

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Klajn pt. „Zmiany ekspresji genów regulatorowych oraz genów kodujących białka zapasowe w kontroli rozwoju nasion łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) pod wpływem działania giberelin, kwasu abscysynowego oraz suszy”

Dane formalne o rozprawie

Praca doktorska Pani mgr Natalii Klajn została przygotowana została pod kierunkiem dr. hab. Jacka Kęsego, prof. Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu, na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii. Promotorem pomocniczym ocenianej rozprawy jest dr Waldemar Wojciechowski. Prezentowane w niniejszej pracy badania naukowe realizowano w ramach jednego z zadań wieloletniego programu Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi i ustanowionego uchwałą Rady Ministrów nr 222/2015 z dnia 15 grudnia 2015 r. i mającego na celu zwiększenie wartości biologicznej i użytkowej rodzimych źródeł białka roślinnego, a także w ramach projektu badawczego PRELUDIUM finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, uzyskanego w 2017 roku przez Autorkę rozprawy. Ponadto, mgr Natalia Klajn uzyskała wsparcie z funduszy Wydziału (ówcześnie funkcjonującego jako Wydział Biologii i Ochrony Środowiska) w formie trzech grantów indywidualnych na realizację wybranych zagadnień badawczych (np. poznanie sekwencji analizowanych genów bądź określenie profilu ich ekspresji w odpowiedzi na stres suszy). Wyniki tych analiz zostały włączone do niniejszej rozprawy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 184 strony numerowane i jest podzielona na rozdziały w układzie typowym dla prac eksperymentalnych. Są to po kolei (z wyłączeniem strony tytułowej): informacja o źródłach finansowania (1 strona), spis treści (6 stron), streszczenie w języku polskim (2 strony), streszczenie w języku angielskim (2 strony), wykaz skrótów (4 strony), wstęp (41 stron), cel pracy (1 strona), materiały (7 stron), metody (16 stron), wyniki (60 stron), dyskusja (24 strony), wnioski (1 strona) i literatura (19 stron). W rozprawie zamieszczono 8 tabel i 7 rycin, w tym jedną rycinę we wstępie (w celu przedstawienia schematu oddziaływań pomiędzy hormonami roślinnymi, ekspresją genów i ich produktami białkowymi w regulacji syntezy białek zapasowych podczas rozwoju nasion), dwie ryciny w rozdziale opisującym metody oraz cztery w rozdziale przedstawiającym uzyskane wyniki. W tym miejscu warto nadmienić, że na rycinie 1 została błędnie umieszczona proporcja stężeń heksozy do sacharozy na jednym z diagramów, ale jest to błąd edytorski, gdyż w opisie pod ryciną zależności przedstawione są już w sposób zgodny z danymi literaturowymi. Ponadto, w celu wizualizacji wyników zamieszczono w pracy 27 wykresów. Nota bene wprowadzone w pracy rozróżnienie na tabele, ryciny i wykresy nie jest całkowicie jednoznaczne, bowiem rycina nr 7 jest de facto wykresem, zaś rycina nr 2 – tabelą. Są to jednak kwestie jedynie nomenklaturowe, nie mające żadnego wpływu na wartość merytoryczną rozprawy.

Tematyka rozprawy dotyczy mechanizmów regulujących dojrzewanie nasion i akumulację substancji zapasowych u uprawnego gatunku roślin bobowatych (zwanych także motylkowatymi) – łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.). Zagadnienie to jest szczególnie istotne zarówno w kontekście badań podstawowych jak i w aspekcie aplikacyjnym, zwłaszcza, że badania prowadzone są na roślinie strączkowej znanej z wysokiej zawartości białka w nasionach, która w niektórych liniach w korzystnych warunkach uprawy może osiągać 42-44% suchej masy. W kontekście badań podstawowych prace tego typu mogą doprowadzić do poznania procesów odpowiedzialnych za zabezpieczenie optymalnego (pod względem ilościowym i jakościowym) zestawu substancji zapasowych w nasionach, umożliwiającego kiełkowanie i wzrost siewek do czasu

uzyskania przez nie dostatecznej produktywności fotosyntetycznej. W aspekcie aplikacyjnym interesujące jest sprawdzenie możliwości ewentualnego zwiększenia poziomu białek zapasowych poprzez aplikację odpowiednich fitohormonów, jak również ocena wpływu suszy na ekspresję wybranych genów regulatorowych oraz genów kodujących białka zapasowe. Ponieważ stopień zaawansowania tego typu badań w obrębie rodzaju *Lupinus* i spokrewnionych linii ewolucyjnych roślin strączkowych był dotychczas bardzo niewielki, nie mam żadnych wątpliwości, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymóg oryginalności podjętej tematyki badawczej.

