

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 Magdaleny Czołpińskiej pt. „Reakcja kalafiora (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*)” na stres termiczny. Wielopoziomowa charakterystyka ze szczególnym uwzględnieniem białek bogatych w glicynę wiążących RNA (GRPs).

Recenzja została sporządzona w związku z pismem z dn. 11.08.2020 r. podpisanym przez prof. UAM dr. hab. Marka Kasprowicza, prodziekana ds. rozwoju Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o powołaniu mnie na recenzenta przez Radę Dyscypliny Nauk Biologicznych UAM w Poznaniu.

Problem reakcji roślin na stresy środowiskowe stanowi jeden z głównych tematów badań i o ile podstawy fizjologiczne takich reakcji są już stosunkowo dobrze poznane, to mechanizmy molekularne jeszcze dość słabo. Tematyce tej jest poświęcona rozprawa doktorska, której autorką jest mgr Magdalena Czołpińska. Praca powstała pod opieką naukową prof. UAM dr hab. Michała Rurka oraz promotor pomocniczej dr Anny Kasprowicz-Maluśki.

Projekt naukowy, który stał się podstawą recenzowanej rozprawy został zakreszony bardzo szeroko. Uwzględniono w nim badania stanu fizjologicznego roślin traktowanych stresem niskiej i wysokiej temperatury, stosując m.in. współczesne narzędzia oceny efektywności aparatu fotosyntetycznego oraz bilansu azotu oparte o pomiary fluorescencji liścia w różnych zakresach światła wzbudzenia. Natomiast w badaniach molekularnych reakcji kalafiora na stres temperaturowy użyto nowoczesnych technik wielkoprzepustowych charakteryzując zmiany na poziomie transkryptomycznym, proteomicznym i metabolomicznym. Opis ten uzupełniono skupiając się na wybranych genach i białkach z grupy GRP (glycine-rich proteins) potencjalnie zaangażowanych w reakcje roślin na stresy abiotyczne i biotyczne.

Uwagi formalne

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych i w jej skład wchodzi siedem głównych rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiały, Metody,

Wyniki, Dyskusja oraz Podsumowanie wyników. Tekst główny jest poprzedzony Spisem treści, Spisem skrótów, Streszczeniami w języku angielskim i polskimi oraz uzupełniony Wykazem Rycin i Tabel, oraz Piśmiennictwem. Do manuskryptu dołączono kopie trzech artykułów, w których Doktorantka jest współautorką. Są one mniej lub bardziej związane z tematyką rozprawy.

Uwagi redakcyjne

Rozprawa jest napisana czytelnie, mimo że niekiedy konieczne było stosowanie technicznego języka z użyciem specjalistycznej terminologii. W tekście obecne są nieliczne błędy językowe. Redakcyjnie praca również nie budzi dużych zastrzeżeń. Znalazłem kilka błędów w cytowaniu literatury, co jest typowe dla prac dyplomowych redagowanych przez niedoświadczonych autorów. I tak w tekście brakuje następujących cytowań podanych w Piśmiennictwie: Chalker-Scott, 1999, Close, 1997, Luczak i wsp., 2016, Narayanan i wsp., 2016, oraz Yang i wsp., 2006. Ponadto kilka pozycji nie zostało rozróżnionych literami a i b. W efekcie trudno jest rozróżnić, do której z dwóch pozycji piśmiennictwa odnosi się pojedyncze cytowanie w tekście. Dotyczy to następujących odnośników: Guo i wsp., 2015, Li i wsp., 2019, Liu i wsp., 2013, Rurek i wsp., 2018, Zhang i wsp., 2013, Zhu i wsp., 2013.

