

RECENZJA

pracy 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"**

Zakończony sukcesem ewolucyjnym rozwój ogromnej większości roślin kwiatowych, opiera się na wytworzeniu przez nie nowych organów, czyli owoców zawierających nasiona. Kluczowa rola nasion, zapewniających następstwo kolejnych pokoleń tej rośliny, wymaga jednak akumulacji w tych nasionach wysokiej zawartości substancji zapasowych, bogatych w energię, takich jak tłuszcze oraz zapasowe białka. Substancje te stanowią bowiem wyłączone zaopatrzenie nowej rośliny w energię metaboliczną do momentu, gdy wytworzy ona zielone organy wegetatywne, które same zaczną produkować asymilaty. Prawidłowe wypełnienie nasion stanowi dla rośliny matecznej poważny wysiłek i ma charakter decyzji o krytycznym znaczeniu. Roślina musi bowiem pogodzić dwa przeciwstawne wymagania – wytworzyć jak największą liczbę nasion oraz zapewnić im pełne zaopatrzenie energetyczne. Nic dziwnego, że rozwój generatywny podlega regulacji przez wiele mechanizmów, które w większości działają jako ograniczniki, powstrzymujące rośliny przed zbyt wczesnymi lub zbyt ryzykownymi decyzjami. Trzy pierwsze, czyli fotoperiodyzm, wernalizacja i w pewnym stopniu także spoczynek nasion, optymalizują moment zainicjowania fazy generatywnej. Zwykle jednak skutek ich działania jest „nadmiarowy” i powstaje zbyt duża liczba młodych zarodków, więc w dalszej kolejności włączają się mechanizmy kontroli liczby zawiązków organów generatywnych powodujących aborcja, czyli odrzucanie nadmiarowej liczby tych organów. Mechanizm tej regulacji jest tak samo ważny, jak wcześniej wspomniane procesy, zapewniając prawidłowe wypełnienie nasion, a dla nas stanowiących podstawę wyżywienia. Tu pojawia się problem, bo nawet optymalnie wypełnione nasiona, ale jeszcze nie dojrzałe, nie byłyby zdolne do przetrwania w warunkach naturalnych do momentu, kiedy będą mogły wykiełkować. W tym celu muszą one zostać poddane procesom obejmowanym terminem dojrzewania. Dojrzewanie to stopniowe odwodnienie tkanek zapasowych nasienia, wzmocnienie łupiny nasiennej, a nawet wysycenie jej substancjami nieprzyjemnymi lub szkodliwymi dla roślinożerców, a także zmiana składu białek zapasowych dostosowująca je do szybkiej hydrolizy podczas pęcznienia i kiełkowania. To jedno proste zdanie obejmuje ogromną grupę molekuł, które te procesy realizują, a więc enzymów, cząsteczek mRNA, które kodują te enzymy, dalej substancji sygnałowych uruchamiających syntezę tych mRNA i na koniec całą gamę fitohormonów i innych związków sygnałowych i antyoksydacyjnych, które umożliwiają powstanie nowej jakości biologicznej, czyli suchego nasienia, które pozostaje żywe i zdolne do szybkiego kiełkowania, pomimo drastycznego odwodnienia. Prawdopodobnie już pierwotni rolnicy dostrzegli zadziwiające zjawisko polegające na tym, że rośliny zielne, zjadane w stanie świeżym, do siewu muszą być użyte, jako suche twarde nasiona. Natomiast współcześnie biolodzy, fizjologowie i rolnicy zastanawiają się przewrotnie, czy ten tajemniczy proces można wykorzystać, zadając sobie pytanie, czy niedojrzałe lub nasiona nie mają większej wartości odżywczej niż te same organy po

wysuszeniu. Wiele produktów spożywczych, np. zielony groszek, fasolka, czy bób, zbiera się w fazie daleko niedojrzałej. Dzięki temu można zjadać organy niejadalne w stanie suchym (łupiny nasienne, czy okrywy strąka), powstaje więc pytanie, czy nie można by rozszerzyć listy gatunków tak samo użytkowanych, w tym nawet zbóż czy rzepaku. W tym miejscu schodzą się i spotykają dwie ścieżki badawcze – teoretyczna i aplikacyjna, obie tak samo ważne dla żywnościowej przyszłości ludzi.

