

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Anny Orłowskiej p.t.**

"Znaczenie genów kodujących białka z grupy Polycomb, Trithorax i wybranych czynników transkrypcyjnych oraz statusu oksydacyjnego w regulacji indukcji embriogenezy somatycznej u *Medicago truncatula* Gaertn."

Przedmiot rozprawy i jej znaczenie naukowe

Przedmiotem badań opisanych w recenzowanej pracy doktorskiej była embriogeniczna kultura *in vitro* *Medicago truncatula*. Gatunek ten jest bliskim krewnym lucerny siewnej (*M. sativa*), rośliny pastewnej o dużym znaczeniu ekonomicznym. Wobec ograniczeń jakie stwarza lucerna siewna, lucerna *M. truncatula* stała się modelem w badaniach genomiki funkcjonalnej rodziny bobowatych ze względu na stosunkowo mały (poniżej 500 Mb), zekwencjonowany genom, publicznie dostępne bazy danych genomowych, dostępność mutantów oraz możliwość zastosowania transformacji genetycznej do badania funkcji genów. Te „modelowe” cechy *M. truncatula* stały się zapewne zachętą dla Zespołu kierowanego przez panią prof. Ewę Kępczyńską, promotora recenzowanej pracy, do zastosowania *M. truncatula* w badaniach nad fizjologicznymi, biochemicznymi i genetycznymi mechanizmami sterującymi somatyczną embriogenezą u roślin strączkowych.

Badania nad procesami sterującymi plastycznością rozwojową komórek, a szczególnie nad mechanizmami i czynnikami endo – i egzogennymi indukującymi w zróżnicowanych komórkach somatycznych nowe programy rozwojowe, są obecnie w centrum zainteresowania nie tylko badaczy roślin i zwierząt ale także medyków. Poznanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw regeneracji roślin w kulturze *in vitro* oprócz poznawczego ma wymiar praktyczny ponieważ przyczynia się do ulepszenia efektywności transformacji genetycznej roślin wykorzystywanej w badaniach funkcji genów oraz w modyfikowaniu cech roślin użytkowych. Stąd też praca mgr Anny Orłowskiej podejmująca badania nad genetycznymi i epigenetycznymi czynnikami sterującymi regeneracją roślin *M. truncatula* na drodze somatycznej embriogenezy świetnie wpisuje się w bieżący, światowy nurt badań. Za cenny i trafny uważam także wybór przez Doktorantkę obiektu tych badań, którym była wysoce embriogenna kultura M9-10a pochodząca z nieembriogennej linii M9 odmiany Jemolang *M. truncatula*. Linie te dostarczają Zespołowi prof. Ewy Kępczyńskiej unikalnego, modelowego systemu badawczego dla poznania mechanizmów determinujących stan pluri/totipotencji w komórkach somatycznych u roślin strączkowych/bobowatych. Uznanie budzi także szeroki, wielopoziomowy zakres badań nad SE zaprezentowany w pracy doktorskiej, który objął czynniki genetyczne, epigenetyczne oraz stres oksydacyjny.

Podsumowując, podjęte w rozprawie badania uważam za niezwykle aktualne i interesujące dla współczesnej nauki.

Struktura pracy

Pod względem formalnym rozprawa jest typową monografią o charakterze eksperymentalnym. Praca liczy 168 stron, i obejmuje typowe rozdziały: streszczenie po polsku i angielsku, wykaz skrótów, wstęp (odpowiednik przeglądu literatury w innych rozprawach), cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, bibliografię. Dodatkowo, w aneksie zawarty jest dorobek naukowy Doktorantki. Poniżej omawiam kolejne rozdziały rozprawy na bieżąco umieszczając komentarze do pracy i pytania do Doktorantki.

Tytuł rozprawy:

Tytuł błędnie sugeruje badanie czynników transkrypcyjnych na poziomie białek podczas gdy praca przedstawia wyłącznie badania na poziomie genów kodujących białka regulujące transkrypcję. Stąd też prawidłowy tytuł powinien brzmieć: "Znaczenie genów kodujących białka z grupy Polycomb, Trithorax i wybrane czynniki transkrypcyjne oraz statusu oksydacyjnego w regulacji indukcji embriogenezy somatycznej u *Medicago truncatula* Gaertn."