Ocena rozprawy

Wstęp wprowadza Czytelnika w zagadnienia objęte tematem niniejszej rozprawy w sposób uporządkowany, przechodząc wpierw od informacji ogólnych - obejmujących etapy stadium generatywnego roślin od przekształcenia merystemu wierzchołkowego pędu w merystem kwiatostanowy po dojrzewanie nasion - do informacji szczegółowych, a zwłaszcza hormonalnej i molekularnej kontroli rozwoju i dojrzewania nasion. Dodatkowo przedstawione są czynniki środowiskowe wpływające na rozwój nasion, ze szczególnym uwzględnieniem suszy, a także krótka charakterystyka badanego gatunku. Pomimo znacznego stopnia złożoności omawianych zagadnień, zwłaszcza w zakresie biosyntezy hormonów i mechanizmów regulatorowych, rozdział ten dobrze się czyta, gdyż jest napisany poprawnie stylistycznie (kilka uwag w tym kontekście zawarłem w dalszej części recenzji).

W części wstępu dotyczącej regulacji hormonalnej w sposób szczegółowy omówione są trzy główne komponenty: kwas abscysynowy – (ABA), gibereliny – (GA)_n i auksyny – kwas indolilo-3-octowy (IAA). Opis szczegółowy obejmuje proces biosyntezy poszczególnych fitohormonów, regulację ich poziomu na drodze molekularnej z uwzględnieniem sprzężeń zwrotnych i najistotniejszych czynników środowiskowych, a następnie ich udział w rozwoju nasion. Dodatkowo, omówiony jest wpływ pozostałych fitohormonów: cytokinin, brasinosteroidów, etylenu, kwasu jasmonowego i strigolaktonów. Ta część wstępu kończy się przedstawieniem poznanych oddziaływań między fitohormonami podczas rozwoju nasion, zarówno o charakterze antagonistycznym jak i synergistycznym. Cytowana literatura obejmuje w tej części pracy szereg artykułów przeglądowych a relatywnie mało publikacji oryginalnych, jednakże to podejście uzasadnione jest ogromną liczbą prac eksperymentalnych, które doprowadziły do – skądinąd jedynie częściowego – rozszyfrowania szlaków biosyntezy fitohormonów, wielopoziomowej regulacji molekularnej (inicjacji ekspresji, modyfikacji białek regulatorowych i ich degradacji oraz inaktywacji samych fitohormonów) i skomplikowanej sieci współzależności. Odniesienie się do poszczególnych prac oryginalnych spowodowałoby niewspółmierny rozrost spisu literatury, który aktualnie liczy 207 pozycji.

W dalszej części wstępu mgr Natalia Klajn przedstawia molekularną kontrolę procesu gromadzenia białek zapasowych, rozumianą jako wpływ czterech głównych czynników transkrypcyjnych (LEC1, LEC2, ABI3 i FUS3). *Ex definitione* fitohormony także są molekułami, ale w nauce przyjęło się określenie, że regulacja molekularna obejmuje procesy wpływające na ekspresję genów i następne poziomy aż po degradację białek. Na szczególną uwagę zasługuje fakt uwzględnienia w tym fragmencie rozprawy wpływu czynników epigenetycznych, a mianowicie remodelowania chromatyny, na zmiany dostępności elementów regulatorowych dla czynników transkrypcyjnych i związane z tym zmiany ekspresji genów. W ostatnich latach ukazują się coraz więcej prac naukowych wskazujących na znaczny udział regulacji epigenetycznej, a zwłaszcza modyfikacji białek histonowych, w kontroli procesów rozwojowych i w generowaniu odpowiedzi na czynniki środowiskowe, a w szczególności stresy abiotyczne. Nota bene tego kontekstu zabrakło w kolejnym podrozdziale, który traktuje o wpływie suszy na rozwój nasion.

