



Lublin, 30.04.2017 r.

dr hab. Magdalena Staszczak
Zakład Biochemii
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Lublin

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Labuddy
pt. „Ekspresja arginazy i enzymów proteolitycznych *Arabidopsis thaliana*
w odpowiedzi na porażenie *Heterodera schachtii*”**

wykonanej w Katedrze Biochemii, Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
pod kierunkiem dr hab. Jolanty Marii Dzik

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowią dwa spójne tematycznie artykuły naukowe o charakterze prac badawczych, w których mgr Mateusz Labudda jest pierwszym autorem, opublikowane w 2016 roku w *Plant Pathology* oraz *Plant Physiology and Biochemistry* - czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR), o łącznym współczynniku wpływu *Impact Factor* IF: 5,311 (5-letni IF: 6,157) oraz sumie punktów MNiSW wynoszącej 70:

1. **Labudda M**, Różańska E, Cieśla J, Sobczak M, Dzik JM (2016a) Arginase activity in *Arabidopsis thaliana* infected with *Heterodera schachtii*.
[Plant Pathology](#) 65:1529–1538. doi:10.1111/ppa.12537
IF: 2.383 (2015); IF: 2.723 (5-letni); MNiSW: 35 (2016)
2. **Labudda M**, Różańska E, Szewińska J, Sobczak M, Dzik JM (2016b) Protease activity and phytocystatin expression in *Arabidopsis thaliana* upon *Heterodera schachtii* infection.
[Plant Physiology and Biochemistry](#) 109:416–429. doi:10.1016/j.plaphy.2016.10.021
IF: 2.928 (2015); IF: 3.434 (5-letni); MNiSW: 35 (2016)



Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej dotyczą enzymów o istotnym znaczeniu w metabolizmie azotu oraz w odpowiedzi roślin wyższych na infekcję pasożytniczą i stanowią bardzo dobrą dokumentację przeprowadzonych badań. Obie prace przeszły proces oceny dokonany przez niezależnych recenzentów, powoływanych przez redakcje tych renomowanych czasopism naukowych. Wkład mgr. Mateusza Labuddy w powstanie zaprezentowanych artykułów jest dominujący (55% - w przypadku publikacji w *Plant Pathology* oraz 60% - w przypadku publikacji w *Plant Physiology and Biochemistry*) i jak wynika z oświadczeń Doktoranta polegał na opracowywaniu koncepcji badań i zaprojektowaniu doświadczeń, wykonaniu większości analiz laboratoryjnych, opracowaniu graficznym i statystycznym oraz interpretacji wyników, napisaniu artykułów oraz przygotowaniu manuskryptów do procedur wydawniczych. Oświadczenia te wskazują, że mgr Labudda osiągnął efekty kształcenia przewidziane dla studiów III stopnia. Potwierdzeniem tego są dodatkowo załączone przez Autora streszczenia dwóch artykułów, niezwiązanych bezpośrednio z rozprawą doktorską, opublikowanych w trakcie studiów doktoranckich. Do rozprawy zostały załączone również oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy, określające procentowy wkład każdego z nich w powstanie tych prac (od 5% do 15%). Przedstawione oświadczenia stanowiły podstawę uznania przez mnie zaprezentowanego materiału jako rozprawy doktorskiej.

Rozprawę rozpoczynają jednostronicowe streszczenia w języku polskim i angielskim oraz napisany w przejrzysty sposób opis (liczący 16 stron), na który składają się trzy rozdziały zatytułowane: 1. Omówienie wyników na tle obecnego stanu wiedzy, 2. Summary, 3. Piśmiennictwo (79 pozycji). W rozdziale pierwszym Autor przedstawia w kolejnych syntetycznych podrozdziałach: 1.1. Przegląd piśmiennictwa, 1.2. Cel rozprawy, 1.3. Wyniki oraz 1.4. Podsumowanie. Na podstawie odpowiednio cytowanego piśmiennictwa światowego, którego blisko połowę stanowią prace z ostatnich pięciu lat, Doktorant umiejętnie przybliży wagę problemu badawczego, jakim jest dokładne poznanie zależności między pasożytami a roślinami żywicielskimi o istotnym znaczeniu rolniczym. Wskazuje na skalę strat powodowanych przez endopasożytnicze nicienie, do których należy mątwik burakowy *Heterodera schachtii*, żerujące na korzeniach ważnych roślin uprawnych, takich jak burak zwyczajny *Beta vulgaris*, kapusta warzywna *Brassica oleracea* czy też rzodkiewnik pospolity *Arabidopsis thaliana*, będący modelowym organizmem w badaniach nad infekcją roślin przez nicienie pasożytujące na korzeniach i pędach. Badania ostatnich lat prowadzone w różnych laboratoriach na świecie wskazują, że w reakcjach obronnych roślin przeciw pasożytom rolę mogą pełnić arginaza i peptydazy, enzymy metabolizmu (odpowiednio) aminokwasów i białek, których znaczenie wcześniej wykazano w wielu procesach wzrostu i rozwoju oraz w odpowiedzi na stresy abiotyczne.



