

Prof. dr hab. Jan J. Rybczyński
PAN OB.-CZRB w Powsinie
ul. Prawdziwka 2
02-973 Warszawa

Warszawa, dnia 02.01.2019

Recenzja
Rozprawy Doktorskiej
Mgr Anny Orłowskiej

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

Praca została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Ewy Kępczyńskiej w Katedrze Biotechnologii Roślin, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Szczecińskiego (recenzję wykonano na podstawie Pisma Dziekana Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego dr hab. Andrzeja Zawola z dnia 21.09.2018)

Uwagi ogólne

Proces somatycznej embriogenezy został po raz pierwszy opisany 60-ą lat temu, co stało się przyczyną zadedykowania temu zjawisku specjalnego zeszytu przez redakcję *Frontiers in Plant Science*. Na ile proces ten jest obiektem zainteresowania świata nauki świadczy fakt, że obecnie trudno jest dokładnie przedstawić listę gatunków, odmian, linii u których proces ten został opisany. Fascynujące jest to, że powstająca struktura - zarodek somatyczny w warunkach *in vitro* nie zawsze pochodzi z pojedynczej komórki jak zarodek zygocyczny czasami z grupy komórek praembriogenicznych, to jednak jego stadia rozwojowe są podobne do stadiów rozwojowych embriogenezy zygocycznej. Literatura fachowa wskazuje, że oba te systemy zarówno jedno- jak wielokomórkowego pochodzenia nie są przypisane do jakiegokolwiek grupy roślin, a jednak pochodzenie jednokomórkowe np. z komórek włosków (liść lipy), epidermy (zawiązka liścia paproci drzewiastej), epitelu (niedojrzałej tarczki kukurydzy) czy pojedynczego protoplastu (liścia *Trifolium fragiferum*) lub mikrospory (rzepaku) pozwala strukturalnie prześledzić poszczególne stadia rozwojowe zarodka, ale gdyby częstotliwość formowania tych struktur byłaby podobna do poszczególnych osobników w łanie, wówczas postęp badań naukowych nad tym fascynującym zjawiskiem na pewno byłby bardziej zaawansowany.

Alternatywny system regeneracji somatycznego zarodka prowadzi z jego wielokomórkowego pochodzenia. Wielokomórkowa inicjacja tego procesu na drodze kalusowania komórek blaszki liściowej młodej rośliny *Medicago truncatula* pozwala na prowadzenie badań w zakresie inicjacji tego procesu na poziomie fizjologicznym i molekularnym czemu poświęcona jest dzisiaj przedstawiana do publicznej dyskusji praca doktorska p. mgr Anny Orłowskiej.

Zmienność świata roślinnego znalazła swoje odbicie również w badaniach nad somatyczną embriogenezą, a w szczególności nad czynnikami jakie są wymagane przez komórkę roślinną by z daleko posuniętej determinacji funkcjonalnej przejść do poziomu zdolności morfogenetycznych zygoty. Dotychczas opisano systemy somatycznej embriogenezy indukowane samymi warunkami kultury bez ingerencji substancji wzrostowych, tylko cytokininą, mieszaniną cytokininy z auksyną i tylko auksyną. Inicjacja omawianego procesu w systemie *Medicago truncatula* wymaga zastosowania syntetycznej auksyny jaką jest kwas 2,4-dwuchlorofenoksy octowy oraz cytokininy. Bez względu na pochodzenie, czy czynniki

indukujące to zjawisko biologiczne, szczególnie interesujące są jego podstawy genetyczne i epigenetyczne badane na poziomie molekularnym i fizjologicznym, o czym mówi omawiana praca doktorska.

