

Warszawa 28 listopada 2018r.

Dr hab. Małgorzata Sławska, prof. nadzw. SGGW
Wydział Leśny, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Anny Skwarek pt: **Zmiany biochemiczne w sadzonkach dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) w odpowiedzi na infekcję *Erysiphe alphitoides***” wykonanej w Katedrze Fizjologii i Biochemii Roślin pod kierunkiem dr hab. Jacka Patykowskiego, prof. nadzw. UŁ

Struktura rozprawy, podział treści na rozdziały i ich kolejność są typowe dla prac doktorskich z dziedziny nauk biologicznych. We **Wstępie** Autorka zawarła informacje na temat *Erysiphe alphitoides*, opisała relacje między rośliną-gospodarzem a patogenem i szczegółowo omówiła znaczenie różnych grup związków w obronie biochemicznej roślin powołując się na najnowszą literaturę. Wstęp stanowi dobre wprowadzenie tematykę przedstawionych badań.

W rozdziale **Cel pracy** Doktorantka w pierwszej kolejności uzasadniła znaczenie podjętych badań. Omawiając cel pracy ograniczyła się do zwięzłego przedstawienia zadań badawczych. W pracy nie postawiono hipotez do weryfikacji ani pytań, na które przeprowadzone badania mogłyby udzielić odpowiedzi.

W rozdziale **Materiał i metody** Autorka charakteryzowała warunki uprawy sadzonek, sposób pobierania liści do badań i weryfikacji stopnia ich porażenia, oraz bardzo szczegółowo opisała metody laboratoryjne i techniki analityczne. Przyjęte i zastosowane w pracy metody badawcze potwierdzają dobre przygotowanie Doktorantki do rozwiązywania problemów z zakresu ocenianej rozprawy.

W rozdziale **Wyniki** Doktorantka opisała w sposób poprawny, rzetelny i przejrzysty wszystkie elementy przedstawione wcześniej w Materiałach i metodach. W pierwszym podrozdziale (4.1) scharakteryzowała częstość i nasilenie występowania patogena na roślinach, z których pobierany był materiał do analiz opisując udział niezainfekowanych i zainfekowanych sadzonek *Q.robur* z uwzględnieniem stopnia ich porażenia.

Trzon rozdziału stanowią szczegółowe wyniki charakteryzujące zmiany stężenia badanych związków w liściach dębu zainfekowanych przez *E. alphitoides*. Wyniki analiz wykonanych w trzech terminach w sezonie wegetacyjnym cechuje duża zmienność, co sugeruje dynamiczny charakter odpowiedzi rośliny na infekcję, a jednocześnie utrudnia uchwycenie i opisanie prawidłowości. Wyraźne różnice w stężeniach różnych związków w badanych liściach zwykle

obserwowane były tylko w jednym z trzech terminów, wyjątkowo w dwóch. Na przykład, istotny spadek stężenia chlorofilu w zainfekowanych liściach (niezależnie od stopnia ich porażenia) w porównaniu do liści zdrowych miał miejsce tylko sierpniu, natomiast w kolejnym terminie badań, czyli po upływie miesiąca, w niektórych wariantach infekcji odnotowano wzrost stężenia tego barwnika. Również w przypadku karotenoidów tylko sierpniu odnotowano spadek ich stężenia w zainfekowanych liściach niezależnie od stopnia porażenia.

Najwięcej miejsca w wynikach Autorka poświęciła reaktywnym formom tlenu i aktywności systemu antyoksydacyjnego. Wykazała, że w efekcie infekcji *E. alphitoides* wzrasta w liściach dębu stężenie nadtlenu wodoru i anionorodnika ponadtlenkowego, ale wzrost ten następuje w różnych terminach. Istotne różnice w stężeniu H_2O_2 w liściach zainfekowanych w porównaniu do zdrowych odnotowano już w lipcu, a w przypadku anionorodnika ponadtlenkowego dopiero w sierpniu. Zmiany aktywności enzymatycznych antyoksydantów w zainfekowanych liściach zostały przez Doktorantkę udokumentowane bardzo szczegółowo. Enzymy takie jak dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza zwiększyły swoją aktywność dopiero we wrześniu, przy czym również w liściach niezainfekowanych w ciągu sezonu wegetacyjnego odnotowano wzrost aktywności obu enzymów. Doktorantka wykazała, że w odpowiedzi na infekcję *E. alphitoides* w liściach jednorocznych dębów wyraźnie wzrosła aktywność peroksydaz GPX i APX oraz reduktazy glutationu GR. Szczegółowo opisała również zmiany stężeń najważniejszych nieenzymatycznych antyoksydantów: kwasu askorbinowego i glutationu.