Tu dotarłem do głównych powodów, dla którego uważam, że problem, któremu poświęcona jest niniejsza rozprawa, jest niezwykle ważny i wart szczegółowego zbadania. Obejmuje on procesy zachodzące podczas dojrzewania nasion, a ja tylko dodałem nadzieję na możliwość sterowania ich przebiegiem tak, by zbiór nasion następował wtedy, gdy osiągnęłyby one maksymalną wartość odżywczą lub czasem prozdrowotną. Dobrze, że Doktorantka przeprowadziła swoje badania na łubinie żółtym, który, choć już teraz zasługuje na dużo większe zainteresowanie rolników, doczeka czasów, gdy jego słodkie odmiany staną w rzędzie głównych gatunków uprawnych. Z tego powodu praca doktorska Pani Klajn nabiera potencjalnie charakteru także praktycznego, o czym świadczy fakt, że badania te były w części finansowane w ramach tzw. Programu Wieloletniego, którego celem było zwiększenie produkcji i wykorzystania krajowych źródeł białka paszowego, a głównym źródłem tego białka są rośliny strączkowe, a wśród nich żółty łubin. Na koniec dodam jeszcze, że w naszych wcześniejszych badaniach (także w ramach Programu Wieloletniego), stwierdziliśmy, że zmiany składu nasion po wysuszeniu powodują obniżenie ich wartości odżywczej dla człowieka i stąd zastanawialiśmy się, czy byłoby możliwe „zamrożenie” składu nasion niedojrzałych na drodze ich równoczesnego zamrożenia i wysuszenia. Z powyższych powodów uznaję, że tematyka badawcza omówiona w rozprawie doktorskiej Pani mgr Natalii Klajn jest niezwykle ważna i potrzebna.

Uwagi ogólne o pracy

Rozprawa jest niezbyt obszerna – pomyślałem, biorąc dzieło do ręki. Jednak, że byłem w błędzie, bo całość obejmuje 184 strony, ale ... obustronnego druku. Taki system edycji rozpraw doktorskich powinien się upowszechnić. Właściwa rozprawa zaczyna się spisem, nie eksperymentów, nie najważniejszych celów, ale zaskakująco - wykazem, pięciu projektów, którymi kierowała Doktorantka, a z których finansowana była jej praca doktorska. Znajdziemy tam projekt NCN PRELUDIUM, Wieloletni program MR i RW, a także trzy granty indywidualne w ramach UMK. Tak, dotarliśmy niestety do czasów, gdzie to nie badacz ale bliżej nieznanne gremia recenzentów, naukowców i urzędników, decydują o tym, który problem naukowy zasługuje na dofinansowanie. Na szczęście w przypadku Doktorantki recenzenci wyjątkowo dobrze trafili. W dalszej kolejności pracy następuje spis treści. Sam ten spis zajmuje 6 stron druku, co świadczy o chyba nadmiernie detalicznym podziale całego tekstu. Przykładowo, na stronie 66 mamy 6 podtytułów. Dalej występuje zestawianie skrótów, na którym zatrzymam się przez chwilę. Rozumiem, że skoro Doktorantka zatytułowała ten rozdział, jako „wykaz” skrótów, to czytelnik nie powinien spodziewać się czegoś innego, jak tylko wykazu. Jednak, jeżeli napotkałem skróty takie jak ABA, BR, FAO, JA, czy z końca spisu Trp, wówczas takie wyjaśnienie, choćby częściowe, jest, a przy innych tajemniczych skrótach, JAK FASP, LAX, PICKLE, WAL1, WAT1 WALLS ARE THIN, brak jest ich objaśnienia, czy choćby tylko rozkodowania. Reasumując, nie ma potrzeby wprowadzać wykazu

tylko dla niego samego. W dalszej części pracy znajduje się obszerne wprowadzenie, sformułowanie celu podzielonego na etapy i opis materiału roślinnego i metod badawczych. Dalej następuje prezentacja uzyskanych wyników, stanowiąca najobszerniejszy segment pracy oraz ich dyskusja. Stwierdzam zatem, że przedstawiona rozprawa ma strukturę klasyczną i kompletną. Rozprawa jest dość obszerna, jak zaznaczyłem wcześniej, obejmuje 184 strony, w tym 27 wykresów, 7 rycin i 8 tabel, a także 207 pozycji literatury. Została napisana poprawnym językiem z naprawdę minimalną liczbą usterek. Język jej jest komunikatywny i nie sprawia trudności w czytaniu.