Cel pracy

Głównym celem przedstawionej do recenzji pracy było określenie znaczenia genów kodujących białka z grupy Polycomb, Trithorax i wybranych czynników transkrypcyjnych oraz statusu oksydacyjnego w regulacji procesu indukcji embriogenezy somatycznej u *M. truncatula* Gaertn. Ze względu na szeroki zakres tematyczny omawianej dysertacji Doktorantka przedstawiła cele szczegółowe w liczbie 6 według następującej kolejności. 1. Identyfikacja genów kodujących białka z grupy Polycomb i Trithorax oraz enzymów antyoksydacyjnych; peroksydazy askorbinowej, dysmutazy ponad tlenkowej, czy katalazy (APX, SOD, CAT,); 2. Porównanie profilu ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne uczestniczące w sieci LAFL (LEC1, L1L) oraz w organizacji centrów merystematycznych (WUS, WOX5, STM) w linii M9 i M9-10a w procesie indukcji SE; 3. Porównanie profilu ekspresji genów kodujących białka z grupy Polycomb i Trithorax w linii M9 i M9-10a w procesie indukcji SE; 4. Wpływ 2,4-D i DPI na formowanie tkanki kalusowej i zarodków somatycznych; 5. Analiza profilu ekspresji genów kodujących białka PcG i TrxG podczas indukcji w różnych warunkach statusu oksydacyjnego komórek eksplantatu; 6. Wpływ zmian w ekspresji genów PcG i TrxG na ekspresję wybranych czynników transkrypcyjnych i zdolność do formowania zarodków somatycznych.

Uwagi szczegółowe

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr. Anny Orłowskiej została przygotowana i zawiera 168 stron. Tekst pracy uzupełniają następujące elementy: 6 tabel, 28 wielokrotnych wykresów, 7 wielokrotnych zdjęć (plansze zdjęciowe) oraz 2 schematy. Pracę zamyka lista 215-stu pozycji literaturowych głównie angielskojęzycznych opublikowanych w XXI wieku przedstawionych na 20 stronach. Układ pracy jest przejrzysty z zachowaniem ogólnie przyjętych reguł pisania tego typu rozpraw naukowych w Polsce.

Dysertację otwiera **Streszczenie** w języku polskim i angielskim przedstawione na 5-ciu stronach. Na kolejnej stronie przedstawiono **listę skrótów**.

Wstęp zawarty na 26 stronach poświęcony jest następującym zagadnieniom: embriogenezie somatycznej, regulacji fazy indukcji embriogenezy somatycznej, stresowi w komórkach roślinnych, białkom z grupy Polycomb i Trithorax oraz *Medicago truncatula* jako roślinie modelowej dla rodziny bobowatych, czyli Doktorantka rozłożyła tytuł na poszczególne elementy, którym poświęciła kolejne strony wstępu.

W rozdziale tym Doktorantka kieruje uwagę czytelnika na somatyczną embriogenezę przedstawiając wnikliwe i wielostronne omówienie. Kolejno mgr Orłowska opisuje uwarunkowania genetyczne i epigenetyczne z naświetleniem wybranych procesów fizjologicznych jakie są związane z przemianami wolnych rodników tlenowych w komórce. W komórce, która przechodzi ze stanu daleko zaawansowanej fizjologicznej determinacji do aktywności mitotycznej prowadzącej do uzyskania dwubiegunowej struktury. Ekspresją merystematyczności jest pierwszy podział komórki somatycznej determinujący rozwój analogiczny do rozwoju zygoty. Aby to zjawisko mogło zająć jednym z ważniejszych elementów, dla zainicjowania tego zjawiska według Doktorantki jest regulacja indukcji somatycznej embriogenezy sterowana przez egzogenne substancje wzrostowe. Podkreślając, że kluczowym uwarunkowaniem obok egzogennych regulatorów wzrostu są stres i aktywność czynniki remodelujących chromatynę komórki eksplantatu inicjującego. Spośród wielu

regulatorów wzrostu rośliny Autorka poświęca uwagę 2,4-D jako głównemu czynnikowi indukującemu somatyczną embriogenezę. Ciekawym elementem wstępu jest próba podsumowania wiedzy dotyczącej genów markerowych, których występowanie różnicuje komórki embriogeniczne od nieembriogenicznych.