W badaniach uwzględnione zostały również reaktywne formy azotu. Istotny wzrost stężenia tlenu azotu NO i S-nitrozotoli, stwierdzony przez Autorkę na wczesnym etapie infekcji, może wskazywać na ważną rolę tych związków w szlakach sygnałowych i zwiększaniu odporności jednorocznych sadzonek dębu.

Ważnym elementem konstytutywnej i indukowanej obrony roślin przed patogenami są fenolowe metabolity wtórne, w tym związki zaangażowane w proces lignifikacji. Doktorantka wykazała, że wraz z postępującą infekcją zawartość lignin w liściach nie wzrasta i sugeruje, iż młode rośliny nie są w stanie stworzyć efektywnej bariery mechanicznej, aby powstrzymać rozprzestrzenianie się patogena. Jednakże, zdaniem recenzenta, wzrost stężenia w zainfekowanych liściach niektórych związków fenowych może świadczyć o ich roli w indukcji odporności. Wzrost stężenia fenoli całkowitych, fenylopropanoidów i flawonidów w liściach niezainfekowanych w kolejnych miesiącach badań może sugerować systemiczną odpowiedź rośliny. Wyraźnie wyższe stężenie lignin zarówno w liściach zainfekowanych jak i zdrowych w sierpniu i wrześniu w porównaniu z lipcem, może również wskazywać na indukowaną odpowiedź systemiczną. Argumentem potwierdzającym tę hipotezę może być udokumentowany w pracy wyraźny, proporcjonalny do nasilenia stopnia infekcji, wzrost stężenia kwasu salicylowego, który jest główną endogenną substancją sygnałową w nabytej

odporności systemicznej. W przypadku roślin wieloletnich, cechujących się cyklicznym przyrostem pędów w sezonie wegetacyjnym, inwestycja w ten typ odporności jest jak najbardziej uzasadniona.

Ostatni podrozdział Wyników dotyczy lotnych związków, których produkcja w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny jest ważnym mechanizmem obronnym w świecie roślin. Doktorantka wykazała, że w zainfekowanych liściach dębu wzrasta emisja kilku związków lotnych charakterystycznych dla infekcji patogenami grzybowymi. Wyraźna aktywacja tych związków następuje po osiągnięciu kilkunastoprocentowego stopnia zainfekowania liści przez *E. alphitoides*.

Dyskusja, podzielona na podrozdziały poprzedzone krótkim wprowadzeniem, zawiera przemyślane interpretacje uzyskanych wyników i próby wytłumaczenia obserwowanych zmian w zainfekowanych liściach. Autorka umiejętnie wykorzystuje dostępną literaturę i odnosi do niej wyniki własnych badań. Wszystkie wnioski zamieszczone w **Posumowaniu wyników** zostały w pracy dostatecznie dobrze udokumentowane, a sposób ich sformułowania nie budzi zastrzeżeń.

Literatura rozprawy, zestawiona w sposób bardzo staranny, zawiera 325 pozycji bezpośrednio związanych z pracą. Dobór i sposób wykorzystania źródeł świadczy o doskonałej orientacji Autorki w najnowszych osiągnięciach w zakresie tematyki pracy.

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić także kilka uwag krytycznych.

Uwagi do tytułu pracy:

Tytuł rozpoczynający się od słów *Zmiany biochemiczne w liściach dębu ...* zamiast *Zmiany biochemiczne w sadzonkach dębu...* lepiej odzwierciedlałby zakres prezentowanych badań, ponieważ szczegółowa analiza zawartości różnych związków dotyczyła tylko i wyłącznie liści. Potwierdzeniem tego są zamieszczone w rozdziale Wyniki podpisy rycin i tytuły tabel zawierające poprawnie sformułowania takie jak: „stężenie anionorodnika ponadtlenkowego w liściach dębu”, czy „stężenie związków fenolowych w liściach dębu”, itd. Żadne inne części rośliny nie były przedmiotem badań.

Uwagi do Metodyki:

W rozdziale brakuje informacji w jaki sposób określony został udział procentowy zainfekowanych i niezainfekowanych sadzonek *Q. robur*. Czy ocena ta wykonywana była corocznie i na jakiej próbie (co stanowi 100%)? Jeżeli ocenę wykonano w trzech sezonach wegetacyjnych, to możemy określić zmienność udziału sadzonek zdrowych i zainfekowanych w poszczególnych latach. Informacje te to ważny element opisu warunków w jakich rosły badane rośliny.