Wstęp (Przegląd literatury)

Pierwszą część wstępu stanowi szczegółowy opis procesów cytologicznych i molekularnych, odpowiedzialnych za przebieg rozwoju, roślin, a zwłaszcza ciągu procesów zachodzących u roślin w komórkach merystemów wierzchołkowych. Obserwuje się w nich sekwencję aktywowania się genów, która prowadzi do stopniowego zastępowania komórek wegetatywnych przez generatywne i tym samym kształtowania się pąków kwiatowych z nowymi organami jak np. poszczególne elementy kwiatów. Aktywacja generatywna merystemów zwykle nie obejmuje całego organizmu, co pozwala na równoczesny wegetatywny wzrost jednych, np. bocznych pędów i kontynuację kwitnienia pędu głównego. W naszych dawnych eksperymentach na ozimym rzepaku wykazaliśmy, że jeśli zaszczepiliśmy niewernalizowany wegetatywny wierzchołek wzrostu na szczycie pędu w miejsce usuniętego wierzchołkowego pąka kwiatowego, wówczas ten nowy wierzchołek zaczynał wytwarzać pąki kwiatowe, wszakże jednak pod warunkiem, że systematycznie usuwaliśmy liście ze zraza, a boczne pędy kwiatowe z pokładki. **To zaś wydaje się oznaczać, że istnieje w roślinie dynamiczna równowaga pomiędzy organami wegetatywnymi i generatywnymi, coś jakby przypadek chemicznego prawa działania mas. Chciałbym poznać opinię Doktorantki w tej sprawie.**

Następna część wstępu, stanowi profesjonalną pracę przeglądową na temat hormonalnej kontroli rozwoju nasion. Napisana została w formie praktycznie gotowej do druku. Jestem przekonany, że nie po winno być z tym żadnego problemu. Na wstępie garść informacji ogólnych. Doktorantka zwróciła uwagę na fakt, że u roślin produkcja hormonów jest rozproszona, zaś u roślin skupia się w wyspecjalizowanych organach lub gruczołach. Idąc za tą ukrytą sugestią zastanowiłem się, czy rzeczywiście zwierzęta dokonały postępu ewolucyjnego. Zostawmy jednak ten problem. Doktorantka przeszła następnie do omawiania roli kolejnych grup hormonów, przyjmując sekwencję: biosynteza, drogi regulacji i udział w rozwoju nasion. ABA działa poprzez sieć sygnalizacyjną, a więc wymaga receptorów a następnie, na przykład na poziomie transkrypcji, poprzez zależne od ABA czynniki transkrypcyjne, „wykonawcze”, które regulują procesy uruchamiane w nasionach, np. zazielenianie nasion, akumulacja materiałów zapasowych, tolerancję na suszę czy inicjację kiełkowania. To zaś oznacza, że ABA zaznacza swoją rolę we wszystkich, pozornie nawet wykluczających się procesach, jak, najpierw odcinanie nadmiarowych zarodków, a potem indukcja tolerancji nasion na suszę czy regulacja ich spoczynku. Następnie Doktorantka omówiła drugą niezwykle ważną grupę hormonów, jak gibereliny i niewątpliwie najważniejszy z nich, czyli kwas giberelinowy (czy giberelowy?) GA₃. Z giberelinami sprawa jest niewątpliwie wielce złożona, ponieważ, pomimo iż najważniejszą jednostką jest GA₃, znanych

jednostek chemicznych o szkielecie węglowym gibanu, jest 130, a być może więcej, które mogą przechodzić jedna w drugą, które mogą być zdeponowane w komórkach, jako formy zapasowe – nieaktywne, albo służyć do syntezy innych jednostek hormonalnych, a tylko niewiele z nich wykazuje inną, oryginalną aktywność fitohormonalną. Autorka pisze tak „Dla tak krytycznie ważnego czynnika musi istnieć wiele poziomów regulacji, konieczne jest także funkcjonowanie skomplikowanej sieci zależności kontrolującej homeostazę giberelin na wielu poziomach, zarówno biosyntezy, degradacji, transportu jak i akumulacji” i niech to zdanie będzie podsumowaniem dla podrozdziału o giberelinach.