Wstęp kończy się krótką charakterystyką łubinów w aspekcie podjętej tematyki badawczej. Po przeczytaniu tego fragmentu odczuwam pewien niedosyt, gdyż nie było w nim odniesień do kilku istotnych prac opisujących białka zapasowe u łubinów, w tym także pierwszej globalnej analizy proteomicznej nasion łubinu żółtego o łatwym do wyszukania tytule: Proteomic characterization of seeds from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.), Ogura T. et al. 2014, *Proteomics*, 14: 1543-1546. Niestety to niedopatrzenie powoduje, że ta praca również nie pojawia się w dyskusji, a mogła stanowić podstawę do ciekawej polemiki, gdyż zawiera również listę wszystkich zidentyfikowanych wówczas białek zapasowych. Niewątpliwie należałoby tę kwestię uzupełnić podczas przygotowywania ewentualnej publikacji. Ponadto, moim zdaniem brakuje we wstępie odniesienia do istniejących zasobów danych molekularnych łubinu żółtego i spokrewnionych gatunków (łubinu białego i wąskolistnego). Zasoby te obejmują m.in. sekwencje transkryptomu dla wszystkich trzech gatunków i sekwencje genomu dla łubinu białego i wąskolistnego opublikowane w latach 2017-2022. Dane tego typu mogą być wykorzystane do analizy wyników uzyskanych metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania transkryptomu, a takie sekwencjonowanie zostało wykonane w niniejszej rozprawie. Podsumowując, po przeczytaniu wstępu nie mam wątpliwości, że zakres wiedzy Autorki jest bardzo szeroki i obejmuje tematykę niezbędną do przeprowadzenia zaplanowanych badań, zaś wspomniane kwestie mogą wynikać ze znacznego postępu naukowego i szybkiego przyrostu liczby publikacji w ostatnich latach, co utrudnia skonstruowanie syntetycznego, a jednocześnie kompletnego opisu.

Cel pracy jest krótkim rozdziałem, w którym w sposób przekonywujący uzasadniono podjęcie tematyki badawczej niniejszej rozprawy oraz sprecyzowano cele szczegółowe. Mając na uwadze relatywnie zaawansowany postęp prac na gatunku modelowym i innych gatunkach roślin przedstawiony we wstępie, można było w tym rozdziale sformułować kilka hipotez badawczych, aby ukierunkować uwagę na rozwiązanie określonego problemu badawczego. Tym bardziej, że później, w dyskusji, pojawiają się odniesienia do literatury i określenie ewentualnej zgodności z tym, czego można było się spodziewać biorąc pod uwagę mechanizmy regulatorowe wyczerpująco omówione we wstępie.

W rozdziale opisującym stosowane materiały następuje wpieryw zestawienie stosowanych odczynników chemicznych i zestawów do izolacji RNA i białek oraz oceny jakości izolatów, reakcji PCR (w tym także ilościowego PCR), a także chromatografii nanoLC-MS/MS, izolacji fitohormonów i chromatografii LC-MS/MS. Podane są także środki chemiczne do uprawy roślin, hormony roślinne oraz używane specjalistyczne oprogramowanie komputerowe. Podanie nazw handlowych oraz producentów odczynników zasługuje na uznanie, gdyż umożliwia ewentualne odtworzenie tych doświadczeń w przyszłości przez niezależne zespoły badawcze. W tym rozdziale przedstawiony jest także materiał roślinny oraz schemat doświadczeń ukierunkowanych na ocenę wpływu aplikacji hormonów roślinnych oraz suszy. Wybór odmiany łubinu żółtego Taper jako materiału roślinnego jest bardzo trafny, gdyż odmiana ta była już stosowana w wielu pracach eksperymentalnych opisujących między innymi mechanizm opadania kwiatów (zarówno na poziomie tkankowym jak i molekularnym) oraz atlas ekspresji genów. Warto w tym miejscu podkreślić, że w pracy zastosowano szeroki wachlarz metod badawczych, pozwalających na profilowanie zmian w badanych obiektach na poziomie RNA, białek i hormonów roślinnych. Były to zarówno metody wysokoprzepustowe, jak sekwencjonowanie RNA przy użyciu urządzenia Illumina HiSeq 4000, rozdział chromatograficzny białek metodą chromatografii cieczowej wykorzystującej nano-przepływy z tandemową spektrometrią mas (nanoLC-MS/MS), czy też rozdział chromatograficzny fitohormonów metodą LC-MS/MS, jak również tradycyjne metody oznaczania ekspresji genów, czyli reakcja odwrotnej transkrypcji i PCR w czasie rzeczywistym.