Autorka pisze, że „próby do badań pobierano w trzech odstępach czasowych, co 28 dni od momentu zaobserwowania pierwszych symptomów chorobowych”, ale nie podaje kiedy

dokładnie w kolejnych latach badań te pierwsze objawy porażenia zostały zauważone i czy pierwszy lipcowy zbiór miał miejsce bezpośrednio po ich zauważeniu, czy 28 dni później. Zamieszczenie w metodyce tabeli z datami obserwacji i zbioru w kolejnych sezonach badawczych wyjaśniłoby powyższe wątpliwości, zwłaszcza, że w całej pracy autorka używa określenia trzy punkty czasowe, co w odniesieniu do nazw miesięcy wydaje się mało precyzyjne.

Uwagi do Wyników:

Pierwszy podrozdział (4.1) zawiera ważne informacje na temat stopnia porażenia sadzonek *Q. robur* przez *E. alphitoides*. Zaproponowany przez autorkę tytuł nie oddaje w pełni wagi prezentowanych danych, które dokumentują nie tylko udział niezainfekowanych i zainfekowanych sadzonek, ale też skalę porażenia i jej zmienność w czasie. Wszystkie analizowane w pracy zmiany zawartości związków i aktywności enzymów odnoszone są do trzech stopni zainfekowania liści (<5% Inf, 12-15 % Inf i 25% Inf) i jest to, zdaniem recenzenta, główna zmienna tych analiz. Czynnikiem czasowym ma drugorzędne znaczenie ze względu na specyfikę przyrostu pędów dębu i przebieg infekcji *E. alphitoides* w rozwijających się liściach. Ponadto, zamieszczone na rycinie 7 dane, z których wynika, że zdrowe drzewka stanowią zaledwie kilkanaście procent sadzonek w szkółce kontenerowej, a około 40% jest silnie porażonych (25% Inf liści) to ważne doniesienie, a jednocześnie potwierdzenie, że podjęte przez autorkę badania dotyczą aktualnego i istotnego problemu.

Niektóre z podrozdziałów Wyników rozpoczynają następujące stwierdzenia: „W Tab. 5 przedstawiono zmiany stężenia barwinków fluorescencyjnych” lub „Na Ryc. 13 przedstawiono zmiany aktywności SPX”. Są to dosłowne powtórzeniami tytułów tych podrozdziałów. Zdania te należy zastąpić powołaniem się na rycinę lub tabelę w trakcie omawiania wyników. W kilku podrozdziałach Autorka w pierwszej kolejności pisze, że nie zaobserwowano istotnego wzrostu stężenia badanych związków w zainfekowanych liściach w porównaniu do próby kontrolnej (np. w przypadku sadzonek pozyskanych w lipcu), a dopiero w dalszej części podrozdziału omawia wyniki istotne statystycznie. Dotarcie do najważniejszych rezultatów badań przy takim sposobie omawiania wyników jest utrudnione, zwłaszcza w przypadku prezentacji danych w formie tabelarycznej. Używane przez Doktorantkę określenie „próba kontrolna” można zastąpić słowami „zdrowe liście”, dzięki czemu przytoczone wcześniej zdanie brzmiałoby: nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach badanego związku w zainfekowanych i zdrowych liściach.

Tabele 9, 10a i 10b mają identyczne tytuły, ale inną zawartość. W przypadku tabel 10a i 10b można uściślić tytuł pisząc np.: Stężenie wybranych związków fenolowych. W nawiązaniu do tej grupy związków nasuwa się pytanie: Dlaczego Doktorantka w swoich badaniach nie uwzględniła tanin, których znaczenie w obronie roślin, zwłaszcza przypadku dębu, jest znane od bardzo dawna (Feeny, 1970).

Tabela 11 przedstawia relatywną emisję związków z zainfekowanych liści i tak powinien brzmieć jej tytuł. Użyte przez Autorkę słowo stężenie, bez podania jednostek jest niejasne. Ponadto tabele 10a, 10b i 11 zawierają zbędną kolumnę z nagłówkiem „Czas, miesiące”, w której figuruje tylko jeden miesiąc – sierpień. Termin zbioru liści do analiz, wyniki których zawierają te tabele można zamieścić w tytule tabeli lub tekście pracy. Opisy wszystkich rycin i tabel można skrócić do następującej postaci: Stężenie np. glutationu w liściach *Q. robur* zainfekowanych *E. alphitoides*.

