

Prof. dr hab. Paweł Sowiński

Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin

Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin

Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

02-096 Warszawa, Miecznikowa 1



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Irminy Wyrzykowskiej pt. „Rola czynników transkrypcyjnych MYB33, MYB65 i MYB101 w odpowiedzi roślin na niedobór wody”.

Jednym z głównych kierunków współczesnej biologii roślin jest problem odpowiedzi tych organizmów na biotyczne i abiotyczne stresy środowiskowe. Szczególne zainteresowanie badaczy budzą ścieżki przekazywania bodźców indukowanych stresami, jako że mogą one uruchamiać mechanizmy odporności roślin. W tym nurcie lokuje się recenzowana rozprawa doktorska mgr Anny Irminy Wyrzykowskiej pt. „Rola czynników transkrypcyjnych MYB33, MYB65 i MYB101 w odpowiedzi roślin na niedobór wody”. Rozprawa koncentruje się na czynnikach transkrypcyjnych wchodzących w skład ścieżki sygnałowej kwasu abscysynowego, ważnego regulatora odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne, w tym stres suszy. Praca stanowi kontynuację ważnych badań zainicjowanych w zespole prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej, promotor rozprawy.

Ocena formy rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z ośmiu głównych rozdziałów: Są to Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i perspektywy oraz Literatura. Główny tekst jest poprzedzony informacjami o finansowaniu, Wykazem skrótów oraz Streszczeniem w wersji polskojęzycznej i angielskojęzycznej. Spis treści zamieszczono na końcu pracy.

Wstęp jest stosunkowo krótki jak na rozprawy doktorskie (11 stron), czego nie traktuję jak wadę. Jest on zbudowany z podrozdziałów poświęconych poszczególnym zagadnieniom, do których odnosi się praca bezpośrednio (susza, rzodkiewnik, ziemniak, ścieżka sygnałowa ABA, czynniki transkrypcyjne z grupy MYB) lub jedynie pośrednio (białko CBP80, MIR159). Przegląd jest dość wyczerpujący, o czym świadczy też bardzo duża liczba cytowań – na 109 wymienionych w referencjach we wstępie przywołano 98 (a także dwa, które w referencjach pominięto, Nabors, 2004 – str. 7 oraz Lee and Luaon, 2012 – str. 9). Cel pracy (1/4 strony) jest raczej lakoniczny. Autorka odwołuje się jedynie do modelu z opublikowanej wcześniej pracy i wskazuje, że jej celem rozprawy jest weryfikacja zawartych w tym modelu hipotez. Pewnym ułatwieniem dla recenzenta

byłoby umieszczenie modelu w samym podrozdziale Cel pracy, a nie na poprzedniej stronie, w rozdziale Wstęp i zaznaczenie w podpisie, że pochodzi z pracy, do której odnosi się rozprawa, a także jakich zmian w tym modelu dokonano w stosunku do wersji pierwotnej (dodanie MYB65).

Materiały (10 stron) oraz Metody (15 stron) są bardzo wyczerpujące. Brakuje jednak w nich odnośników literaturowych do niektórych podejść eksperymentalnych (np. sposobu wywoływania suszy u roślin). Ponadto nie podano w referencjach dwóch przywołanych w tekście cytowań (Curtis i Grossniklaus, 2003 – str. 19 oraz Krzesłowska i Woźny, 1996 – str. 43). Brakuje też określenia, co oznacza powtórzenie biologiczne (osobne eksperymenty wykonywane jeden po drugim czy jedno duże prowadzone w tym samym czasie i podzielone na kilka partii).

Rozdział „Wyniki” jest obszerny (31 stron). Dość czytelnie przedstawia uzyskane wyniki, choć edycja niektórych figur utrudnia zrozumienie ich treści. Największy problem miałem z Fig. 17, nie tylko z powodu zamieszczenia całości na dwóch stronach, ale też przez niewłaściwą legendę dla osi rzędnych (Względna zawartość wody zamiast Apertura aparatów szparkowych). Również w opisie nazw mutantów znalazłem tu błędy (SALK-015981 zamiast SALK_015891 oraz SALK_03552 zamiast SALK_063552). Ponadto legenda i liczby w przypadku figur w rozdziale 5.12. są słabo czytelne, a opis osi rzędnych na figurze 34 jest podany w postaci skrótu (RWC zamiast Względna zawartość wody).