Zasadniczym celem rozprawy, jasno sprecyzowanym, było sprawdzenie czy infekcja *Heterodera schachtii* zmienia w tkankach *Arabidopsis thaliana* ekspresję i aktywność arginazy oraz enzymów proteolitycznych. Stosowany w prezentowanych pracach warsztat badawczy, obejmujący różnorodne metody biochemiczne służące oznaczaniu poziomu metabolitów i aktywności enzymów, w tym z wykorzystaniem radioizotopów oraz metody molekularne jak sqRT-PCR i qRT-PCR, wskazuje na umiejętność planowania i prowadzenia przez Doktoranta eksperymentów z wykorzystaniem właściwych technik badawczych. W podrozdziale 1.3. rozprawy doktorskiej, stanowiącym omówienie oraz dyskusję wyników (str. 15-21) opisane zostały szczegółowo rezultaty badań z odniesieniem do każdej z publikacji załączonych w rozprawie. Oprócz poszerzenia wiedzy naukowej na temat złożonych interakcji pomiędzy pasożytem a rośliną żywicielską, prezentowane wyniki mają potencjalne znaczenie ekonomiczne.

W pierwszym artykule (załącznik nr 1) ujęto badania dotyczące ekspresji i aktywności arginazy. Badania przeprowadzono na roślinach *Arabidopsis thaliana*, których korzenie inokulowano larwami inwazyjnego stadium J2 *Heterodera schachtii*. Wykazano, że zmianie ulegała ekspresja dominującej w korzeniach izoformy arginazy I oraz dominującej w pędach izoformy arginazy II. Stwierdzono, że w porażonych korzeniach istotnie obniżona była ekspresja genu arginazy I oraz aktywność arginazy (prawdopodobnie na skutek obecności efektorów wydzielanych przez *H. schachtii*). Natomiast w pędach roślin porażonych nicieniem, ekspresja genu arginazy II była podwyższona w trzecim i siódmym dniu po inokulacji, przy czym aktywność arginazy była znacząco zwiększona wyłącznie w trzecim dniu po inokulacji, pomimo utrzymującego się wysokiego poziomu transkryptów arginazy II. Obserwowane w pędach zjawisko powiązано z powstawaniem stresu oksydacyjnego w odpowiedzi na porażenie. Wykazano, że od siódmego dnia po inokulacji w pędach roślin porażonych dochodzi do wyraźnej stymulacji ekspresji genów reduktazy glutationowej oraz do wzrostu aktywności reduktazy glutationowej. Ze zwiększoną ekspresją genów tego enzymu, ważnego dla zachowania równowagi redoks w komórkach, skorelowana była podwyższona znacznie (60-krotnie) zawartość proliny – aminokwasu działającego jako zmiatacz reaktywnych form tlenu.

Drugi artykuł wchodzący w skład rozprawy (załącznik nr 2) obejmuje badania dotyczące aktywności proteaz oraz ekspresji endogennych inhibitorów proteaz cysteinowych (fitocystatyn), u roślin *Arabidopsis thaliana* porażonych nicieniem cystowym *Heterodera schachtii*. Wykazano, że infekcja miała istotny wpływ na procesy proteolizy oraz ekspresję genów fitocystatyn w tkankach rośliny. W porażonych korzeniach obserwowano wyraźne obniżenie całkowitej aktywności proteolitycznej, przy jednoczesnym zwiększeniu aktywności niskocząsteczkowych oraz zależnych od jonów Ca^{2+} endopeptydaz cysteinowych. W pędach roślin porażonych mątwikiem burakowym zahamowanie całkowitej aktywności proteolitycznej stwierdzono



dopiero piętnastego dnia po inokulacji, co przypisano zmianom systemicznym wywołanym przez stres oksydacyjny wynikający z odpowiedzi *A. thaliana* na infekcję. Objawami stresu oksydacyjnego w pędach roślin porażonych, poza stwierdzonym wcześniej (w publikacji pierwszej) zwiększeniem aktywności reduktazy glutationowej i poziomu proliny, były obniżona zawartość białek rozpuszczalnych, wyższy poziom białek karbonylowanych oraz stymulacja syntezy związków o charakterze polifenoli. Zaobserwowano również, że po infekcji nicieniem dochodziło w syncytiach, korzeniach i pędach do zmian ekspresji genów fitocystatyn, które mogą brać udział w regulacji proteolizy w porażonych roślinach. Wykazane zmiany ekspresji mRNA fitocystatyn oraz zmiany aktywności enzymów proteolitycznych w korzeniach i pędach mają zdaniem Autora istotne znaczenie dla metabolizmu białek w roślinach porażonych nicieniami.