Ocena merytoryczna

Projekt doktorski, który stał się podstawą recenzowanej rozprawy nie był oparty na żadnej hipotezie roboczej, więc siłą rzeczy dostarczył jedynie opisu zachodzących zjawisk. W naukach eksperymentalnych (i nie tylko) stawianie i falsyfikowanie hipotez stanowi od XVII w. podstawę stosowania metody naukowej i warunek postępu wiedzy. Takie podejście nie jest jednak powszechne i niektórzy pracownicy naukowci traktują katalogowanie i opis jako wartościowe narzędzia badawcze. Pogląd taki jest często wyrażany mniej lub bardziej wprost przez naukowców stosujących techniki wielkoprzepustowe. Przy takim podejściu często uważa się, że ogromna liczba danych poddanych rozbudowanej analizie statystycznej i bioinformatycznej tworzy nową jakość. Osobiście nie jestem zwolennikiem takiego poglądu i mam przekonanie oparte o swoje doświadczenie badawcze, że projekty wielkoprzepustowe mogą być z powodzeniem użyte do falsyfikowania hipotez roboczych. Warunkiem jest tylko nowatorski pomysł badawczy i odpowiednie zaprojektowanie eksperymentu. Mimo takiego przekonania mam świadomość jak wiele projektów wielkoprzepustowych nieopartych o żadną

hipotezę zostało opublikowanych, i to w niezłych pismach. Przy moich zastrzeżeniach przyjmuję więc, że recenzowana rozprawa miała dostarczyć opisu zmian na poziomie transkryptomycznym, proteomicznym i metabolomicznym w roślinach pooddawanych stresom niskiej i wysokiej temperatury i zadanie to zostało wykonane. Zabrakło mi przy tym głębszej analizy danych wielkoprzepustowych, opartych choćby o takie narzędzia jak analiza sieci powiązań między genami czy szlaków metabolicznych. Od kilku już lat istnieją bardzo dobre, niekomercyjne platformy do takich analiz (np. Cytoscape). W przypadku analizy sieci powiązań, ma ona sens gdy wytypowanych DEG jest wiele, a szczególnie jeśli wśród nich znajdują się liczne czynniki transkrypcyjne. W przypadku kalafiora analizy byłyby ułatwione dzięki temu, że gatunki rodzaju Brassica są blisko spokrewnione z Arabidopsis, a więc rośliną modelową (rodzina Brassicaceae), dla której istnieje bardzo dużo danych molekularnych. Przy zastrzeżeniach do założeń projektu doktorskiego doceniam jednak próbę wyjścia poza prosty opis zmian na poziomie molekularnym w materiale roślinnym w warunkach stresu w postaci analizy udziału białek z grupy GRP w reakcji kalafiora na stres temperaturowy, popartą ciekawą dyskusją.

Przyjmując do wiadomości podejście naukowe leżące u podstaw recenzowanej rozprawy mam jednak szereg uwag krytycznych i wątpliwości odnośnie metodyki badań i jej opisu, a te elementy decydują o wartości projektu naukowego. Poniżej przedstawiam moje główne uwagi.

1. Materiał badawczy

a. Podstawowym materiałem badawczym jest kalafior odmiany handlowej Oviedo. Autorka określiła tę odmianę jako średnio wczesną. Natomiast informacje handlowe o tym materiale, które łatwo uzyskać w internecie, określają ją, jako (cytuję za opisem odmiany) „super wczesną, nienadającą się do uprawy w późniejszych terminach ze względu na dużą wczesność oraz brak odporności na długie dni”. Jednocześnie w opisie warunków wzrostu w komorze hodowlanej określono fotoperiod jako 16 h/8 h, co standardowo jest przyjmowane jako warunki długiego dnia. Oznacza to, że rośliny podczas wzrostu pozostawały w fazie wegetatywnej i w zasadzie nie powinny wchodzić w fazę generatywną. Proszę o wyjaśnienie dlaczego wybrano fotoperiod niezgodny z właściwościami odmiany. Jak też wytłumaczyć, że mimo warunków długiego dnia podczas wzrostu rośliny tworzyły jednak zawiązki kwiatów?

b. W charakterystyce Odmiany Oviedo znajduje się też wzmianka o jej (cytuję za opisem odmiany) „wysokiej odporności na niekorzystne warunki uprawy – wahania temperatury wiosną”. Proszę więc uzasadnić wybór tej odmiany do badań stresu niskiej i wysokiej temperatury. Czy były wykonywane jakies badania wstępne mające na celu wybór materiału do projektu?