Dyskusja jest stosunkowo krótka (5 stron). Dużą część tego rozdziału zawierają rozważania niepowodzeń przy realizacji pracy, czego nie traktuję jako wadę, a raczej potwierdzenie reguły, że każda praca naukowa w dużej części składa się z porażek. Natomiast niedostatkami tego rozdziału jest niedokładne sprawdzenie tekstu pod względem językowym, przez co wkradły się tam – choć nieliczne – literówki oraz błędy stylistyczne i interpunkcyjne (np. str. 79). Ponadto, w referencjach zabrakło trzech przywołanych w Dyskusji cytowań (Rieder i Schreiber, 2001, Kerstens, 2006, Pallardy, 2008, wszystkie ze str. 78). Przy pewnych niedostatkach Dyskusji, klarownością stylu odznacza się rozdział Wnioski i perspektywy, gdzie zawarto podsumowanie pracy i kierunki dalszych badań.

Rozprawę kończy rozdział Referencje. Zapewne brak doświadczenia przy redakcji prac naukowych, a być może czasu spowodował, że spis literatury sporządzono dość chaotycznie od strony formalnej. Przede wszystkim nie zachowano jednolitego formatu cytowań. W niektórych przypadkach przy nazwiskach podawane są pełne imiona, w innych tylko inicjały. Co więcej, w przypadku kilku cytowań (12, 51, 53, 69, 88, 94, 95 – numery pozycji liczone przeze mnie), brak jest niektórych danych (numer tomu, nazwa czasopisma lub wydawnictwa). Ponadto, pozycja 91 (Shin i in., 2011) jest zdublowana, natomiast dla pozycji 34 (Izaurrealde i in., 1994), 47 (Lee i Luan,

2012) i 80 (Reinhart i in., 2002) nie znalazłem odwołań w tekście pracy (przeszukiwanie wykonałem ręcznie, więc nie wykluczam też swojej pomyłki).

Ocena merytoryczna rozprawy

Schemat eksperymentalny recenzowanej pracy oceniam jako czytelny i logiczny. Jak zaznaczono w rozdziale Cel pracy, badania były ukierunkowane na weryfikację hipotezy o roli trzech czynników transkrypcyjnych MYB33, MYB65 oraz MYB101 w odpowiedzi roślin na stres suszy. Wyniki pracy miały stanowić uzupełnienie wcześniejszej publikacji o roli białka CBP80/ABH1, w której Doktorantka była współautorką. Plan eksperymentów zakładał użycie mutantów *Arabidopsis thaliana* z deficytem ekspresji genów kodujących wymienionych czynników transkrypcyjnych. Spośród kilku wybranych do badań wstępnych, w dalszych pracach użyto po jednym mutancie dla każdego z trzech genów, przy czym dla genów *MYB33* i *MYB101* mutanty wykazywały jedynie obniżenie ekspresji, natomiast w przypadku mutant *MYB65* (SALK_063552) miał odpowiedni gen całkowicie wyciszony. Można się zastanawiać, czy wybór tego ostatniego mutantu był uzasadniony, skoro do dyspozycji był też mutant wykazujący jedynie obniżenie ekspresji (SALK_112364), a więc tak jak pozostałe dwa mutanty. Przy wyborze, jaki dokonano, mutant *MYB65* miał inny charakter mutacji niż dwa pozostałe, co mogło wpłynąć na fenotyp. Wątpliwość taka ma dodatkowe uzasadnienie w fakcie, że czynnik transkrypcyjny *MYB65* został niejako dodany do wcześniej badanych *MYB33* i *MYB101*. Ponadto, jak Autorka wspomina (str. 15), jego ekspresja jest lokalizowana w korzeniu i w liściu, podczas gdy pozostałych dwóch tylko w liściu. Może to wskazywać na odmienną regulację jego ekspresji. Tym bardziej więc należało przemyśleć sposób wyboru mutantów. Może rozwiązaniem byłoby użycie w badaniach dwóch mutantów genu *MYB65*, jednego wykazującego wyciszenie genu i jednego z deficytem ekspresji. Proszę się odnieść do tej uwagi podczas publicznej obrony. Kolejnym etapami badań było użycie mutantów *A. thaliana* i – osobno – ziemniaka z nadekspresją genów kodujących badane trzy czynniki transkrypcyjne. Ta część badań wymagała od Doktorantki dużej pracy nad uzyskaniem odpowiednich roślin transgeniczných. Nie udało się uzyskać wszystkich linii, jakie były w planach, niemniej wysiłek koncepcyjny i laboratoryjny włożony w ten element badań należy ocenić wysoko.