Analizy statystyczne uzyskanych danych są prawidłowe, ale raczej mało zaawansowane i nie wykorzystują w pełni potencjału tkwiącego w materiale. W przeprowadzonym eksperymencie są trzy czynniki, od których może zależeć wartość określonych parametrów. Są to rok badań, miesiąc pobierania prób i stopień porażenia liści. Zalecaną metodą statystyczną w takim przypadku jest trójczynnikowa analiza wariancji (o ile spełnione są warunki: rozkład normalny, homogenność wariancji i inne). Takie podejście pozwoliłoby statystycznie potwierdzić lub odrzucić różnice uzyskanych wyników w zależności od roku, miesiąca i stopnia porażenia. Możliwe byłoby również określenie interakcji między poszczególnymi czynnikami (np. inny rozkład aktywności reduktazy MDHAR w sierpniu i wrześniu w zależności od stopnia porażenia). Autorka z niewyjaśnionych przyczyn zdecydowała się na jednoczynnikową analizę wariancji, która w tym przypadku poważnie ogranicza możliwości interpretacji. Najciekawsze w prezentowanym materiale jest to, czy istnieje jakiś ogólny wzorzec lub wzorce odpowiedzi biochemicznej na infekcję i stopień jej zawansowania. Obliczenie zwykłych korelacji między mierzonymi parametrami lub jeszcze lepiej wykorzystanie analiz wielu zmiennych (MANCOVA, PCA, NMDS i wiele innych) mogłoby pomóc w wykryciu takich wzorców i zaowocować nowymi doniesieniami na temat patogenezy mączniaka prawdziwego.

Uwagi do Dyskusji:

Obszerne, bo zajmujące dwie i pół strony wprowadzenie do Dyskusji na charakter przeglądu literatury, a jego pierwszy akapit, zawierający rozważania na temat czynników determinujących wzrost i produkcję drzew, nie dotyczy tematu pracy.

Uwagi ogólne:

Praca napisana jest poprawnym naukowym językiem. W tekście znaleziono pojedyncze błędy interpunkcyjne i stylistyczne, czasem utrudniające zrozumienie wywodu, np. a) „Jedynym ogólnie akceptowanym wzorem wydaje się być to, że patogen, który wykazuje kompatybilne oddziaływanie z danym gatunkiem żywiciela, maleje wraz z odległością filogenetyczną między gospodarzami”; b) „Zakażenie *E. alphitoides* stanowi istotny czynnik stresowy dla gatunków *Quercus robur* L., jednakże badania dotyczące reakcji fizjologicznych na zakażenie patogenem zostały zbadane tylko w kilku przypadkach”; c) „Filtry nie działają również niezależnie, prawdopodobieństwo spotkania potencjalnego patogena i rośliny, wpływa na selekcję roślin ulegających infekcji”. Zamiast pisać „...konstrytuwna emisja związków

lotnych występuje tylko w ograniczonym zakresie liczby gatunków ...”, lepiej myśl formułować następująco: konstytutywna emisja związków lotnych występuje tylko u niektórych gatunków. Takich niezgrabności stylistycznych jest w pracy kilkanaście.

Praca zawiera sprzeczne informacje na temat mączniaka dębu. We Wstępie na str. 12 Autorka pisze, że „Choroba powoduje zmniejszenie przyrostu, głównie młodych dębów, a przy corocznym występowaniu nawet ich zamieranie (Lesicz, 2005)”, a w Dyskusji: „Szybko rozwijająca się choroba mączniaka prawdziwego doprowadza do zajęcia znacznej powierzchni liści dębu przez patogen, jednak nie wpływa na zamieranie sadzonek. Na pewnym etapie infekcji, następuje powstrzymanie rozwoju choroby”.

W całej pracy Autorka dowolnie używa pełnych i skróconych nazw *Quercus robur* (*Q. robur*) oraz *Erysiphe alphitoides* (*E. alphitoides*). Wskazane jest konsekwentne stosowanie skróconych nazw obu gatunków w treści pracy, opisach tabel i rycin. Dowolność zapisu dotyczy również innych nazw gatunkowych używanych w pracy.

Zamieszczony na stronach 5. i 6. wykaz stosowanych skrótów nie zawiera wszystkich skrótów używanych w pracy. Brak jest następujących: PCD, ET, WRKY, PR, LOX, PUFA, RSNO, VOC, przy czym ten ostatni skrót zwykle jest zapisywany w postaci VOCs.

Pozostałe uwagi, dotyczące głównie stylu oraz możliwości zastosowania różnych analiz statystycznych w odniesieniu do konkretnych danych, zostały naniesione na tekst rozprawy.

Wnioski końcowe

Praca stanowi bogate źródło wiedzy na temat zmian zachodzących w liściach dębu szypułkowego po infekcji przez *E. alphitoides*, a uwzględnienie w badaniach aspektu czasowego i stopnia porażenia liści podnosi wartość uzyskanych przez Doktorantkę wyników. Szczegółowe dane na temat zmian biochemicznych w zdrowych liściach wnoszą bardzo wiele w poznanie fizjologicznych aspektów wzrostu dębu w pierwszym roku życia. Oryginalność podjętej tematyki, duża wiedza teoretyczna oraz wysokie umiejętności wykonawcze doktorantki wskazują na jej dojrzałość naukową. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca jest wartościowym opracowaniem i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w obowiązujących przepisach. Wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Moniki Anny Skwarek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