Innym ciekawym elementem, którym Doktorantka była zainteresowana są procesy enzymatyczne towarzyszące omawianemu zjawisku, kluczowe dla poznania roli stresu mechanicznego w somatycznej embriogenezie. Mechaniczna izolacja i przeniesienie fragmentu rośliny do warunków *in vitro* stanowi stres, na który komórka roślinna reaguje produkcją wolnych rodników. Doktorantka podrozdział poświęcony stresowi w komórce roślinnej ukierunkowała na funkcję reaktywnych form tlenu (RFT) ze szczególnym uwzględnieniem anionorodnika nadtlenkowego oraz nadtlenku wodoru z podkreśleniem ich funkcji w fizjologii wzrostu rośliny. Dla zwalczania skutków działania wolnych rodników, roślina wykształciła mechanizmy enzymatyczne poprzez zaangażowanie peroksydazy askorbinowej, dysmutazy nadtlenkowej, czy katalazy. Ich funkcjonowanie jest wyznacznikiem statusu oksydacyjnego eksplantatu we wczesnych stadiach indukcji procesu embriogenezy. W kolejnym podrozdziale dotyczącym funkcjonowania białek Polycomb i Trithorax Doktorantka wskazuje na ile istnieje potrzeba zajęcia się tą grupą białek, aby uzupełnić dość ubogą wiedzę naukową dotyczącą zjawiska somatycznej embriogenezy nie tylko w rodzinie bobowatych. Należy podkreślić, że rozdział „Wstęp” uzupełniony jest 9-cioma rysunkami ilustrującymi poziomy zainteresowania Autorki procesem somatycznej embriogenezy. Spełniają one również rolę dydaktyczną pozwalając czytelnikowi lepiej zrozumieć złożoność opisywanego procesu i poznać podstawy teoretyczne przyjętego celu w omawianej dysertacji. Rysunki charakteryzują się przejrzystą grafiką i ciekawą kompozycją barw. Ostatecznie można stwierdzić, że rozdział ten wskazuje na bardzo dobre teoretyczne przygotowanie Doktorantki do realizacji postawionych sobie celów.

Kolejno **cel pracy** został przedstawiony na jednej stronie. Głównym celem przedstawionej do recenzji pracy było określenie znaczenia genów kodujących białka z grupy Polycomb, Trithorax i wybranych czynników transkrypcyjnych oraz statusu oksydacyjnego w regulacji procesu indukcji embriogenezy somatycznej u *M. truncatula* Gaertn. Ze względu na szeroko zakrojone badania Autorka wyznaczyła cele szczegółowe w liczbie 6-ciu (patrz wyżej).

Rozdział **materiał i metody** zajmuje kolejne 18-ście stron i zawiera podrozdziały dotyczące uprawy materiału roślinnego, embriogenezy somatycznej i jej indukcji oraz różnicowania zarodków somatycznych, identyfikacji genów w genomie *M. truncatula*, analizy ekspresji genów, oceny wpływu 2,4-D i DPI (dwufenylojodan) na SE w linii embriogennej *M. truncatula*, oznaczenia lokalizacji reaktywnych form tlenu *in situ*, oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych: i dysmutazy nadtlenkowej, katalazy oraz peroksydazy askorbinowej. Wszystkie dane eksperymentalne zostały opracowane statystycznie. Zawartość tego rozdziału daje podstawy do stwierdzenia, że Autorka swobodnie porusza się w obszarze technik jakie stosowane są w przypadku kultur *in vitro*, biologii molekularnej czy analizy biochemicznej ciała rośliny. Pozyskanie danych bioinformatycznych z różnych baz danych pozwoliło Doktorantce na prowadzenie eksperymentów angażujących najbardziej współczesne metody biotechnologiczne.

Wyniki zostały przedstawione na 61 stronach i zawierają informacje dotyczące następujących zagadnień: identyfikacji genów w genomie *M. truncatula*, rozwoju tkanki kalusowej w linii nieembriogennej i embriogennej, ekspresji genów podczas fazy indukcji SE w obu liniach, statusu oksydacyjnego kultur *M. truncatula*, wpływu 2,4-D i DPI na proces embriogenezy somatycznej.

