



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Eksperymentalnej
i Biotechnologii Roślin
Zakład Ekofizjologii Molekularnej Roślin

Prof. dr hab. Paweł Sowiński



Warszawa, 20.08.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Syeda Muhammada Muntazira Mehdiego pt. „Identification of novel and ABA-regulated miRNAs and characterization of its target gene – AtBRO1 during growth and abiotic stress response in Arabidopsis thaliana”

Wśród głównych współczesnej biologii roślin wyróżnia się 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, włączając w to procesy aklimatyzacji do stresu. Jednym z najważniejszych elementów takich szlaków jest ścieżka, w której uczestniczy kwas abscyzynowy. W tym nurcie mieści się przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Syeda Muhammada Muntazira Mehdiego pt. „Identification of novel and ABA-regulated miRNAs and characterization of its target gene – AtBRO1 during growth and abiotic stress response in Arabidopsis thaliana”. Praca ta koncentruje się na udziale miRNA w ścieżce sygnałowej ABA i stanowi kontynuację ważnych badań zainicjowanych w zespole dr hab. Agnieszki Ludwików, prof. UAM.

Uwagi krytyczne

Rozprawa oparta jest na dwóch oryginalnych artykułach naukowych opublikowanych odpowiednio, w 2021 i w 2023 r.: “Identification of Novel miRNAs and Their Target Genes in the Response to

Abscisic Acid in Arabidopsis” oraz “*The Bro1-like domain-containing protein, AtBro1, modulates growth and abiotic stress responses in Arabidopsis*”, w których pierwszym autorem jest mgr Syed Muhammad Muntazir Mehdi z dominującym udziałem w ich powstaniu (odpowiednio 75 oraz 80%, na podstawie deklaracji autorów), natomiast autorem korespondencyjnym (z udziałem w obu artykułach po 15%) jest prof. Agnieszka Ludwików, promotorka rozprawy. Zgodnie z deklaracjami współautorów zawartych zarówno w rozprawie jak i artykułach oryginalnych, wkład Doktoranta był znaczący na wszystkich etapach powstawania i publikowania prac, za wyjątkiem uzyskania funduszy na badania, administracji projektem badawczym oraz nadzoru nad realizacją badań.

Oba artykuły składające się na recenzowaną rozprawę doktorską są ze sobą powiązane. Pierwsza z prac dokumentuje identyfikację kilku nowych miRNA, których ekspresja była hamowana przez zewnętrznie podany kwas abscyzynowy u *A. thaliana* zarówno w typie dzikim jak i w kilku mutantach. Natomiast drugi artykuł koncentruje się na badaniu roli genu AT1G73390, przypuszczalnie stanowiącego cel jednego z wykrytych miRNA, w odpowiedzi na różne czynniki stresowe. Prace były już recenzowane, więc moje uwagi odnośnie metodyki są nieliczne, szczególnie jeśli chodzi o techniki molekularne, które opisane są dość szczegółowo, mam natomiast pewne zastrzeżenia odnośnie aplikacji kwasu abscyzynowego oraz komentarz do sposobu indukcji stresu wodnego u roślin.

W obu pracach rośliny były traktowane roztworem ABA w stężeniu 100 μ M (pierwsza praca) oraz 100 lub 50 μ M (druga praca) przez kilka godzin, zależnie od wariantu. Jest to stosunkowo wysokie stężenie, więc może powodować efekt silnego, nienaturalnego stresu i prowadzić do fałszywych wniosków. **Podczas publicznej obrony proszę Doktoranta o uzasadnienie na tle literatury tematu stosowania ABA w użytym w pracach stężeniu.** Innym problemem jest sposób podawania ABA, tzn. aplikacja zewnętrzna. Hormony roślinne to substancje o bardzo wysokiej aktywności biologicznej, które występują w tkankach w bardzo niskich stężeniach. Zewnętrzne podanie hormonu nie daje żadnej gwarancji, że substancja taka dociera do miejsc docelowych w sposób kontrolowany, a jej stężenie jest wyrównane w obrębie organu.

Transport zewnętrznie podanego hormonu do tkanek zależy bowiem od wielu czynników, m.in. od obecności na powierzchni organu włosków i kutykuli, struktury i przepuszczalności epidermy, itd. Problem zapewne nie jest szczególnie istotny w przypadku bardzo młodych siewek *Arabidopsis*, ale może nabierać znaczenia, gdy bada się kilka genotypów, które mogą się różnić pod tym względem. **Podczas publicznej obrony proszę Doktoranta o podanie czy w badaniach wstępnych lub w pracach grupy badawczej, której jest członkiem określano zależność między zewnętrznym a wewnętrznym stężeniem ABA w tkankach badanych genotypów. Prosiłbym też o wyjaśnienie informacji “ABA application was confirmed by the amplification of ABA-related marker mRNAs” zawartej w pierwszej pracy.** Oprócz zacytowanego zdania w obu pracach nie znalazłem żadnego wyjaśnienia o jakie markery chodzi, a także wyników takich testów.