Następną omawianą grupą hormonów roślinnych są auksyny z naczelnym hormonem IAA. Ten poziom regulacji rozwoju roślin ujawnia swoją specyficzność opartą o regulację lub raczej wyznaczenie i stabilizację polarność w komórkach. Auksyny współdziałają także z szeregiem wcześniej omawianych hormonów. Tak więc rola tych substancji, pomimo iż najwcześniej odkrytych, a dokładniej najpierw odkrytych (IAA), a dopiero później nazwanych, wydaje się być związana z najwcześniejszym okresem życia komórki, od podziału komórki wierzchołkowej, i poprzez najwcześniejsze okresy rozwoju zarodkowego, co oczywiście nie oznacza, że rola auksyn w następnych etapach rozwoju się kończy (patrz procesy związane z foto- i geotropizmem).

Na końcu tego rozdziału Doktorantka opisała inne hormony, jak cytokininy, brassinosteroidy, etylen, JA i strigolaktyny (SL), do czego dodałbym jeszcze inne, na przykład butenolid i jego pochodne, albo fitochromy.

Jako rodzaj podsumowania Doktorantka opisała i przedstawiła graficznie współdziałanie różnych hormonów, a dokładniej nakładających się na siebie gradientów różnych hormonów, które łącznie składają się jakby na przestrzenną sieć, w ramach której następuje wzrost i rozwój komórek. **Oczywiście można się zastanawiać, czy to komórki rosnące i rozwijające się pod działaniem swoich genomów stwarzają sieć gradientów hormonalnych, czy wytworzona albo gotowa do powstania sieć gradientów powoduje, że pod jej wpływem powstaje ostateczny kształt organizmu roślinnego. Oczywiście nie można zapominać o gradiencie troficznym, gradiencie energetycznym, czy wreszcie o gradientach wszystkich innych substancji doptywających do komórek z ich otoczenia, a gdyby tego było mało, nie zapominajmy, że wszystko to rozgrywa się wewnątrz kształtu rośliny, odgradzonego przez komórki epidermy zakreślającej i rozgraniczającej wnętrze organizmu od otoczenia, przez którą przenikają do wnętrza rośliny wszystkie sygnały i informacje ze środowiska zewnętrznego.**

Generalnie rozdział ten oceniam jako profesjonalny i nadal uważam, że można z niego stosunkowo niewielkim kosztem uzyskać wartościową pracę przeglądową. Ponadto z uznaniem patrzę na wysoki stopień opanowania przez Doktorantkę wiedzy na temat procesu tak podstawowego dla sukcesu następnych pokoleń, jak regulacja rozwoju. Natomiast interesują mnie dwa problemy, na które chciałbym zaprosić Doktorantkę do wypowiedzi

- **Czy możliwa byłaby uprawa żółtego łubinu jak rośliny ozimej. Z powodu efektu cieplarnianego można spodziewać się cieplejszych zim, a zimowe zapasy wody w glebie mogłyby pozwolić roślinom na „ucieczkę” przed wiosenną suszą i coraz częstszymi wiosennymi okresami upałów. Poza tym zbiór roślin następowałby nieco wcześniej.**

- **Cenimy rośliny strączkowe za biologiczne wiązanie azotu i wszystkie dobre dla nas skutki tego procesu. Gdyby jednak pokusić się o tyżkę dziegiu..... Jest prawo termochemiczne, które**