Wstęp

W większości rozpraw Wstęp to krótkie 1-2 stronicowe wprowadzenie przed przeglądem literatury, najczęściej kończące się zdefiniowaniem celu badań. Inaczej jest w recenzowanej pracy, w której we Wstępie Doktorantka zawarła przegląd literatury i stąd w mojej opinii nazwa tego rozdziału jest myląca.

Opisując aktualny stan wiedzy na temat regulacji somatycznej embriogenezy Doktorantka skupiła się na najbardziej interesującej z punktu widzenia mechanizmu regulującego pluri-/totipotencję komórek roślinnych fazie tego procesu, tj. indukcji SE i przekrojowo przedstawiła rolę epi-/genetycznych i stresowych czynników w tym procesie. W ostatnim podrozdziale, Autorka przybliżyła obiekt swoich badań, *M. truncatula*. Przegląd oparty jest na dobrze dobranej, bogatej literaturze naukowej, która ukazała się w ostatnich latach. Tekst ilustruje 9 rysunków i jedno zdjęcie. Nie wszystkie ilustracje spełniły dobrze swoją funkcję tj. uzupełniły tekst do którego zostały odniesione

Rys. 1 pokazuje schemat indukowania pośredniej i bezpośredniej SE z różnych eksplantatów *M. truncatula* (str. 15) i przywołany jest na str. 14 jako wsparcie tezy o silnym przeprogramowaniu komórek eksplantatu podczas pośredniej SE choć „przeprogramowanie” na schemacie nie jest pokazane. Rys. 1 raczej powinien zostać włączony do podrozdziału przedstawiającego *M. truncatula* jako model w badaniach. Podobnie nieadekwatnie do treści cytowany jest Rys. 2 (str. 17), na którym widzimy podręcznikowy przekrój przez tkanki liścia, chociaż zgodnie z tekstem rysunek ten powinien ilustrować histogenezę tkanki kalusowej w kulturze liści *M. truncatula*. Z kolei Rys. 6 jest nieczytelny, nazwy białek w przedstawionych kompleksach PRC1, PRC2 i TrxG trudne do odszyfrowania; Nie wiadomo kto jest autorem tego schematu. W pracach naukowych legenda do rysunków, schematów i zdjęć powinna zawierać komplet informacji umożliwiających zrozumienie ilustracji bez poszukiwań w tekście, niestety Doktorantka tej zasady nie zastosowała.

Bardzo utrudnia śledzenie tekstu umieszczanie ilustracji w znacznej odległości od tekstu, w którym zostały przywołane, np. na str. 37 (Wstęp) tekst odnosi się do Rys. 10, który pojawia się dopiero na str. 53 przy omawianiu metod, podobnie zdjęcie 2 cytowane w Materiałach i Metodach (str. 43) pojawia się dopiero na str. 70 w Wynikach.

Uwagi merytoryczne:

- na str. 13 czytamy "Embriogeneza somatyczna jest ściśle związana z totipotencją komórek roślin wyższych."; podobnie na str. 18: „Somatyczna embriogeneza jest możliwa tylko wtedy, gdy komórki somatyczne odróżniają i stają się totipotentne”. Teksty te sugerują, że Doktorantka każdy proces SE uważa za objaw totipotencji komórek; prosiłabym o zweryfikowanie pojęcia totipotencja w czasie obrony

- str. 13-14: opisując proces SE u roślin Doktorantka przywołuje tylko model funkcjonujący np. u iglaków, który jednak nie jest powszechny; np. u *Arabidopsis* nie ma fazy namnażania kalusa i tworzenia PEM; szkoda, też, że w podrozdziale opisującym SE nie ma informacji na temat możliwości i sposobów indukowania tego procesu u roślin strączkowych/bobowatych, a w szczególności doskwiera brak opisu systemu indukcji SE u *Medicago truncatula*; dopiero schemat na str. 70 (Wyniki, wykres 1) pozwala wyobrazić sobie jak ten proces przebiega u badanej w pracy rośliny.