Oprócz prac molekularnych, ważną częścią rozprawy są analizy fizjologiczne stanu badanych roślin. Analizy ukierunkowane na ocenę tolerancji suszy objęły obserwacje zmian w wyglądzie roślin w trakcie pogłębiającego się stresu wodnego oraz oznaczenia względnej zawartości wody. Natomiast podłoże zmian tolerancji na susze mutantów badano na podstawie oceny liczby aparatów na dolnej i górnej stronie liścia, liczby trichomów na górnej stronie liścia, wrażliwości na

zewnątrznie podawany ABA na podstawie apertury aparatów szparkowych, a także grubości kutykuli na ultra-cienkich preparatach EM. Generalnie, zastosowane metody są adekwatne do celu badań. Można się jedynie zastanawiać, dlaczego Doktorantka skupiła się wyłącznie na liściu? Tolerancja suszy może być oczywiście związana z ograniczaniem strat wody (liczba i funkcjonowanie aparatów szparkowych, grubość kutykuli), ale też ze sprawnością pobierania wody (m.in. całkowita długość korzeni) i transportu wody z korzeni do pędu (przekrój ksylemu). Ocena parametrów odnoszących się do podaży wody z korzeni jest prosta i mogła być bez trudności wykonana z użyciem metod stosowanych w rozprawie (m.in. techniki obrazowania i mikroskopii elektronowej), a zbadanie roli korzeni i ksylemu w omawianym przypadku mogłoby przynieść ciekawe wyniki w kontekście wzoru tkankowego ekspresji czynnika transkrypcyjnego MYB65. Proszę omówić przyczyny nieuwzględnienia strukturalnych aspektów budowy rośliny związanych z gospodarką wodną od strony podażowej.

Osobnym problemem budzącym pewne wątpliwości jest analiza statystyczna wyników. Autorka podaje, że użyła testu Studenta, a także policzyła średnie i odchylenia standardowe. Trzeba jednak zaznaczyć, że takie podejście może nie być uzasadnione w przypadku wartości względnych: procentowych (np. RWC) lub zawierających się w zakresie 0 – 1 (np. apertura aparatów szparkowych). Zastosowanie takich testów, jak Studenta zakłada rozkład normalny danych, a w przypadku danych względnych regułą jest, że dane takiego rozkładu nie mają. Przede wszystkim więc, przed przystąpieniem do analiz statystycznych należałoby sprawdzić odpowiednim testem rodzaj rozkładu. Czy wykonano taki test? Jeśli nie, lepiej by było dane względne poddać jakiemuś rodzajowi transformacji (np. Blissa lub logarytmicznej) dla znormalizowania rozkładu i dopiero wykonać analizy. W łagodniejszej formie zastrzeżenie to dotyczy danych z zakresu 0 – 20% oraz 80 – 100%. Innym rozwiązaniem jest wykonanie analizy wariancji z użyciem betaregresji, co eliminuje konieczność transformacji danych. Moje zastrzeżenia nie mają na celu dyskwalifikacji wniosków opartych na danych fizjologicznych pokazanych w rozprawie, bo większość różnic czy trendów zmian fizjologicznych i anatomicznych zaobserwowanych przez Doktorantkę jest oczywista bez żadnych analiz statystycznych. Patrząc jednak na te dane dochodzę do wniosku, że wykonując analizę wariancji (z użyciem betaregresji) i stosując analizy typu post-hoc Autorka mogłaby ze swoich wyników wydobyć dużo więcej informacji, np. o różnicach między mutantami.

Oprócz tych ogólnych uwag, mam też szczegółowe pytania odnośnie analizy statystycznej. Nie rozumiem, jak to możliwe, że na Fig. 17 (str. 55), różnica w aperturze aparatów szparkowych dla mutantu SALK_015891 przy stężeniu 0,1 μ M ABA jest istotna statystycznie (i to silnie), skoro w tym punkcie krzywe dla kontroli i mutantu się przecinają? Zbliżony problem widzę dla tego samego parametru w przypadku mutantu SALK_063552 przy stężeniu 5 μ M ABA.

Podsumowanie

Podniesione przeze mnie niedociągnięcia pracy oceniam nie obniżają mojej ogólnie dobrej oceny. Wytknięte błędy redakcyjne i literaturowe są dość typowe dla rozpraw doktorskich i wynikają z braku doświadczenia, a zapewne i czasu podczas przygotowywania rozprawy.

Pracę odbieram pozytywnie ze względu na spójny i logiczny układ eksperymentalny odnośnie badania roli czynników transkrypcyjnych MYB33, MYB65 oraz MYB101 w odpowiedzi *Arabidopsis thaliana* i ziemniaka na stres suszy. Doktorantka wykazała się odpowiednim poziomem wiedzy teoretycznej, zdolnością opanowania technik molekularnych, oraz umiejętnością syntezy naukowej. Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia też wszystkie kryteria formalne wymagane dla dysertacji doktorskiej. Wnioskuje więc o dopuszczenie mgr Anny Irminy Wyrzykowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 2.03.2019

prof. dr hab. Paweł Sowiński