2. Schemat eksperymentu

W badaniach użyto kilku metod wielkoprzepustowych, ale schemat eksperymentalny był wspólny: rośliny wyprowadzone w warunkach optymalnych dla wzrostu (fotoperiod 23°C/19°C, wilgotność względna 70%, natężenie światła 200 $\mu\text{mol kwantów} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) poddawano działaniu niskiej temperatury (10°C) przez 10 dni bądź wysokiej temperatury (42°C) przez cztery godziny, przy czym w przypadku sekwencjonowania transkryptomu stresem była wyłącznie wysoka temperatura. Po zakończeniu traktowania roślin stresem przenoszono je ponownie do warunków kontrolnych.

W obu przypadkach okres traktowania stresem określono jako aklimatyzację natomiast okres odrostu jako de-aklimatyzację. Taka terminologia budzi pewne zastrzeżenia. Aklimatyzację definiuje się jako przygotowanie organizmu do silnego stresu gdy działa nań słabszy stres. Aklimatyzacja polega na modyfikacji metabolizmu i funkcjonowania organizmu, co wymaga pewnego czasu, co najmniej kilku dni, a najczęściej więcej, zależnie od gatunku, typu stresu i jego nasilenia. Aby stwierdzić, czy aklimatyzacja zaszła, należy ocenić tolerancję na bardzo silny stres po okresie aklimatyzacji w warunkach słabego stresu w porównaniu do tolerancji stresu o dużym natężeniu bez okresu aklimatyzacji. Tego w rozprawie nie wykonano, więc przyjęcie, że stosowany stres spowodował indukcję aklimatyzacji było czysto arbitralne. Można oczywiście założyć, że w przypadku chłodu takie zmiany zaszły, gdyż stres ten trwał stosunkowo długo, a siła stresora była mała. Natomiast nie wydaje się możliwe, aby bardzo silny, właściwie letalny, stres wysokiej temperatury w krótkim czasie mógł wywołać inną odpowiedź rośliny niż tylko reakcję alarmu, bez indukcji aklimatyzacji. Proszę się odnieść do tej uwagi podczas publicznej obrony.

Osobny, choć drobniejszy problem widzę w zniesieniu podczas chłodzenia termoperiodu, jak bowiem wynika z opisu rośliny były wtedy trzymane w stałej temperaturze (10°), co mogło stanowić dodatkowy stres dla roślin i nie widzę dla takiego podejścia żadnego uzasadnienia. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego podczas chłodzenia nie zachowano termoperiodu.

3. Wyraźnym niedociągnięciem rozprawy jest bardzo niejasne przedstawienie informacji o powtórzeniach biologicznych i technicznych bądź nawet brak takiej informacji.

Wymogiem eksperymentalnych prac naukowych jest podanie na tyle jasnego opisu metodyki, aby można było ocenić wiarygodność przeprowadzonych badań, a nawet je powtórzyć. Informacje takie obejmują między innymi liczbę powtórzeń biologicznych (liczba niezależnych eksperymentów, liczba obiektów eksperymentalnych w ramach pojedynczego eksperymentu) oraz technicznych (powtórzenia oznaczeń tej samej próby). Dobra praktyka nakazuje też umieścić te dane w części opisującej metodykę, a także w skróconej formie w podpisach do figur.