- str. 20: Doktorantka słusznie twierdzi, że istnieje kilka gatunków roślin, które wytwarzają somatyczne zarodki pod wpływem stresu, jednak nie podaje żadnego przykładu i nie cytuje na poparcie żadnych prac choć taka jest rola przeglądu literatury;

-Str. 20: nie zgadzam się z tezą, że wśród genów wykazujących zmieniony profil ekspresji podczas SE przeważają te, których ekspresja jest podwyższona głównie w ostatnich fazach tego procesu; przeczą temu wyniki analiz transkryptomu podczas SE u różnych roślin w tym,

u *Arabidopsis*, w których wykazano, że we wczesnej fazie indukcji SE kilkadziesiąt genów TF ulega intensywnie podwyższonej (co najmniej 10-krotnie) transkrypcji (Gliwicka i in. 2013, PLoS One).

- str. 41: nieuzasadnione jest podanie w tab. 1 opisującej skład pożywki ISV stężenia roztworu macierzystego; ważne jest wyłącznie stężenie związku w pożywce; ponadto tylko w tej tabeli stężenia związków podano w mg/l oraz w mM, a Tabele 2 i 3 podają skład pożywek do kultury *in vitro* tylko w mg/l. Należałoby ujednoczyć jednostki, najlepiej zastosować mM jako zalecane do wyrażania stężeń związków w pożywkach do kultury *in vitro*, choć rozumiem, że ze względów praktycznych operuje się często mg/l. Dodatkowo, zestawienie składu obu pożywek zastosowanych do indukcji SE w jednej tabeli byłoby znacznie lepszym rozwiązaniem niż osobne małe tabele bo ułatwiłoby porównanie składu pożywek. W składzie pożywek jest też sacharoza ale tabele jej nie uwzględniają.

-Str. 42: w tabeli 2 widnieje inne stężenia 2,4-D i zeatyny (0,2 i 0,1 μM) niż podane w tekście (0,5 i 1 μM) odnoszącym się do tej tabeli

Cel i metody

Poza wskazaniem celu ogólnego pracy Autorka zdefiniowała także sześć celów szczegółowych, które konsekwentnie realizowała w trakcie badań. Nie mam zastrzeżeń, co do poprawności merytorycznej celów, ale razi strona językowa niektórych z nich (uwagi w sekcji dotyczącej języka). Ponadto, Autorka w niektórych celach szczegółowych wskazuje, że badania dotyczą *M. truncatula* i kultury SE, a innych celach takich informacji brak, co może sugerować, że w tych badaniach obiekt był inny.

Do realizacji postawionych w rozprawie celów badawczych Doktorantka opanowała szereg metod i technik badawczych z zakresu kultur *in vitro* roślin oraz biologii molekularnej, w tym analizę ilościową ekspresji genów metodą RT-qPCR, pomiary spektrofotometryczne aktywności enzymów antyoksydacyjnych i zawartości białka metodą Bradford'a (1976) oraz analizy bioinformatyczne i statystyczne. Ten szeroki warsztat badawczy Doktorantki zasługuje na uznanie.

Pytania/uwagi szczegółowe:

- str. 43: niejasno opisane są kombinacje, z których izolowano RNA; podział na punkty czasowe z pierwszej fazy indukcji SE vs z całego okresu fazy indukcji nie ma uzasadnienia i jest nielogiczny; sensowny byłby podział analiz na te obejmujące wczesną (tj. pierwszy tydzień kultury: 0, 1, 2, 3, 5 i 7. dzień) i późną (2. i 3. tydzień kultury tj. 14 i 21 dzień) fazę indukcji SE. Znacznym ułatwieniem w opisanu badanych kombinacji byłoby odwołanie w Materiałach i metodach do schematu przedstawionego dopiero w Wynikach jako zdjęcie 2 i pokazującego kulturę SE na osi czasu. Co prawda do tego schematu jest odwołanie na str. 43 ale tylko celem ilustracji sposobu nacinania eksplantatu (czego zresztą na zdjęciu/schemacie nie widać), a ponadto schemat ten znajdujemy po długich poszukiwaniach dopiero na str. 70.

- Str. 51: z ilu eksplantatów izolowano RNA w jednym powtórzeniu? W pracy Orłowska i in. (2017) podano 7 liści.

