

Prof. dr hab. inż. Elwira Śliwińska
Pracownia Biologii Molekularnej i Cytometrii
Katedra Biotechnologii Rolniczej
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich
al. Kaliskiego 7
85-789 Bydgoszcz

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Marleny Stawskiej
pt. „**Rola wybranych elementów szlaku sygnałowego światła w regulacji
kiełkowania nasion *Arabidopsis thaliana***”

Praca została wykonana w Katedrze Fizjologii Roślin SGGW w Warszawie, z wykorzystaniem finansowania pochodzącego z dwóch grantów Narodowego Centrum Nauki. Potwierdza to wysoką wartość merytoryczną przeprowadzonych badań. Wyniki zostały zaprezentowane na międzynarodowych i krajowych konferencjach w postaci czterech prezentacji ustnych i dwóch plakatów.

I. Uwagi ogólne

Na kiełkowanie nasion składa się wiele procesów, które od lat są badane przez licznych naukowców. Jednakże pomimo wysiłków wielu grup badawczych i stosowania coraz bardziej zaawansowanych metod biologii molekularnej, ciągle nie są one całkowicie poznane. Często badania podłoża genetycznego, szlaków metabolicznych i sygnałowych oraz fizjologii kiełkowania prowadzi się z wykorzystaniem gatunku modelowego, jakim jest rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*), dla którego dostępne są liczne mutanty, a także łatwo poddaje się on transformacji genetycznej. Również w tej pracy został on wybrany przez Doktorantkę do Jej badań dotyczących roli światła w regulacji kiełkowania.

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska zawiera 203 strony maszynopisu, w tym 44 rysunki (jako rysunki oznaczone są zarówno wykresy jak i fotografie i rysunki; bardziej prawidłowo byłoby nazywać je zatem rycinami). Praca poprzedzona jest „Streszczeniem” i „Spisem skrótów”, a zasadnicza treść pracy została przedstawiona w 8 rozdziałach, podzielonych na liczne podrozdziały, niekiedy czwartego, a nawet piątego rzędu. W niektórych podrozdziałach są dodatkowo nienumerowane, oddzielnie zatytułowane części.

Tak złożona struktura wynika prawdopodobnie z wielu wykonanych doświadczeń i chęci ułatwienia czytelnikowi ich uporządkowania. Układ pracy odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim, a proporcja poszczególnych rozdziałów jest właściwa. Spis literatury obejmuje 266 pozycji, z których jedynie 8 jest w języku polskim, a reszta w angielskim. Zawiera też prace najnowsze, z ostatnich kilku lat. Na końcu pracy znajdują się załączniki weryfikujące uzyskany do badań materiał oraz przedstawiające sprawdzenie oceny ilościowej karbonylowanych białek, co potwierdza dbałość o wiarygodność przeprowadzonych badań.

W przeprowadzonych doświadczeniach, wykorzystujących jako materiał badawczy nasiona rzodkiewnika typu dzikiego (WT) z różną głębokością spoczynku, a także mutanty i transformanty, Doktorantka podjęła wyzwanie scharakteryzowania funkcji niektórych genów uczestniczących w szlaku sygnałowym światła oraz interakcji między ścieżką sygnałową światła a metabolizmem i transdukcją sygnałów indukowanych przez ROS, ABA i GA w czasie kiełkowania.

II. Uwagi szczegółowe

W części wstępnej Doktorantka przedstawiła na 25 stronach przegląd literatury, wykazując się bardzo dobrą orientacją w aktualnym stanie wiedzy związanej z prowadzonymi badaniami. Nie może to dziwić, biorąc pod uwagę, że Doktorantka jest współautorką trzech publikacji przeglądowych o podobnej tematyce, które ukazały się w latach 2015-2018 w *Postęпах Biologii Komórki*. Mam jedynie uwagę dotyczącą wzrostu wydłużeniowego osi zarodkowej w II fazie kiełkowania (w I się nie wydłużają, jest tylko fizyczne pobieranie wody, czyli pęcznienie/imbibicja). Otóż w świetle ostatnich badań wiadomo, że najbardziej intensywnemu wydłużaniu ulegają komórki strefy przejściowej między korzeniem i hipokotylem (o której Doktorantka nie wspomina, a warto na nią zwrócić uwagę w kontekście aktywności różnych procesów w trakcie kiełkowania) oraz dolnej części hipokotyla, a nie komórki korzenia zarodkowego. Zatem stwierdzenie „Wzrost wydłużeniowy komórek korzenia zarodkowego *A. thaliana* wywołuje ucisk na tkanki bielma i łupiny nasiennej, co w pierwszej fazie kiełkowania skutkuje pęknięciem łupiny nasiennej, a następnie prowadzi do przebicia warstw komórek bielma zachodzącej w drugiej fazie kiełkowania” (s. 21) jest nieścisłe. Ta sama uwaga dotyczy „Dyskusji” (s. 160 i 161) i wniosku 2I. Dla ścisłości chciałam też zwrócić uwagę, że ściana komórkowa nie jest organellum (s. 42).