Osobną kwestią jest sposób wywoływania stresu wodnego u roślin. Zagadnienie to jest badane od dziesięcioleci i jeszcze w latach 80-tych XX w. dokonano porównań różnych technik indukcji stresu wodnego, w szczególności zaniechania podlewania oraz użycia substancji osmotycznie czynnych (por. Krizek DT, Methods of inducing water tress, HortScience 20, 1028-1038, 1985). Konkluzją było, że oba podejścia mają swoje wady i zalety i opieranie wnioskowania tylko na jednym sposobie wywołania stresu może prowadzić do błędnych wniosków. Ewidentnie recenzowana rozprawa jest oparta o podobną konstatację, gdyż zastosowane oba podejścia, co należy ocenić bardzo pozytywnie. **Tylko z obowiązku recenzenta zapytam więc, na jakiej podstawie przyjęto stężenia osmotyków i czasy ich działania przedstawione w części *Material and methods* drugiej z prac? Czy były prowadzone jakieś badania wstępne bądź oparto się na wcześniejszych pracach grupy badawczej, której członkiem jest Doktorant?**

Na koniec, pod uwagę Doktoranta zostawiam uwagę, która nie odnosi się bezpośrednio do treści rozprawy doktorskiej i ma raczej charakter dydaktyczny. Pierwsza z prac, które weszły w skład rozprawy została opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* natomiast druga w *Frontiers in Plant Sciences*. Muszę tu zaznaczyć, że pierwsze z pism, jako należące do grupy MDPI jest zaliczane przez liczące się środowiska naukowe do pism drapieżnych (*predatory*

journals). Takie czasopisma publikują szybko, ale bez zachowania standardów oceny eksperckiej. Dlatego też łatwo przechodzą tam prace niskiej jakości. Moim zdaniem nie odnosi się to do obu prac składających się na recenzowaną dysertację. Niemniej, zdaniem naukowych instytucji eksperckich publikowanie prac naukowych w czasopismach drapieżnych niesie dla autora(ów) ryzyko utraty reputacji w środowisku naukowym, może negatywnie wpływać na możliwość późniejszego publikowania w uznanych pismach, a także utrudniać uzyskiwanie finansowania na badania. Dla przykładu Narodowe Centrum Nauki jest zdecydowanie przeciwne tego typu praktykom. W uzupełnieniu dodam, że również pisma z grupy *Frontiers Media* zostały wpisane na listę pism drapieżnych, ale miało to miejsce dopiero w 2023 r., więc autorzy drugiego z artykułów mogli o tym nie wiedzieć w momencie wysyłania manuskryptu do druku.

Uwagi końcowe

Podniesione przeze mnie mankamenty nie umniejszają merytorycznego wkładu dysertacji w obszar wiedzy realizowany przez grupę badawczą, której członkiem jest mgr Syed Muhammad Muntazir Mehdi. Na uwagę zasługuje oryginalne i wieloaspektowe podejście Autora recenzowanej rozprawy do problemu naukowego. Efektem były dwie oryginalne prace naukowe. Pierwsza z prac wchodzących w skład rozprawy prezentuje szerokie podejście do tematu z użyciem technik wielkoprzepustowych i odpowiednich narzędzi bioinformatycznych. Ważnym efektem pracy podsumowującym jej wyniki jest model sieci powiązań regulatorowych nowoodkrytych miRNA zależnych od ABA i genów docelowych. Natomiast druga z prac jest skoncentrowana na szczegółowej charakterystyce z użyciem zaawansowanych metod biologii molekularnej i eksperymentalnej pojedynczego genu stanowiącego potencjalny cel dla jednego z nowopoznanych miRNA. Również i w tym przypadku podsumowaniem pracy jest funkcjonalny model ilustrujący rolę badanego genu w odpowiedzi na stres abiotyczny. W przypadku obu prac, tak różnych w podejściu eksperymentalnym, Doktorant wykazał się wysokim poziomem wiedzy teoretycznej,

samodzielnością w prowadzeniu badań, opanowaniem licznych, odmiennych technik laboratoryjnych, talentem analitycznym niezbędnym do przetwarzania dużych ilości danych empirycznych oraz umiejętnością syntezy obserwacji naukowych.

Ja niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Syeda Muhammada Muntazira Mehdiego spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i wnioskuję do Rady naukowej dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczeniu mgr Syeda Muhammada Muntazira Mehdiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