- ile eksplantatów wzrastało na 1 płytce? Czy liczba była różna w zależności od doświadczenia?

-str. 58- testem statystycznym t-Studenta badano istotność różnic między średnimi wartościami ekspresji genów i aktywności enzymów w różnych kombinacjach; różnice istotne zaznaczano gwiazdkami ale niestety brak informacji (w Materiałach i Metodach, jak również pod wykresami), która kombinacja była punktem odniesienia w obliczaniu istotnej różnicy

Wyniki:

Znaczna część zaprezentowanych w rozprawie wyników dotyczących identyfikacji w genomie *M. truncatula* wybranych genów związanych z indukcją SE, zbadania ich związków filogenetycznych oraz analizy ekspresji tych genów metodą ilościową (RT-qPCR) została opublikowana w dwóch artykułach (Orłowska i in., 2017; Orłowska i Kępczyńska, 2018) w czasopiśmie z listy JCR, Plant Cell Tissue and Organ Culture, IF₂₀₁₇= 2,004; 30 punktów wg

MNISW. Fakt ten dowodzi nowatorstwa uzyskanych wyników i ich wartości naukowej dla społeczności badaczy.

Za najważniejsze uzyskane w pracy wyniki uważam:

- Zidentyfikowanie, w genomie *M. truncatula* sekwencji genowych kodujących białka grupy Polycomb, Trithorax oraz enzymy antyoksydacyjne (dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę askorbinianową);
- podjęcie próby wyjaśnienia wysokiego potencjału embriogenicznego genotypu M9-10a na poziomie regulacji epigenetycznej poprzez wykazanie istotnych różnic w poziomie ekspresji genów z grupy Polycomb i Trithorax w świeżo izolowanych i poddanych indukcji embriogenicnej eksplantatach linii embriogenicnej (M9-10a) i nieembriogenicnej (M9);
- wykazanie istotnie wyższej ekspresji genów czynników transkrypcyjnych *L1L*, *WOX5* i *STM* w kulturze embriogenicnej w stosunku do nieembriogenicnej, co pozwala na stosowanie tych genów jako markerów tkanki embriogenicnej u *M. truncatula*;
- dostarczenie dowodów eksperymentalnych potwierdzających tezę, że 2,4-D może indukować SE poprzez stres oksydacyjny, na co wskazuje istotnie podniesiony poziom aktywności enzymów oksydacyjnych (SOD, CAT, APX) i idące za tym zmiany w poziomie ekspresji genów regulujących SE, wykazane po zwiększeniu stężenia 2,4-D w pożywce.

Mam natomiast wątpliwości, co do interpretacji wyników uzyskanych z użyciem DPI - inhibitora oksygenazy NADPH generującej anionorodnik ponadtlenkowy w reakcji na stres. Do badań nad wpływem poziomu stresu oksydacyjnego na ekspresję genów wybrano stężenie 10 μ M DPI, które powodowało zamieranie eksplantatów widoczne na zdj. 5 i, jak czytamy: „całkowite zablokowanie produkcji kalusa i zarodków somatycznych” (str. 106) „a „RNA izolowane z tkanek hodowanych na pożywce z dodatkiem DPI było zdegradowane i nie można było go wykorzystać do dalszych analiz” (str. 110)”. Efekty te dowodzą toksyczności zastosowanego stężenia, co powoduje, że wszystkie pomiary ekspresji genów uzyskane w tej kombinacji odwzorowują letalne zmiany w komórkach, i nie mogą być podstawą do wnioskowania o zależności pomiędzy poziomem stresu i regulacją indukcji SE. Do analiz powinno być zastosowane stężenie 1 μ M DPI (lub nawet niższe), tj. takie które pozwala na przeżycie tkanki i szczątkową produkcję kalusa i zarodków.