W kolejnym rozdziale Doktorantka jasno określiła główny cel pracy oraz liczne szczegółowe pytania badawcze, którym podporządkowała strukturę dalszych rozdziałów. W rozdziale „Materiały i metody” szczegółowo opisała zarówno materiał doświadczalny jak i

stosowane metody. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka sama wytworzyła linie transgeniczne do swoich badań, co nie jest łatwym wyzwaniem. Do przeprowadzenia badań użyła zaawansowanych metod biologii molekularnej, takich jak qRT-PCR, immunoblotting czy spektrofotometrię. Z opisu wynika, że przeprowadziła doświadczenia niezwykle rzetelnie. W opisie testów kiełkowania zabrakło jedynie informacji, jaka była wilgotność bibuły, na której kiełkowały nasiona. Z podrozdziału „Bioinformatyka i statystyka” nie dowiadujemy się jednak, jakie metody statystyczne zastosowano do opracowania uzyskanych danych. Jest jedynie informacja, że do obliczeń wykorzystano program Statistica. Powinien tu być określony model doświadczenia i wymienione stosowane metody. Wobec niezupełnie jasnych opisów i oznaczeń na rycinach i w tytułach tabel w rozdziale „Wyniki”, domyślam się jedynie, że do analizy wyników użyto pojedynczej analizy wariancji, a gdy ona wykazała istotność różnic stosowano testy post hoc Duncana, Tukeya lub t-Studenta. Mam jednak wątpliwość, czy w obliczeniach, gdzie przeprowadzono porównanie do kontroli rzeczywiście stosowano test Tukeya lub Duncana (wyznaczające grupy jednorodne), jak jest zaznaczone w opisie do rycin i tabel (np. Rys. 10, 11, Tab. 26, 27), ponieważ do tego rodzaju porównań stosuje się test Dunnetta.

W konsekwencji rozdział „Wyniki”, liczący 55 stron, jest nieco słabszym rozdziałem pracy i przy przygotowaniu publikacji radziłabym skorzystać z pomocy statystyka do opracowania i zinterpretowania tej dużej ilości wyników z różnych doświadczeń. Trudność w zrozumieniu i śledzeniu tego rozdziału wynika także z niejednolitego sposobu zaznaczania istotności różnic statystycznych; na niektórych rycinach czy w tabelach jest ona zaznaczona literami, podczas gdy na innych gwiazdkami. Przy oznaczaniu grup jednorodnych po zastosowaniu testu Duncana warto zwrócić uwagę, aby litery używane były zgodnie z przyjętą tu zasadą, że litera „a” przypisana była do wartości najmniejszych i kolejne litery do większych. Na niektórych wykresach wystąpiły drobne błędy, które jednak nie wpłynęły na interpretację wyników w tekście. Rys. 8 jest słabo czytelny i lepiej byłoby przedstawić te dane na trzech rycinach, oddzielnie dla każdego rodzaju nasion; wydaje się, że statystykę tak właśnie przeprowadzono. Zamiast sformułowań „nasiona wykiełkowały w xx%”, bardziej prawidłowo byłoby napisać „wykiełkowało xx% nasion”. Należy również unikać opisywania różnic, które są nieistotne statystycznie, ponieważ brak istotności oznacza, że omawiana zależność nie została potwierdzona. Warto byłoby natomiast przeprowadzić wieloczynnikową analizę wariancji, która umożliwiłaby na przykład porównanie efektu hamowania kiełkowania przez ABA, DPI i PAC, które jest opisywane, ale bez poparcia statystycznego. Nie znalazłam także wyjaśnienia, dlaczego w jednym doświadczeniu różne nasiona lub te same nasiona, ale kiełkujące w różnych warunkach świetlnych były traktowane niejednakowym zestawem substancji wpływających na kiełkowanie. Np. na Rys. 10: nasiona kiełkujące na świetle były traktowane PAC, a nie były NOR, podczas gdy te kiełkujące w ciemności odwrotnie.