Funkcjonowanie białek jest obrazem ekspresji aktywności genów związanych z przemianami jakie zachodzą w komórkach mezofilu liścia podczas inicjacji intensywnych podziałów komórkowych i embriogenezy czyli przejścia głębokiej determinacji fizjologicznej-fotosyntetycznej do funkcji merystematycznej. Stąd też pierwszym celem ocenianej pracy była identyfikacja genów kodujących białka grupy Polycomb i Trithorax oraz enzymy dysmutazę ponadtlenkową i peroksydazę askorbinową. Analizy zostały wykonane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek PcG (Policomb) i TrxG (Trithorax). Sprawdzone również lokalizację charakterystycznych domen w relacji do *A. thaliana*. Grupa Policomb działa na podstawie dwóch konserwatywnych kompleksów PRC1 i PRC2, z których w badaniach uwzględniono kolejno białka CLF i SWN; oraz LHP1, EMF i VRN1. W przypadku CLF i SWN znajdują się one w różnych kładach a podobieństwo w stosunku do Arabidopsis jest wyższe dla *AtSWN* niż *AtCLF* natomiast podobieństwo białek domeny dotyczy tylko domeny SET dla obu analizowanych białek co je odróżnia od białek MS11 i FIE posiadających domenę WD40. Analiza aminokwasowa komponentów kompleksu PRC1 wykazała, że przeciwnie do PRC2 ortologiczne białka w liczbie trzech wchodzi w skład tych samych kładów a podobieństwa do Arabidopsis wykazują zmienny procent identyczności. Domeny wykazały podobieństwo pomiędzy *M. truncatula* i *A. thaliana* w zakresie chromo i chromo shadow, palca cynkowego oraz pseudobarrel za wyjątkiem białka EMF1. Analiza aminokwasowa białek ATX z grupy Trithorax wykazała obecność dwóch białek ATX3 (t.j. do ATX3.1 i ATX3.2) w stosunku do białek *A. thaliana*, które wykazują podobieństwo w 62 i 57%. Natomiast analiza domenn wykazała stosunkowo duże podobieństwo materiału badanego w stosunku do *A. thaliana*. Analiza aminokwasowa cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) wykazała występowanie trzech białek a dla peroksydazy askorbinowej (APX) wykryto 4 białka występujące w mikrosomach i w cytozolu po dwa, które rozdzielają się w osobne kłady. Analiza podobieństwa z białkami Arabidopsis wykazała zmienność, która wahała się od 81 do 85%.

Drugi element rozdziału **wyniki** charakteryzuje zmiany morfologiczne eksplantatu liścia i dynamikę wzrostu świeżej masy tkanki kalusowej w ciągu 21 dni fazy indukcyjnej porównując linię nieembriogeniczną (M9) i embriogeniczną (M9-10a). Po przeniesieniu obu tkanek na bezhormonalną pożywkę MS, tylko embriogeniczna tworzyła zarodki.

Trzecią część rozdziału **wyniki** stanowią badania ekspresji genów podczas fazy indukcji SE w embriogenicznej i nieembriogenicznej linii. Doktorantka przeprowadziła systematyczne badania analizując 21 dni fazy indukcyjnej wybierając 0,2,7,14 i 21 dzień kultury dla trzech zakresów badań: względnej ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne uczestniczące w sieci LAFL; LEC1 i L1L (Leafy Cotyledon1 i Leafy Cotyledon 1-Like) i w organizacji centrów merystematycznych (*WUS*, *WOX5* *STM*), oraz genów kodujących białka z grupy Polycomb i Trithorax. W tak szeroko zakrojonych eksperymentach Autorka uzyskała szereg bardzo interesujących wyników. Oba geny *LEC1* i *L1L* ulegają ekspresji jedynie w tkance embriogenicznej kalusa podczas fazy indukcji, a silny wzrost poziomu transkrypcji zaobserwowany jest w ciągu ostatnich dwóch tygodni tego procesu. Kolejno przetestowano trzy geny *WUS*, *WOX5*, *STM*, z których dwa pierwsze ulegają transkrypcji w obu liniach, gdzie *STM* ulegał ekspresji tylko w tkance embriogenicznego kalusa. W linii embriogenicznej stwierdzono około 1900 krotny poziom dla genu *WOX5* w stosunku do materiału wyjściowego. Pozostałe geny *STM* i *WUS* wykazywały niższy poziom ekspresji kolejno 500 i 150 krotną zmianę.