Najbardziej rozbudowaną część pracy stanowi rozdział przedstawiający wyniki przeprowadzonych analiz i doświadczeń. Autorka w pierwszej części przedstawia wyniki analizy danych RNA-seq, jednakże tylko w odniesieniu do wybranych wcześniej genów kandydujących, o których z danych literaturowych wiadomo, że uczestniczą regulacji rozwoju nasion i gromadzenia białek zapasowych. Wszystkie badane geny wykazały istotne zmiany poziomu ekspresji pomiędzy analizowanymi terminami, przy czym największe różnice zaobserwowano dla genów *LIBETA* i *LIDELTA* (wzrost poziomu ekspresji rzędu 3-5 tysięcy razy). W tym miejscu nasuwa się pytanie, dlaczego nie wykonano różnicowego profilowania ekspresji genów z wykorzystaniem sekwencji genomu organizmu blisko spokrewnionego (łubinu wąskolistnego), opublikowanej w sierpniu 2016 roku. Taka analiza mogła by się przyczynić do identyfikacji nowych genów kandydujących, a także dostarczyć informacji o ewentualnej sub-funkcjonalizacji genów zduplikowanych. Nota bene, w rozprawie brak informacji, czy badane geny występowały w pojedynczej kopii, czy też tych kopii było więcej i analizowano je w sposób zbiorczy. Ta informacja jest istotna w odniesieniu do historii ewolucyjnej rodzaju *Lupinus*, który przeszedł najprawdopodobniej dwie rundy duplikacji całego genomu – jedną wspólną dla kladu roślin strączkowych, a drugą w obrębie własnej linii ewolucyjnej. Pozostałościami po tych wydarzeniach mogą być „dodatkowe” kopie genów, jak to obserwuje się np. w przypadku głównego genu integratorowego szlaków indukcji kwitnienia – *FLOWERING LOCUS T*, który występuje u łubinów w czterech kopiach. Ponadto, różnicowa analiza ekspresji genów umożliwia późniejszą ocenę nadreprezentacji grup genów o różnych funkcjach, co w kontekście niniejszej rozprawy byłoby bardzo przydatne do wnioskowania o procesach zaangażowanych w gromadzenie substancji zapasowych w nasionach. Warto zatem rozważyć przeprowadzenie takiej analizy w przyszłości, na przykład przy okazji przygotowywania publikacji.

Na kolejnych stronach mgr Natalia Klajn przedstawiła wyniki analizy ekspresji wybranych genów badanych metodą PCR w czasie rzeczywistym w odniesieniu do genu referencyjnego w trzech terminach pomiarowych (15, 20 i 30 dni po wykształceniu kwiatów), trzech wariantach badawczych (kontrola, aplikacja ABA lub GA) i trzech punktach czasowych (0, 4 i 8 godzin). Warto podkreślić, że na rycinach oznaczono 95% przedziały ufności i istotność statystyczną różnic pomiędzy próbami lub grupami prób, co umożliwia samodzielną interpretację wyników niezależnie od przedstawionych opisów. Opisy poszczególnych profili są mocno rozbudowane i można byłoby je uprościć poprzez omówienie profilu przebiegu zmian ekspresji dla prób kontrolnych, a następnie wypunktowanie jedynie istotnych statystycznie różnic obserwowanych w próbach badanych. W przypadku wariantów kontrolnych obserwowane trendy przebiegu ekspresji w czasie były zazwyczaj zgodne z wynikami analizy RNA-seq, z pewnymi wyjątkami (np. gen *LIPKL*), przy czym obserwowane niezgodności mogą wynikać z odmiennych warunków środowiskowych w 2017 roku (próby do RNA-seq) i w latach kolejnych (próby do qPCR), a także nieco różnych terminów próbkowania (10 dni vs 15 dni). Kwestia ta jest zresztą w odpowiedni sposób podjęta w rozdziale obejmującym dyskusję wyników. Wpływ hormonów na poziom ekspresji był szczególnie wyraźny w przypadku trzech genów: *LIAB13*, *LIPKL* i *LIBETA*, co również jest wyjaśnione w dyskusji. Następnie Autorka przedstawia wpływ suszy na poziom ekspresji czterech wybranych genów (dwóch kodujących konglutyny beta i delta oraz dwóch regulatorów procesu akumulacji białek zapasowych), wykazując statystycznie istotne różnice dla genu *LIAB13*. Analizy proteomiczne wykazały istotne różnice w profilach białkowych pomiędzy poszczególnymi terminami i wzrost ilości konglutyn w miarę rozwoju nasion, przy jednoczesnym braku istotnego wpływu aplikacji fitohormonów. Wynik ten stanowi istotną informację dla hodowców łubinu, którzy hipotetycznie mogliby próbować poprawić jakość nasion przez aplikację fitohormonów, a dzięki tym badaniom wiadomo, że takie podejście będzie prawdopodobnie nieskuteczne (przynajmniej dla tych używanych w niniejszej rozprawie: ABA i GA₃). Część wynikową rozprawy kończy analiza wpływu

