 2 Doktorantka wykazała dwufazowy przebieg emisji NO w infekowanych liściach ziemniaka odmiany odpornej. Pierwsze maksimum emisji NO przypadało na 3 godz. od inokulacji, a drugi pik na 24 godz. od infekcji. W odmianie podatnej emisja NO był niższa i wzrastała po 6 godz. od inokulacji. Wzrostowi syntezy NO w liściach odmiany odpornej towarzyszył wzrost zawartości ONOO^- w porażonych tkankach. Ciekawym wynikiem przedstawianym w pracy nr 2 składającej się na dysertację jest analiza nitroproteomu liści obu odmian ziemniaka. W profilu nitroproteomu liści odmiany odpornej stwierdzono pojawienie się dodatkowego prążka, który odpowiadał białku podobnemu do subtylizyny o aktywności proteaz serynowych. Nitrowanie tych białek, prowadzące do obniżenia ich aktywności, może mieć istotne znaczenie w kontroli zasięgu aktywnego zamierania komórek ziemniaka podczas infekcji *P. infestans*. W pracy tej Doktorantka analizowała również ekspresję genów kodujących peroksydazę tioredoksyny (TPx) oraz tioredoksynę (Thx). O ile przebieg zmian ekspresji *Thx* w liściach obu testowanych odmian ziemniaka był podobny (z opóźnionym o 3 godz. wzrostem ekspresji *Thx* u odmiany odpornej) wzór zmian ekspresji *TPx* u obu odmian był zupełnie inny. Prosiłabym o przedyskutowanie tej kwestii w kontekście roli jaką prawdopodobnie pełnią TPx w regulacji stężenia RNS w komórkach roślinnych.

Najbardziej interesującym wynikiem prezentowanym w pracy nr 3, mającym znaczenie dla przyszłych badań, było wykazanie że nitrowanie RNA/mRNA u roślin jest nie tylko markerem uszkodzeń kwasów nukleinowych wywołanych przez akumulację ONOO^- ale może stanowić selektywny proces potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów zaangażowanych w uruchamianie i/lub regulację śmierci komórek podczas HR. Należy przy tym wyraźnie podkreślić, że jest to pierwsze w literaturze doniesienie na temat nitracji kwasów nukleinowych (RNA i mRNA) w tkankach roślinnych. Prosiłabym o ustosunkowanie się do kwestii ewentualnej możliwości identyfikacji w przyszłości transkryptów podlegających nitracji. Jestem także ciekawa czy znane są jakieś wyniki badań dotyczących oksydacyjnych modyfikacji mRNA w tkankach roślin poddanych stresom, w tym np. biotycznemu wynikającemu z porażenia patogenem.

W tym miejscu pragnę wskazać, że w każdej z prac wyniki przedstawiono w sposób jasny i w logicznej kolejności, zostały one prawidłowo zinterpretowane oraz przedyskutowane z najnowszą literaturą z zakresu tematu pracy. Dobór i sposób omawiania literatury przedmiotu oraz rzetelne dyskusowanie z nią własnych wyników potwierdzają wysoki poziom wiedzy Doktorantki w

zakresie biologii roślin. Sformułowane w rozprawie wnioski są adekwatne do uzyskanych wyników i w pełni uzasadniane. Jako podsumowanie doktorantka zaproponowała poglądowy schemat opisujący sekwencje zdarzeń metabolicznych podkreślający udział ONOO^- w odporności liści ziemniaka na *Phytophthora infestans*.

Na zakończenie mam drobne uwagi natury redakcyjnej odnoszące się do omówienia wyników badań w dysertacji. Doktorantka pomimo wprowadzenia skrótów, wymiennie stosuje skróty i pełne nazwy, co to szczególnie niezręczne w przypadku nadtlenoazotynu (ONOO^-), który jest głównym bohaterem rozprawy. Chciałbym też zwrócić uwagę, że organy rośliny, tkanki czy komórki podlegają działaniu danego związku podawanego w różnych stężeniach, a nie jak pisze Doktorantka poddanie roślin działaniu danego stężenia np. ONOO^- wywołuje taki lub inny efekt. Sugerowałabym także stosowanie wyrażenia "tworzenie", "powstawanie" ONOO^- zamiast słowa "generowanie", które jest dosłownym tłumaczeniem z j. angielskiego. Wydaje się być nieuprawnione użycie formuły "cząsteczki macierzyste dla ONOO^- " w odniesieniu do NO i O_2^- . W kilku miejscach pojawiają się niezręczności językowe, lub literówki które zaznaczono w tekście dysertacji. W spisie literatury Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów edytorskich (np. brak spacji, małe litery w nazwach czasopisma, j. angielski stosowany zamiast j. polskiego przy cytowaniach rozdziałów z monografii).

Podsumowanie

1. Wysoko pod względem merytorycznym oceniam napisane przez mgr Karolinę Izbiańską opublikowane oryginalne prace twórcze i załączony komentarz w języku polskim. *Omówienie* wyników i *Podsumowanie* są generalnie dobrze napisane. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka stworzyła przejrzysty model oddziaływania ONOO^- w reakcji roślin na patogen, dając tym wyraz nabycia umiejętności dokonania syntezy otrzymanych danych.
2. Mgr Karolina Izbiańska w czasie realizacji celów pracy doktorskiej przeanalizowała bogatą literaturę, co wskazuje na dobrą orientację w problematyce badawczej, świadczy o tym także *Wprowadzenie* w omawianej dysertacji.
3. Doktorantka wykazała się nie tylko wysokim poziomem wiedzy teoretycznej, ale także zdolnością opanowania bardzo różnych, skomplikowanych technik laboratoryjnych a także zmysłem analitycznym potrzebnym do opanowania dużej liczby danych empirycznych.
4. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zasługują na zainteresowanie i uwagę badaczy zajmujących się tematyką dotyczącą odpowiedzi roślin na stresy biotyczne, szczególnie w kontekście metabolizmu reaktywnych form azotu.
5. Otrzymane przez Doktorantkę bardzo interesujące wyniki zostały opublikowane w prestiżowych,

specjalistycznych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku cytowalności, co wskazuje, że badania zostały docenione także przez recenzentów *Plant Physiology and Biochemistry*, *Plant Pathology* i *Frontiers in Plant Sciences*.

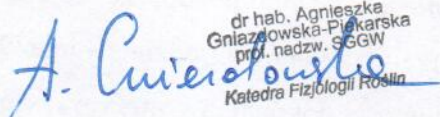
Uważam, że otrzymane przez mgr Karolinę Izbiańską wyniki badań, stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej, wnoszą nowe informacje dla współczesnej biologii roślin w zakresie mechanizmów obronnych roślin aktywowanych w odpowiedzi na infekcję *Phytophthora infestans*, a także znacznie poszerzają wiedzę dotyczącą roli reaktywnych form azotu w regulacji szeregu procesów w komórkach roślinnych.

Pragnę równocześnie podkreślić, że zawarte w recenzji nieliczne komentarze i sugestie nie pomniejszają wartości merytorycznej pracy.

Wnioski końcowe

W mojej ocenie rozprawa mgr Karoliny Izbiańskiej spełnia wszystkie wymagania ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Karoliny Izbiańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wkład pracy Doktorantki i zastosowanie szeregu metod badawczych do realizacji celów pracy oraz ze względu na nowatorstwo wyników badań wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.


dr hab. Agnieszka
Gniazdowska-Piękarska
prof. nadzw. SGGW
Katedra Fizjologii Roślin