Z obowiązku recenzenta pozwalam sobie przedstawić drobne zapytania i uwagi, które nasunęły mi się po przeczytaniu rozprawy:

1. Znaczący udział Doktoranta w powstanie i napisanie artykułów stanowiących podstawę rozprawy, określony w Jego oświadczeniu, mógłby chyba pozwolić na wskazanie Go również jako autora korespondencyjnego, oprócz promotora rozprawy. Sytuacje, w których dwie osoby występują w charakterze autorów korespondencyjnych nie należą do rzadkości.
2. Streszczenie w języku polskim zawiera niezbyt precyzyjne sformułowanie „aktywność proteolityczna w pędach roślin porażonych była znacząco niższa” zamiast sformułowania „całkowita aktywność proteolityczna w pędach roślin porażonych była znacząco niższa”.
3. Rysunek 1 umieszczony w części opisowej rozprawy (podrozdział 1.1.) - „Uproszczony schemat katabolizmu L-argininy i jego proponowane powiązania z proliną i reduktazą glutationową w tkankach *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na porażenie *Heterodera schachtii*” jest przedstawioną w języku polskim wersją *Figure 7* z artykułu wchodzącego w skład rozprawy, opublikowanego w *Plant Pathology*. Wydaje się, że wskazane byłoby zatem odpowiednie odniesienie bibliograficzne pod Rysunkiem 1.
4. W podrozdziale 1.3 *Wyniki*, na stronie 16 powinno być „60-krotnie podwyższoną zawartością” zamiast „60-krotną podwyższoną zawartością”.
5. W artykule drugim wchodzącym w skład rozprawy (załącznik nr 2), dotyczącym aktywności proteaz oraz ekspresji fitocystatyn u roślin porażonych nicieniem cystowym *Heterodera schachtii*, w części opisującej materiały i metody, odnoszącej się do warunków hodowli *Arabidopsis thaliana* oraz



inokulacji larwami nicienia mogłaby być zacytowana publikacja Doktoranta z *Plant Physiology* (stanowiąca załącznik nr 1), która jest przywoływana również w innych miejscach tego artykułu.

6. W otrzymanej przeze mnie elektronicznej wersji rozprawy doktorskiej zapisanej na płycie CD nie były załączone skany oświadczeń autorów artykułów stanowiących rozprawę. Oświadczenie Doktoranta i oświadczenia pozostałych autorów określające ich wkład w powstanie rozprawy są zamieszczone jedynie w papierowej wersji pracy.

Powyższe nieliczne uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na końcową, wysoce pozytywną opinię o przedstawionej do recenzji pracy. Rozprawę doktorską mgr. Mateusza Labuddy oceniam jako bardzo wartościową. Doktorant wykazał się umiejętnością sformułowania problemu badawczego oraz właściwego doboru i opanowania metod niezbędnych do przeprowadzenia eksperymentów służących jego rozwiązaniu. Na podkreślenie zasługuje dobre zaprezentowanie bogatego materiału dokumentującego wyniki badań oraz dogłębne ich omówienie i dyskusja. Założony cel rozprawy został zrealizowany, a uzyskane wyniki dostarczają oryginalnych i naukowo wartościowych danych. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktoranta.

Wnioski końcowe

W oparciu o cenę indywidualnego wkładu mgr. Mateusza Labuddy w powstanie spójnego tematycznie zbioru opublikowanych artykułów, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej pt. „Ekspresja arginazy i enzymów proteolitycznych *Arabidopsis thaliana* w odpowiedzi na porażenie *Heterodera schachtii*” stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa ma wysoką wartość merytoryczną i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej Doktoranta i umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych. Spełnia ona wszystkie wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595; z późniejszymi zmianami) oraz w § 6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 września 2016 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2016 poz. 1586).

Z pełnym przekonaniem przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr. Mateusza Labuddy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Janeczka