powiada, że jeśli mamy substancję A, która przechodzi w substancję B, to gdyby nawet to przejście odbywało się po różnych drogach, to i tak na każdej z tych dróg potrzeba dokładnie tyle samo energii. Mam na myśli proces N_2 (atmosferyczny) \rightarrow $N_{\text{organiczny}}$ który może zachodzić w brodawkach korzeniowych albo w fabryce nawozów azotowych podawanych roślinom. W obydwu przypadkach ilość energii potrzebnej np. na otrzymanie 1 kilograma nawozu azotowego, jest taka sama, jednak w fabryce będzie to energia spalania gazu ziemnego, zaś w roślinie energia z fotosyntezy, która mogłaby zostać zgromadzona w nasionach roślin strączkowych ale zamiast tego energia ta została skierowana do brodawek korzeniowych. Zachodzi więc pytanie, czy rzeczywiście obydwie surowce energetyczne są równocenne, tzn. czy można by palić w fabryce nasionami łubinu? (W dniu, w którym napisałem powyższy akapit, podano informację, że zakłady azotowe w Tarnowie zatrzymały instalację do produkcji nawozów azotowych z powodu braku gazu ziemnego – głównego paliwa w tej produkcji)!

Cel pracy Doktorantka Przedstawiła następujące cele swoich badań:

- Identyfikacja łubinowych homologów genów regulatorowych oraz genów kodujących białka zapasowe w nasionach łubinu, czyli konglutyny,
- Określenie poziomu ekspresji tych genów w kolejnych dniach w kolejnych dniach rozwoju nasion,
- Zbadanie ekspresji tych genów pod wpływem aplikacji ABA i GA,
- Zbadanie ekspresji genów j.w. w wyniku okresowego niedoboru wody
- Zbadanie zmian akumulacji białek zapasowych w trakcie rozwoju nasion i pod wpływem ABA oraz GA.

Tak zarysowane cele uznaję za bardzo ambitne i przyjąłbym rozprawę nawet gdyby Doktorantka zrealizowała nie wszystkie z nich.

Materiały analityczne Przejrzałem zestawienie odczynników, innych materiałów i programów komputerowych i pomyślałem, że żaden recenzent publikacji, więc tym bardziej ja sam, nie mógłbym zgłosić zastrzeżeń. Pomyślałem jednak, że jeszcze trochę, a wszystkie odczynniki, jakich bym użył, będą musiały pochodzić od określonego producenta, podobnie jak woda destylowana lub oczyszczana w inny określony sposób. Zauważmy, że POCH uzyskał prawo do oficjalnej produkcji bezwodnego etanolu (choć jaki tam on bezwodny, nie wiadomo, co stanowi 0,2% jego składu), a eksperymentator nie może samodzielnie przygotować buforu Tris-EDTA o pH 8.0, ani buforu HEPES, ani nawet buforu octanowego (1mM, pH 7-8) ani użyć betamerkaptoetanolu innego pochodzenia niż dobrze widziane (nie mam na myśli skunksa). Poczułem jak najbardziej podstawowa wiedza chemiczna ulatnia się z mojej głowy. Żeby nikt nie pomyślał, że są to moje zastrzeżenia kierowane do Doktorantki, stwierdzam stanowczo, że wykaz odczynników i innych reagentów, został przygotowany bardzo porządnie i sumiennie.

Jeśli idzie o przygotowanie materiału roślinnego, czyli roślin łubinu, w szczególności opryskanych roztworami ABA lub GA_3 z dodatkiem środka powierzchniowo czynnego Tween20, to obawiam się, że ktoś na moim miejscu oczekiwałby jeszcze jednego obiektu kontrolnego w postaci roślin opryskanych tylko wodą, aby uwzględnić ewentualny wpływ Tweenu, bo w końcu jest to środek powierzchniowo czynny. Osobiście uważałbym jednak, że to przesada, ponieważ obiektem

badań są młode nasiona zamknięte w strąkach. **Poza tym, wiem z doświadczenia, że, wbrew pozorom, susza jest trudnym parametrem i może sprawiać niespodzianki. Stąd moje pytanie o to, jak Doktorantka określała poziom suszy w naczyniach wegetacyjnych?**

Metody analityczne

W tej części pracy Autorka przedstawiła wykaz i opisała zastosowane w rozprawie metody analityczne. Wykaz ten jest tak bogaty, że nie byłoby zasadne, aby wszystkie te metody dyskutować, bo najczęściej są to metody opisane przez producentów reagentów, ich zestawów czyli „kitów” oraz aparatów badawczo/pomiarowych. Jednak podkreślam swoje uznanie, że Doktorantka zdołała opanować wszystkie opisane w pracy metody analityczne i statystyczne.