a. W zasadzie jedynie w przypadku sekwencjonowania RNA podano, że, cytuję „Przygotowano po 3 powtórzenia każdego wariantu doświadczalnego” (str. 51). Jednak nie wiadomo, czy to były niezależne eksperymenty biologiczne (np. rozdzielone czasowo), czy rośliny zbierane z jednego eksperymentu. W innym miejscu (str. 54), informacja dotycząca analizy proteomu wskazuje jedynie, cytuję, że „Każdą próbkę przygotowano do strawienia w dwóch powtórzeniach”. Ale nie wiadomo czy próbki pochodziły z tej samej puli materiału biologicznego czy też z różnych. Pewną wskazówkę można znaleźć w części Wyniki, gdzie w odniesieniu do badań proteomicznych podano (str. 91) wartości współczynnika korelacji w odniesieniu do trzech powtórzeń technicznych i trzech powtórzeń biologicznych. Natomiast w przypadku analiz metabolomicznych jedyna wzmianka, jaką znalazłem podaje, że: „każdą próbkę przygotowano w dwóch powtórzeniach” Tu też nie wiadomo, o jaki materiał chodzi.

b. Odnośnie części fizjologicznej informacji o powtórzeniach biologicznych i technicznych w ogóle nie podano. Można się jedynie domyślać na podstawie diagramów pokazanych w części Wyniki, że pomiary wykonywano z użyciem dwóch liści. Dodatkowo w tekście (str. 66) podano, że był to liść młodszy i starszy, bez określenia, co to oznacza, a także, ile liści każdego typu zmierzono (powtórzenia biologiczne) i ile pomiarów wykonano dla każdego liścia (co należy traktować jako powtórzenia techniczne). Pomijam już kwestię analiz mikroskopowych, gdzie nie podano żadnych informacji o powtórzeniach, choćby o liczbie analizowanych obrazów.

Podczas publicznej obrony proszę o podanie kompletnych informacji o powtórzeniach biologicznych i technicznych.

4. Drobne uwagi

a. W rozprawie niezbyt precyzyjnie określono, co jest kontrolą. Jest to szczególnie ważne w przypadku stresu niskiej temperatury, gdyż trwał on 10 dni, a więc stosunkowo długo w odniesieniu do okresu wzrostu roślin (30 dni). Czy kontrolą były rośliny wiekowo równe tym sprzed rozpoczęcia chłodzenia czy po zakończeniu? A może z innego terminu? I czym się kierowano przy wyborze terminu pobrania materiału kontrolnego?

b. W rozprawie zabrakło też określenia pory, w której rozpoczynano działanie stresu, prowadzono pomiary fizjologiczne oraz pobierano materiał. Wszystko to ma znaczenie w kontekście silnego uzależnienia roślin od cyklu dobowego (por. Wstęp recenzowanej rozprawy). Proszę o uzupełnienie tych danych podczas obrony.

Podsumowanie

Podniesione przeze mnie niedociągnięcia nie obniżają mojej raczej pozytywnej oceny pracy. Wytknięte błędy redakcyjne i literaturowe są dość typowe dla rozpraw doktorskich. Dużo poważniejsze uwagi dotyczące założeń w pracy oraz schematu eksperymentalnego sformułowałem, aby skłonić Doktorantkę do przemyśleń odnośnie dalszych kierunków badań, sposobu publikowania wyników rozprawy, a także dla sprowokowania dyskusji naukowej

Rozprawa spełnia podstawowe wymogi odnośnie prac doktorskich. Mgr Magdalena Czołpińska wykazała się dużą wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, szczególnie przy analizie danych eksperymentów wielkoprzepustowych. Co więcej, rozprawa dostarcza oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, szczególnie jeśli chodzi o udział białek z rodziny GRP w reakcji na stres temperaturowy u kalafiora. Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia też kryteria formalne wymagane dla dysertacji doktorskiej. Wniosuję więc o dopuszczenie mgr Magdaleny Danuty Czołpińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 28.09.2020

prof. dr hab. Paweł Sowiński