Pytania/uwagi szczegółowe:

- w pracy określano masę kalusa w odpowiedzi na różne warunki kultury (np. wykres 20, str. 106); prosiłabym o wyjaśnienie dlaczego przyjęto taki parametr? Czy w badany systemie istnieje zależność pomiędzy produkcją kalusa a potencjałem embriogenicnym kultury?
- mam pytanie o istotność zmian w aktywności enzymów antyoksydacyjnych i ekspresji genów kodujących w kulturze embriogenicnej i nieembriogenicnej; brak stosownych oznaczeń na wykresach sugeruje, że przeważająca większość tych zmian nie była istotna statystycznie stąd wnioskowanie np. o zmianach w profilach aktywności enzymów w trakcie SE (wyk. 19 i str. 101) jest nieuzasadnione;
- str. 103: jak kwantyfikowano zdolność kultury/linii do SE w badanych kombinacjach? Jakimi pomiarami podparty jest wniosek o „spowolnieniu” różnicowania zarodków somatycznych w kulturach indukowanych 2,4-D w stężeniu powyżej 5 μ M? Nie znalazłam stosownych danych, a jedynie nieczytelne fotografie kultur na zdj. 5,
- jakość zdjęć 3 i 4 i 7 (str. 20 i 91, 109), nie pozwala na zweryfikowanie informacji podanych w tekście dotyczącym produkcji/lokalizacji w eksplantatach anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru;
- str. 109, czy w pożywkach stosowano BAP? Tak podaje opis na zdjęciu 7;
- proszę o wyjaśnienie, co należy rozumieć przez „działanie auksynogenne” 2,4-D (np. str. 106);
- uwaga dot. wykresów przedstawiających dynamikę ekspresji genów: Doktorantka określała poziom ekspresji genów w trakcie kultury w wybranych kilku punktach czasowych i dlatego poprawną graficzną ilustracją takich wyników są wyłącznie wykresy słupkowe/kolumnowe, a nie liniowe; na usprawiedliwienie mogę dodać, że liniowa, a nie słupkowa ilustracja danych nieciągłych to często spotykany błąd (i akceptowany także w niektórych czasopismach, co

pokazuje opublikowanie tych wykresów w PCTOC). Należy podkreślić, że Doktorantka zastosowała słupkowe wykresy, ale niestety przedstawiła na nich tylko pomiary dla wybranych dni kultury (nie znalazłam klucza zastosowanego do wyboru przedstawionych na tych wykresach dni: 0 i 7. dzień dla genów PRC1, a 7. i 14. dzień dla genów PRC2).

- kolejna uwaga do wykresów liniowej ekspresji genów: nie widzę uzasadnienia dla mierzenia poziomu ekspresji genu krotnością zmiany w stosunku do „najniższej obserwowanej zmiany”, co powoduje, że dla każdego wykresu punkt odniesienia jest inny; czasami trudno odczytać z wykresu, który gen i punkt czasowy był referencją (np. wyk. 2 dla *LEC1* i *L1L*), a w legendzie tej informacji brak (także w artykułach opublikowanych z tych wyników w PTOC).

Podsumowując, uważam, że wszystkie pomiary poziomu ekspresji genów i aktywności enzymów powinny być przedstawione w formie wykresów słupkowych zestawionych parami dla dwóch genotypów, ponieważ tylko porównanie dwóch różniących się potencjałem genotypów jest zgodne z celem pracy bo pozwala na uchwycenie związku pomiędzy ekspresją badanych genów a potencjałem embriogennym tkanki. Punktem odniesienia dla wszystkich pomiarów może być albo kultura nieembriogenna (co Doktorantka zastosowała na wykresach kolumnowych), albo eksplantaty przed kulturą (0 d).

Dyskusja

W Dyskusji, Doktorantka podsumowuje niektóre uzyskane w pracy wyniki i zestawia je z aktualną wiedzą. Rozdział ten na pewno by zyskał i lepiej spełniał swoją funkcję gdyby Autorka wyróżniła podrozdziały omawiające diskutowane problemy. Taka struktura Dyskusji wymusiłaby bowiem zdefiniowanie i uporządkowanie omawianych problemów, co na pewno poprawiłoby jasność dyskusji i wnioskowania.