Wyniki

Jest to najobszerniejszy rozdział stanowiący 1/3 całej w całej rozprawie. Autorka uzyskała następujące ważniejsze wyniki:

- Otrzymała bardzo wysokiej jakości preparaty RNA z nasion łubinu żółtego, pobranych 15, 20 oraz 30 dni po kwitnieniu, to jest w nasionach o różnym stopniu rozwoju i różnym zaawansowaniu gromadzenia białek zapasowych. **Zapytam tylko, czy terminy pobierania, materiału do badań zostały wybrane arbitralnie, czy też w tych terminach następują jakieś kluczowe zmiany rozwojowe w nasionach, np. osiągnięta została maksymalna ich masa, rozpoczęły się procesy dojrzewania itp.**
- Wybrała 7 genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem materiałów zapasowych pochodzące z różnych roślin ale głównie ze strączkowych, i zidentyfikowała ich sekwencje w bibliotekach genowych. Uzyskała ok 90% zgodności genów wybranych z bibliotek i tych z punktu poprzedniego, czyli dla łubinu żółtego. Wyselekcjonowano i oznaczono sekwencję genów związanych z gromadzeniem materiałów zapasowych jak LIPKL, LILEC2, LIABI3, LIFUS3, LIVALI1, LIBETA, oraz LIDELTA2 związany bardziej z gromadzeniem białek zapasowych.
- Oznaczyła poziom ekspresji genów zidentyfikowanych w preparatach z łubinu Taper i wyraziła je w funkcji dni od kwitnienia do izolacji preparatów RNA (DAA).
- Wykazała w bardzo efektywnym porównaniu, specyficzną zależność poziomu ekspresji tych genów od DAA, a także bardzo zróżnicowane poziomy ich ekspresji, w wartościach względnych od 0,1 do 3000 w jednostkach względnych
- W jeszcze bardziej efektywnym eksperymencie wykazała, że aktywność transkrypcyjna zidentyfikowanych genów zmienia się w sposób indywidualny dla każdego z nich, krótko mówiąc poszczególne geny zachowują zarówno swoją indywidualność, jak specyficzną zdolność do reakcji na czas upływający od dna kwitnienia, zarówno w sensie liczby dni, jak i liczby godzin upływających od aplikacji hormonów GA₃ i ABA do zbioru nasion albo absolutnej pory pobierania materiału w dniu aplikacji hormonów. Przyznam się, że po napisaniu tego akapitu musiałem się czymś wzmocnić, bo – jeszcze rozumiem, że można to napisać, ale, żeby to wymyślić...
- Zbadała zmiany poziomu ekspresji genów w połączeniu z suszą glebowa, jakiej były poddane rośliny. Te wyniki nie są tak jaskrawo wyraźne jak poprzednie. Jednak częściej widać efekty suszy, kiedy działała ona w okresie zbliżonym do suszy naturalnej, działającej w okresie

rozwoju nasion, kiedy ta susza zwykle następuje w warunkach naturalnych. **Może więc działa tu jakiś nieznaną regulator, który powoduje, że zbyt młode nasiono nie będzie reagowało na suszę tak samo jak nasiono lepiej wypełnione, które już powinno zasychać.**

- Wykazała, że ogólna zawartość białek zapasowych zwiększała się w miarę postępującego wieku nasion, ABA obniżała zawartość białek a także ilość białek zapasowych zwiększała się najwięcej w drugiej połowie dnia
- Stężenie różnych frakcji białkowych zwiększało się z wiekiem nasion ale dynamika tego wzrostu była różna u różnych frakcji białkowych.
- Endogenne poziomy ABA, osiąga maksymalną wartość w 3-tygodniowych nasionach, a potem drastycznie spada, natomiast GA₃ początkowo wysoki, szybko zanika.

Podsumowując ten rozdział rozprawy stwierdzam, że Doktorantka przeprowadziła nowoczesne i wyjątkowo dobrze zaplanowane i przemyślane eksperymenty, które równie doskonale udokumentowała w postaci wyników niebudzących żadnej wątpliwości. Są one przykładem obiektywnej i uzasadnionej naukowo metodologii badań w tym zakresie. W moim głębokim przekonaniu rozprawa Pani mgr Natalii Klajn zawiera bardzo dużo wartościowych wyników, w zupełności wystarczających na bardzo dobrą rozprawę doktorską.