Epigenetyczne czynniki wpływające na przejście komórki z funkcji somatycznej do funkcji zdolności embriogenicznych mogą indukować modyfikacje chromatyny, kontrolując w ten sposób poziom ekspresji genów na drodze potranslacyjnej modyfikacji histonów, które są katalizowane przez białka grupy Polycomb (PcG) i Trithorax (TrxG). Białka pierwszej grupy hamują podczas gdy drugiej aktywują ekspresję genów. Następnie Doktorantka

podejmuje kolejne wyzwania prowadzenia eksperymentów na poziomie molekularnym poszukując odpowiedzi na pytanie czy ekspresja genów kodujących białka kompleksów PRC1 i PRC2 może wpływać na nabywanie kompetencji do embriogenezy przez komórki mezofilu liścia *M. truncatula*. Spośród wszystkich pięciu analizowanych genów kompleksu PRC2 transkrypcja trzech (*MSII*, *FIE* i *VRN2*) w eksplantacie pierwotnym była trzykrotnie wyższa w linii nieembriogennej niż embriogennej, kiedy w przypadku kompleksu PRC1 wszystkie pięć genów wykazywało poziom transkrypcji dwu-trzykrotnie wyższy w linii nieembriogennej niż embriogennej. Dla grupy genów TrxG transkrypcja była wyższa dla tkanki nieembriogennej niż embriogennej ale tylko w materiale wyjściowym. Od drugiego dnia ekspresja tych genów była wyższa w embriogennej tkance co sugeruje, że geny *ATX2*, *ATX3.1* i *ATX3.2* biorą udział w nabywaniu zdolności do embriogenezy przez komórki mezofilu liścia i ich pochodne. Kolejno Doktorantka stawia pytanie czy zmiana statusu oksydacyjnego tkanek linii embriogenicznej po zastosowaniu stresu 2,4-D i DPI (jodanian dwufenylowy) może wpływać na zdolność do formowania tkanki kalusowej i zarodków somatycznych, a tym samym czy zmienia się aktywność genów kodujących czynniki transkrypcyjne oraz białka z grupy Polycomb i Trithorax. Założone kultury eksplantatów liściowych w obecności 2,4D i DPI pozwoliły na określenie stężeń optymalnych dla obu czynników stresujących. Dla dalszych badań dotyczących wpływu zmian statusu oksydacyjnego na indukcję somatycznej embriogenezy wybrano stężenie 5.0 μM 2,4-D powodujące zmianę struktury tkanki kalusowej i hamowanie różnicowania zarodków, a dla DPI określono 10.0 μM ze względu na całkowite blokowanie produkcji kalusa i zarodków. Jakkolwiek użycie DPI zostało uzupełnione 0.5 μM 2,4-D. Dalsze analizy fizjologiczne wykazały, że 2,4-D w pożywce indukcyjnej w stężeniu 5.0 μM podwyższał aktywność dysmutazy nadtlenkowej, katalazy i peroksydazy askorbinowej w porównaniu z ich aktywnością w eksplantatach na pożywce standardowej 0.5 μM 2,4-D. Natomiast zastosowanie DPI w stężeniu 10.0 μM skutkowało niższą aktywnością dysmutazy nadtlenkowej i katalazy w porównaniu do kultur prowadzonych na pożywce z dodatkiem 5.0 μM 2,4-D oraz niższą aktywnością dysmutazy nadtlenkowej i peroksydazy askorbinowej. Te wyniki wskazują że oba czynniki pełnią funkcję modulującą aktywność antyoksydacyjną i ekspresję tych enzymów. Doktorantka stawia kolejne pytanie czy obecność stresorów podczas fazy indukcyjnej somatycznej embriogenezy może wpływać na transkrypcję genów kodujących metylotransferazy histonowe reprezentowane przez grupę białek Polycomb i Trithorax. W tym przypadku Doktorantka ograniczyła badania do trzech punktów analizy; 0, 2 i 7 dzień fazy indukcyjnej.