Niezupełnie jasny jest też współczynnik wrażliwości. Ponieważ nie jest on powszechnie znany, jego sposób obliczania i interpretacji powinien być się znaleźć w części „Materiał i metody”. Dość skomplikowany wzór jest podawany w tytułach tabel, ale ponieważ to wielokrotny iloraz, warto byłoby go podać w zapisie matematycznym. Na podstawie tabel i opisu trudno też dociec, w jakim zakresie może on występować i co oznacza jego odpowiednia wartość. Np. komentarz „różnice były dwukrotne” dotyczy zarówno jego wartości 0,34 jak i 0,63 (s. 119), a „10-20-krotnej różnicy” odpowiadają wartości 0,1 i 0,04. W dalszej części rozdziału Doktorantka przypisuje różnicom wartości procentowe, co dodatkowo utrudnia zrozumienie interpretacji tego współczynnika.

Przy interpretacji wyników analizy aktywności promotorów *HY5*, *HYH* i *HFR1* w transgenicznym zarodkach radziłabym zwrócić uwagę na wspomnianą wcześniej strefę przejściową między korzeniem zarodkowym a hipokotylem, bo wyraźnie się tam wyróżnia. Chciałabym też zwrócić uwagę na prawidłowe używanie pojęcia „imbibicja”. Zgodnie z definicją, imbibicja to początkowe stadium kiełkowania, polegające na pobieraniu wody z otoczenia przez suche nasienie, a więc nie można o niej mówić w fazie pęknięcia bielma (ER; s. 108), kiedy już toczą się aktywnie procesy biochemiczne i fizjologiczne; na tym etapie po rozpoczęciu imbibicji powinniśmy nazywać to kiełkowaniem, a konkretnie drugą fazą kiełkowania. Również, prawidłowym terminem dla badanych tu parametrów jest „liczba nasion”, a nie „ilość nasion”.

Pomimo tych niejasności statystycznych Doktorantce udało się przedstawić „Dyskusję”, zawartą na 34 stronach, logicznie i w sposób uporządkowany. Stara się w niej przedstawić możliwie wyczerpujące odpowiedzi na postawione sobie pytania badawcze. W tym celu kompiluje wyniki własne i literaturowe, jasno przy tym przekazując, które z jej badań są nowe, a które potwierdzają dotychczasowe doniesienia. Szczególnie nowatorskie są badania dotyczące wpływu światła niebieskiego na kiełkowanie nasion z różną głębokością spoczynku, które Doktorantka zapoczątkowała w swojej pracy magisterskiej. Stwierdza, że ten rodzaj światła stymuluje kiełkowanie nasion WT S (spoczynkowych) i wysuwa hipotezę, że stymulacja ta zależy od aktywności białka CRY i/lub PHY. Badając poziom wybranych transkryptów Doktorantka wnioskuje, że światło to stymuluje kiełkowanie poprzez bezpośrednie hamowanie biosyntezy ABA oraz hamowanie ekspresji poszczególnych elementów transdukcji sygnału ABA. Po raz pierwszy w tej pracy opisano też rolę gibereliny (GA) w regulacji kiełkowania *A. thaliana* w świetle niebieskim. Ponadto oceniono zależności pomiędzy zastosowaniem w czasie kiełkowania światła niebieskiego i białego a metabolizmem i transdukcją sygnału ROS w komórkach, a także rolę czynników transkrypcyjnych *HY5*, *HYH* i *HFR1* w kiełkowaniu w zależności od warunków świetlnych. Niektórych stwierdzeń nie byłam w stanie w pełni zweryfikować ze względu na wspomniane wyżej wątpliwości związane ze statystyką, ale jestem pewna, że przy przygotowywaniu

publikacji, których pewnie powstanie z tego obszernego materiału kilka, statystyka będzie już przygotowana w sposób niebudzący wątpliwości potencjalnych recenzentów.

Pracę podsumowują 2 wnioski, z których drugi jest podzielony na 14 podpunktów. Wnioski dobrze podsumowują przedstawione wyniki tych obszernych badań. Mam tylko jedną drobną uwagę w odniesieniu do wniosku 2g; aby móc go potwierdzić należałoby przeprowadzić wieloczynnikową analizę wariancji, a z przedstawionych wyników nie mogłam jednoznacznie wywnioskować, czy taka została wykonana.

Przedstawione uwagi krytyczne nie obniżają wartości merytorycznej pracy, a mają jedynie charakter uściślający i mogą być wykorzystane do przygotowania publikacji lub dyskusji w czasie publicznej obrony pracy doktorskiej.

III. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Marleny Stawskiej pt. „Rola wybranych elementów szlaku sygnałowego światła w regulacji kiełkowania nasion *Arabidopsis thaliana*” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i przedkładam wniosek do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.



Bydgoszcz, 16.03.2019 r.