Mam wątpliwość do wnioskowania na str. 140: „*Pomimo wysokiej transkrypcji tych czynników epigenetycznych w linii M9-10a w tym samym czasie obserwowano również wysoką ekspresję genów związanych z rozwojem zarodków somatycznych, co może wskazywać, że badane TFs nie znajdują się pod bezpośrednią kontrolą PcG i TrxG, ale mogą zależeć również od innych mechanizmów epigenetycznych*”. Biorąc pod uwagę, że poziom ekspresji genów nie jest jednoznaczny z poziomem produkcji ich białkowych produktów należałoby zachować większą ostrożność we wnioskowaniu dopóki dodatkowe analizy (np. na poziomie białek lub z zastosowaniem mutantów/linii transgenicznycy) nie potwierdzą hipotezy. Ponadto, skoro białka TrxG, w przeciwieństwie do PcG, są aktywatorami ekspresji genów, to wzrost ekspresji genów kodujących białka TrxG sprzyja aktywacji docelowych genów, a więc nie można wykluczyć, że badane w pracy TF są bezpośrednio regulowane przez TrxG.

Prosiłabym także o wskazanie jakie badania powinny być w przyszłości przeprowadzone celem zidentyfikowania sugerowanych w pracy związków regulacyjnych między białkami *PcG* i *TrxG*, a genami TF kontrolującymi indukcję embriogenną.

Wyjaśnienia wymaga także teza postawiona na końcu Dyskusji (str. 140: „*Uzyskane wyniki potwierdzają, że kluczowe znaczenie w procesie aktywacji systemów adaptacyjnych do zmienionego środowiska ma auksyna i produkcja reaktywnych form tlenu w odpowiedzi na działanie czynników stresowych (rys. 20)*”. To bardzo ogólne stwierdzenie wymaga uściślenia w kontekście przeprowadzonych w pracy badań: jakie „systemy adaptacyjne, „zmienione środowisko” i które wyniki związane z auksyną ma Doktorantka na myśli?

W swoich badaniach Doktorantka potwierdziła, że także u *M. truncatula* stres oksydacyjny jest związany z indukcją SE oraz, że możliwym mechanizmem działania 2,4-D jako induktora SE jest stymulacja produkcji reaktywnych form tlenu, które z kolei warunkują poziom ekspresji genów, w tym SE-regulatorów. Z dyskusji niestety nie dowiadujemy się nic na temat mechanizmów działania RFT w ekspresji genów. Prosiłabym o uzupełnienie tego ważnego wątku w trakcie obrony. Interesują mnie także propozycje Doktorantki, co do kierunku dalszych badań i dostępnych u *M. truncatula* narzędzi dla wyjaśnienia mechanizmu działania stresu oksydacyjnego w indukcji SE.

Wnioski

Wyniki badań Doktorantka podsumowała w dziewięciu wnioskach. Wniosek 1. ma formę stwierdzenia, a nie konkluzji i wymaga poprawy, bo zidentyfikowanie nawet po raz pierwszy sekwencji w genomie nie jest wnioskiem. Wobec uwagi jaką wyraziłam na temat badań z zastosowaniem zbyt wysokiego, toksycznego stężenia DPI, wnioski 7, 8 i 9 należy zweryfikować w analizach z zastosowaniem niższego, nieletalnego stężenia tego związku.

W trakcie obrony prosiłabym o rozwinięcie wniosku 2: co to znaczy, że gen jest „bardzo dobrym” markerem SE? Zgadzą się, że geny L1L i STM wydają się spełniać kryterium markera kultury embriogenicnej u *M. truncatula*, jednak mam wątpliwości, czy może być nim gen *LEC1* (późna ekspresja na poziomie wielokrotnie niższym niż pozostałe dwa geny).

Praca nie jest wolna od błędów natury językowej, stylistycznej i edycyjnej, poniżej wskazuję niektóre z nich:

Błędy językowe, terminologiczne, stylistyczne

- RNA i DNA to kwasy i dlatego wskazanym jest używanie rodzaju męskiego, a nie nijakiego; str. 8: Czytamy o „transmisji komórek somatycznych do stanu embriogenicnego.”; terminem właściwym jest tranzycja, a nie transmisja
- str. 35 „mutacja w ekspresji genu ATX1 powoduje...”
- str. 35: czytamy o przyłączaniu reszt metylowych „na genie docelowym”
 - „... f. zwyczajna” to nie jest przyjęty w języku polskim skrót nazwy gatunkowej fasoli zwyczajnej
- str. 37: „... stosunkowa łatwa transformacja”; domyłam się, że chodzi o transformację genetyczną
- Wśród celów pracy (str. 39) Doktorantka wskazuje „Wpływ 2,4-D na formowanie tkanki kalusowej ...” oraz „wpływ zmian w ekspresji genów... na ..”- celem może być określenie /zbadanie wpływu ale nie wpływ
- w całej pracy zamiast „płytką Petriego” Doktorantka używa terminu „szalka”, słowo to w j. polskim oznacza wyłącznie część wagi
- Doktorantka używa zwrotów „muszą” (str. 8, 122)- np. „ eksplantaty muszą podlegać procesom...”, „Udało się odkryć...” (str. 20), lub „oczywistym jest ...” co nie jest językiem właściwym dla nauki;
- str. 70, w podpisie Wykresu 1 czytamy: Dynamika wzrostu tkanki kalusowej na eksplantatach liściowych ...”- powinno być: Dynamika wzrostu tkanki kalusowej powstającej w kulturze eksplantatów liściowych...
- str. 72: „bezpośrednie porównanie poziomu transkrypcji L1L w obu analizowanych liniach...”
- str. „...MnSOD obecny jest...”- zamiast poprawnie: enzym MnSOD obecny jest...
- Autorka nadużywa zdań bez określonego podmiotu, który trzeba dedukować z kontekstu
- str. 131: „... tymczasowe obniżenie aktywności komponentów PRC2 jest wystarczające dla zaindukowania procesu embriogenezy somatycznej.” Zapewne chodzi nie o „tymczasowe”, ale o „przejściowe” obniżenie aktywności

Błędy edycyjne:

- w pracy razi znaczna liczba stron częściowo pustych; domyślałam się, że są one wynikiem wstawiania w tekst ilustracji, tabeli, wykresów; szkoda że Doktorantka nie zadbała o edycję i nie dopasowanie tekstu do formatu stron
- błędnie cytowana jest praca Gaj i in., (2005) jako Gaj i in., (2006)
- str. 40: jest 5mM, powinno być 5 mM (wymagana spacja pomiędzy liczbą a mianem)
- zasada, której Autorka nie używa mówi, że tylko raz w teście używamy pełnej łacińskiej nazwy gatunkowej, po czym stosujemy skrót; w tekście naprzemiennie stosowana jest pełna nazwa *Medicago truncatula* (np. str. 39, 71) i skrót *M. truncatula* (np. 71).
- zdarzają się błędny literowe (np. str. 59) i gramatyczne (np. str. 16: jest „w kierunku hypokotyli”, powinno być „w kierunku hypokotyli”)

Znaczenie wyników dla nauki

Powyższe komentarze i uwagi krytyczne nie wpływają w sposób istotny na moją wysoką ocenę wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej pracy p. mgr Anny Orłowskiej i jej wkładu w pogłębienie wiedzy na temat indukowania stanu embriogeniczności w kulturze tkanek somatycznych roślin.

Pani mgr A. Orłowska poradziła sobie z wyzwaniem jakie stawia trudny w kulturze *in vitro* gatunek *M. truncatula*, zadała interesujące i aktualne dla nauki pytania i próbowała na nie odpowiedzieć stosując szerokie spektrum kompleksowych analiz. Doktorantka wykazała się znajomością rozległego warsztatu badawczego z zakresu biologii molekularnej oraz kultur *in vitro* roślin i w pracochłonnych doświadczeniach zgromadziła interesujące wyniki, które stanowią istotną podstawę do dalszych badań nad mechanizmami genetycznej i epigenetycznej kontroli stanu embriogeniczności w komórkach/tkankach roślinnych. Wyniki uzyskane w rozprawie doktorskiej mgr Anny Orłowskiej istotnie rozszerzają wiedzę o procesach regulujących indukcję somatycznej embriogenezy na poziomie molekularnym.

Wobec powyższego wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego o **dopuszczenie Pani mgr Anny Orłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ponadto, ze względu na istotną wartość naukową wyników przedstawionych w rozprawie, potwierdzoną ich opublikowaniem w dobrze punktowanym czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym, wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego o **wyróżnienie rozprawy mgr Anny Orłowskiej stosowną nagrodą.**



Małgorzata D. Gaj