Poziom ekspresji genów kodujących białka kompleksu PRC2 i PRC1 nie wykazywał stymulacji bądź był stymulowany lub istotnie podwyższony, kolejno dla badanych kompleksów w obecności 5.0 μM 2,4-D. Doktorantka nie stwierdziła wpływu 5.0 μM 2,4-D na zmianę ekspresji genów kodujących białka należące do grupy Trithorax (*ATX2*, *ATX3.1* i *ATX3.2*), podczas gdy DPI w pożywce indukującej zahamowało ich transkrypcję. Ostatnim elementem przeprowadzonych eksperymentów było prześledzenie ekspresji genów wcześniej analizowanych czynników transkrypcyjnych w obecności tych samych stresorów. Przeanalizowano geny grupy *LEC*: *LEC1* i *LIL* oraz geny zaangażowane w organizację centrów merystematycznych *WUS*, *WOX5* i *STM*. Wyniki wskazują, że 5.0 μM 2,4-D w pożywce indukcyjnej istotnie podwyższało poziom ekspresji genów *LEC1*, *LIL*, *WOX5* i *STM* natomiast obniżało transkrypcję *WUS*. Zahamowanie wszystkich genów było efektem obecności DPI w pożywce za wyjątkiem genu *LEC1* i *LIL* w drugim dniu indukcji.

Wyniki zostały zilustrowane 8 rysunkami, 6 zdjęciami oraz 28 wykresami głównie wielokrotnymi. Szczególnie pozytywnie oceniam budowę rozdziału **wyniki** polegającą na definiowaniu pytań cząstkowych na podstawie już uzyskanych rezultatów i znajdowaniu odpowiedzi w wyniku przeprowadzanych kolejnych eksperymentów.

Kolejne 23 strony dysertacji poświęcone są dyskusji. Bardzo bogate wyniki uzyskane w przeprowadzonych wielopłaszczyznowo badaniach są przedstawiane na tle prawie 70 pozycji światowej literatury ściśle związanej z genetycznymi i epigenetycznymi uwarunkowaniami indukcji somatycznej embriogenezy roślin nasiennych. Dyskusja została przeprowadzona zgodnie z zachowaniem układu prezentowanych wyników uwzględniając wcześniej opisane wyniki we współczesnej literaturze dotyczącej somatycznej embriogenezy oraz uwzględniając dorobek naukowy polskich laboratoriów zainteresowanych omawianym przedmiotem.

Warto również zwrócić uwagę na porównywanie uzyskanych wyników dla *M. truncatula* z obowiązującymi danymi dotyczącymi tych samych zagadnień w porównaniu do *Arabidopsis thaliana*.

Szeroki zakres badań jak już wcześniej wspomniałem został uwieńczony poprawnie sformułowanymi 9-ma wnioskami, które odzwierciedlają uzyskane wyniki ale nie zawierają sugestii dotyczącej kontynuacji prac w przyszłości.

Praca jest napisana poprawnym językiem polskim i bardzo estetycznie ilustrowana.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na brak skrótów użytych w pracy a nie przedstawionych w ich spisie. Wydaje się, że określenie pożywki z 2,4-D jest trochę niefortunne. Za błąd uważam nagminnie stosowanie pisowni pełnej nazwy 2,4-D z zastosowaniem „di” zamiast prawidłowego użycia „dwi”. W spisie literatury znalazłem pewny uchybienia w zakresie opisu tego samego tytułu czasopisma raz jest podawany jako skrót poszczególnych słów opisujących tytuł a w innym miejscu zastosowane jest określenie wynikające z wykorzystania inicjałów słów tworzących pełne brzmienie tytułu. Miło jest spotkać swoje nazwisko w cytowanej literaturze obcej pracy, ale w przypadku mojej osoby zacytowała Pani pracę, która dotyczy hodowli gametofitu paproci drzewiastej i tematycznie nie ma nic wspólnego z somatyczną embriogenezą roślin. Wydaje się być bardziej celowym zacytowanie pracy dotyczącej kultury protoplastów gatunku *Trifolium fragiferum*. W przypadku tego gatunku w hodowlach protoplastów obserwowałem podziały komórkowe prowadzące do powstania somatycznych zarodków. Trzy lata temu opublikowano wyniki o somatycznej embriogenezie paproci drzewiastej, co jest odkryciem dla tej grupy roślin, gdzie jestem współautorem.