podanych fitohormonów (ABA i GA₃) na endogenny poziom ABA, GA₁, GA₃, GA₄, GA₇ i IAA. Najwyraźniejszy wpływ wystąpił w przypadku ABA (wzrost po aplikacji ABA), GA₃ (wzrost po aplikacji GA₃), GA₇ (spadek po aplikacji ABA) oraz GA₄ i IAA (spadek po aplikacji ABA bądź GA₃). Należy zauważyć, że wspomniane efekty występowały tylko w części punktów pomiarowych.

Dyskusja została napisana w sposób zwięzły, z podziałem na podrozdziały, które odpowiadają poszczególnym zagadnieniom opisanym w części wynikowej. Uzyskane wyniki są omówione na tle doniesień literaturowych dla rośliny modelowej (*Arabidopsis thaliana*), a także - jeśli to było możliwe - gatunków roślin strączkowych lub innych gatunków roślin dla których wykonano podobne analizy. Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr Natalia Klajn w tym rozdziale poddaje dyskusji nie tylko wyniki zgodne z danymi literaturowymi, lecz także podejmuje próbę wyjaśnienia przyczyn zaobserwowanych rozbieżności. Świadczy to o dojrzałej i odpowiedzialnej postawie naukowej Autorki niniejszej rozprawy. Dyskusję zamyka dziewięć wniosków, z których trzeci moim zdaniem wymaga poprawy, bowiem w obecnym brzmieniu nie ma poparcia w uzyskanych wynikach. Autorka wnioskuje, że efektywne gromadzenie konglutyn u łubinu żółtego jest skutkiem funkcjonowania sieci czynników transkrypcyjnych *LILAFL*. Oczywiście dane literaturowe na to wskazują, natomiast w pracy wykazano wręcz, że związek pomiędzy profilem ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne *LILAFL*, a zawartością konglutyn w nasionach nie jest aż tak wyraźny, jak to opisywano dla innych gatunków.

Pozostałe pytania i uwagi

Autorka niniejszej rozprawy nie ustrzegła się niewielkiej liczby drobnych błędów, które często pojawiają się w opracowaniach (błędy w pisowni niektórych skrótów i nazw genów – np. „ABA-INSENSITIV3”, „PIKLE”; niepoprawne formy gramatyczne – np. „różnych etapach rozwoju nasionach”; czy nietypowy dobór słów – np. „ruchy fitohormonów” zamiast transport/dystrybucja, tudzież „w narządach korzeni” czyli po prostu w korzeniach; szlak MEP „opisany został u roślin niższych i bakterii” - i u roślin wyższych – o czym zresztą jest wspomniane w innej części pracy). Kilka sformułowań pojawiających się w rozprawie doktorskiej wymaga jednak bardziej szczegółowego uzupełnienia:

1. Na str. 43 Autorka napisała, że czynniki transkrypcyjne wiążą się do sekwencji zlokalizowanych w promotorach genów docelowych. Jest to moim zdaniem zbyt duże uproszczenie, gdyż czynniki transkrypcyjne wiążą się także do tzw. sekwencji wzmacniających (ang. enhancer) położonych w dużej odległości (co najmniej kilku tysięcy par zasad) od klasycznie pojmowanych promotorów. Zjawisko to występuje szczególnie często w regulacji procesów rozwojowych u roślin, a zwłaszcza w fazie generatywnej. W związku z tym proszę o krótkie omówienie w jaki sposób dochodzi do interakcji pomiędzy tak oddalonymi od siebie regionami.
2. Na str. 68 jest wspomniane, że „do utworzenia genomu referencyjnego użyto 197917268 odczytów”. Domyślam się, że Autorka miała na myśli transkryptom referencyjny, gdyż do utworzenia bibliotek do sekwencjonowania użyto próby zawierające izolat RNA. Przy tej okazji chciałbym poprosić o przedstawienie przez Autorkę informacji o opublikowanych sekwencjach genomów i transkryptomów uprawnych gatunków łubinów Starego Świata, które mogą być przydatne do analizy danych sekwencyjnych uzyskanych dla łubinu żółtego.
3. Na tej samej stronie Autorka opisuje reakcję odwrotnej transkrypcji (oznaczoną skrótem qPCR) i reakcję real-time PCR (oznaczoną RT-qPCR). Otóż qPCR jest skrótem od quantitative PCR (ilościowy PCR), a nie od reakcji odwrotnej transkrypcji (reverse transcription PCR = RT-PCR). Ilościowy PCR to PCR z detekcją w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Jako, że obliczenia wykonywano w odniesieniu do

jednego genu referencyjnego, chciałbym się dowiedzieć, czy testowano istotność różnic w wartościach Cq pomiędzy wariantami doświadczenia i/lub terminami dla tego genu i jaki był wynik tego testu. Warto byłoby także sprawdzić, czy ten gen wykazywał stabilną ekspresję na podstawie uzyskanych danych RNA-seq.

4. Str. 82. Liczba miejsc po przecinku przy podawaniu wyniku np. pomiaru stężenia powinna być zbliżona do dokładności metody. Podawanie z dokładnością do 4 miejsc po przecinku wartości stężenia RNA lub 6 miejsc po przecinku wartości ilorazu 25S/18S jest nieuzasadnione. Podobnie jest w przypadku zapisu liczb w notacji naukowej.
5. Str. 84. Czy powtórzenia biologiczne były sekwencjonowane osobno, a jeśli tak, to dlaczego na wykresach nie podano zakresów odchylenia standardowego między powtórzeniami lub przedziałów poziomu ufności?
6. W przypadku wykresów nr 6 i 7 zastosowanie skali logarytmicznej na osi y pozwoliłoby na wizualizację zmian poziomu ekspresji pomiędzy wartościami zarówno należącymi do tego samego rzędu wielkości (np. 1 i 3) jak i do różnych rzędów (np. 3 i kilka tysięcy). Aktualnie nie widać różnicy pomiędzy pierwszymi dwoma punktami pomiarowymi (i oba wyglądają na zerowy poziom ekspresji), mimo, że ten poziom ekspresji nie jest zerowy, zaś różnice te są w obu przypadkach istotne statystycznie.
7. Str. 103. Terminy „liniowy” i „krzywoliniowy” mają ścisłe znaczenie w odniesieniu do zależności między zmiennymi i ich użycie sugeruje wykonanie obliczeń i uzyskanie istotnych statystycznie wartości odpowiednich współczynników. Dla zależności liniowej może być to współczynnik korelacji liniowej Pearsona, zaś dla zależności krzywoliniowej wyznaczenie linii regresji i obliczenie współczynnika determinacji, który jest miernikiem zgodności wyznaczonej linii regresji z danymi w próbce. W pracy nie wspomniano o takich obliczeniach, więc użycie tych terminów nie jest uzasadnione. W zamian można napisać, że obserwowano stopniowy wzrost /spadek ekspresji w czasie lub niejednoznaczny trend (wpierw wzrost, potem spadek i *vice versa*).

Wniosek końcowy

Podsumowując, przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską mgr Natalii Klajn pt. „Zmiany ekspresji genów regulatorowych oraz genów kodujących białka zapasowe w kontroli rozwoju nasion łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) pod wpływem działania giberelin, kwasu abscysynowego oraz suszy” oceniam pozytywnie. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, Autorka wykazała również ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej i podjętej tematyce badawczej, zaś lektura rozprawy nie budzi wątpliwości, że Autorka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w tym także krytycznego podejścia w trakcie analizy uzyskanych wyników. Biorąc pod uwagę owe wnioski stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 art. 13 i Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 art. 187). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Natalii Klajn do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.

Michał Książkiewicz

Dr hab. Michał Książkiewicz