Dyskusja

Z pozytywnym zaskoczeniem zauważam, że Doktorantka rozpoczęła ten rozdział od przedyskutowania, czy raczej uzasadnienia, doboru obiektów do badań i uzasadnienia, dlaczego te wyniki są ważne. Tego ostatniego raczej nie musiała robić, ponieważ wyjątkowo w Jej przypadku wyniki molekularnych badań nad tym, jakie geny aktywują się w dojrzewających nasionach są tak samo ważne dla naukowców, jak i dla tych, co te rośliny uprawiają, bo aktywniejszy gen zwiększy masę (i wartość!) plonu i tak samo ważne dla takich, jak ja, którzy zjedzą ten plon, wszystko jedno, pośrednio czy bezpośrednio.

W kompletnej rozprawie doktorskiej, tak jak w kompletnej publikacji, musi być dyskusja, pozwalająca na odwołanie się do opinii innych. Tak też jest i w tej rozprawie, jednak w dyskusji panuje równowaga w ilości informacji, które Autorka musiała zaczerpnąć z wcześniejszych publikacji i w ilości nowych wyników, które sama swoimi badaniami dodała do wiedzy światowej. Uważam zatem, że po szybkim wydaniu kilku publikacji Doktorantki, wielu będzie poszukiwało potwierdzenia zgodności wyników uzyskanych przez nich z wynikami publikacji Doktorantki. Na zakończenie stwierdzam raz jeszcze, że przeprowadziła ona rzetelną dyskusję, choć zapewne nie miała z tym większych problemów.

Podsumowanie i wnioski

Autorka podsumowała wyniki swojej pracy, wyróżniając przy tym dziewięć, które najwidoczniej uznała za pionierskie, z czym się w pełni zgadzam. Nie były to zapewne wszystkie „pionierskie” wnioski, jakie znalazły się w pracy, ale uznaję taką właśnie decyzję Doktorantki.

Nie traktuję tego jak łyżki dziegciu w beczce miodu, raczej jak szczyptę soli, która może podkreślić ogólną słodycz. Myślę, że Pani Natalia Klajn pozostawia jeszcze coś do zbadania innym, a może sobie samej w przyszłości. Powraca mi na myśl problem pierwszego czynnika, który inicjowałby w jakiś sposób inicjuje kaskadę następnym etapów procesu wzrostu, rozwoju, czy

nawet dojrzewania zarodków. Wprawdzie podejrzewam, jaki to mógłby być czynnik. W warunkach *in planta* tym czynnikiem mógłby być sam zarodek w jego aktualnym stanie rozwoju, podczas gdy w laboratorium ten gen uaktywnia się „w próżni biologicznej”, więc dziw, że często aktywuje się tak, jakby był wbudowany w komórkę zarodka w określonym wieku. Zatem Szanowna Doktorantko, na szczęście jest jeszcze coś do zrobienia.

Spis literatury

Nie mam uwag, zwłaszcza krytycznych, co do doboru cytowanych publikacji, których autorka zebrała 207. Cytowane są w większości zupełnie nowe prace, co jest zrozumiałe, mając na uwadze dużą aktualność omawianych w pracy zagadnień.

Wniosek końcowy

Wyrażam zdecydowaną opinię, która towarzyszyła mi już od pierwszych stron rozprawy, że przedstawiona przez panią Natalię Klajn rozprawa doktorska, stanowi ważny element wysiłków eksperymentalnych biologów roślin i to o daleko „pozapolskim” zasięgu, w kierunku opracowania i weryfikacji mechanizmu procesu ważnego z poznawczego punktu widzenia, ale bodaj jeszcze ważniejszego, jako czynnika budowy plonu żółtego łubinu – być może głównego przedstawiciela strączkowych. Mgr Klajn w swojej rozprawie dokonała bardzo ważnych ustaleń i wytyczyła nowe drogi badawcze dla przyszłych badań. Rozprawa ta spełnia z nadwyżką kryteria wymagane dla dysertacji doktorskiej. **Daje mi to podstawy do zakończenia recenzji wnioskiem o wyróżnienie rozprawy.**



Prof. dr hab. Franciszek Dubert