Należy podkreślić wartość pracy, która została oparta o wykorzystanie dwóch linii materiału eksperymentalnego o wspólnym pochodzeniu ale o przeciwstawnych wartościach potencjału morfogenetycznego oraz o wykorzystanie białek Policomb i Thritorax również o przeciwstawnym charakterze funkcjonowania.

Podsumowując, chciałbym podkreślić, że praca jest obszerna, przedstawia wielki wysiłek Doktorantki jaki włożyła w przeprowadzenie tak licznych eksperymentów zarówno fizjologicznych jak i molekularnych dla których realizacji musiała zadbać o materiał biologiczny pochodzący zarówno z kultur in vitro jak i z fitotronu. Ten element działalności Doktorantki wskazuje na zdolność planowania i na określenie potrzeb jak wcześniej wspomniałem materiału roślinnego ale również odczynników chemicznych i testów biologicznych. Korzystanie przez Doktorantkę z baz danych wskazuje również na jej wysoki poziom wykształcenia współczesnego biologa eksperymentatora. Bardzo sobie cenię element pracy dotyczący domen, jakie zostały stwierdzone u Medicago w stosunku do Arabidopsis. Wyniki pracy dotyczące badań nad rolą białek Policomb i Trithorax wnoszą duży wkład w poszerzenie wiedzy dotyczącej SE.

Wniosek końcowy

Praca jest bardzo dobrze systematycznie i syntetycznie opracowana. Przedstawiono w niej bardzo wartościowe wyniki pogłębiające wiedzę na temat inicjalnych stadiów procesu somatycznej embriogenezy. Odkryto szereg nowych genów. Pogłębiono wiedzę dotyczącą roli białek Policomb i Trithonex w somatycznej embriogenezie. Zobrazowano funkcję stresu w inicjacji badanego procesu. Uzyskane dane są emanacją wieloletniej działalności zespołu kierowanego od lat przez prof. dr hab. Kępczyńską i stanowią podstawę do dalszego śledzenia tego procesu za pomocą innych narzędzi analizy ciała rośliny, ale obecnie tylko za pomocą biologii molekularnej a nie strukturalnej. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą teoretyczną badanego zjawiska, którą zdobyła analizując przeszło dwieście pozycji literaturowych. Dyskusja wskazuje na zdolności Doktorantki w zakresie swobodnej interpretacji wiedzy teoretycznej i eksperymentalnej, którą nabyła w czasie wykonywania doświadczeń związanych z realizacją doktoratu. Ta zdolność stanowi dla mnie przesłankę stwierdzenia, że trud włożony w wykształcenie Doktorantki przyniósł wymierny efekt w postaci pogłębionej wiedzy dotyczącej somatycznej embriogenezy, a dla niej podstawę do dalszego rozwoju naukowego. Wyniki omawianej pracy zostały już po części zaakceptowane przez międzynarodowe gremia i opublikowane. Stąd też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego o dopuszczenie mgr Annę Orłowską do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych.

Mając na uwadze wartość naukową ocenianej pracy doktorskiej zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o jej wyróżnienie.

Chciałbym prosić Doktorantkę o zastanowienie się nad:

- 1) Problemem uszeregowania modelowych gatunków roślin, które mają największy wkład w poznanie somatycznej embriogenezy poza *A. thaliana*.
- 2) W recenzji wspominałem o zaangażowaniu różnych PGR w proces indukcji somatycznej embriogenezy, proszę o podanie gatunków roślin i organów, które były eksplantatami inicjującymi embriogeniczną kulturę w obecności różnych kombinacji substancji wzrostowych.
- 3) Dlaczego tak modelowe w zakresie morfogenezy rośliny jak na przykład tytoń nie są obiektem badań w omawianym obszarze.
- 4) Proszę uprzejmie o podanie innego przykładu wykorzystania związków chemicznych Jodu w kontroli procesów życiowych komórki roślinnej.
- 5) Myślę, że po tylu komplementach związanych z Pani wkładem w poznanie somatycznej embriogenezy Medicago chcielibyśmy wiedzieć czy jeszcze jest coś do zrobienia, a jeżeli tak to w jakim kierunku badania będą przez Panią rozwijane.

