

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych | Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice
tel. +48322009360 | kom. +48322009360
e-mail: malgorzata.gaj@us.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej pani mgr Mileny Kulasek**pt. „Udział genów kodujących szlaki transdukcji sygnału auksyn, regulowanych przez miRNA
w kontroli rozwoju kwiatu łubinu żółtego”****Przedmiot i cel rozprawy**

Przedmiotem badań opisanych w recenzowanej pracy doktorskiej pani Mileny Kulasek była ważna roślina użytkowa z rodziny bobowatych, łubin żółty, *Lupinus luteus* L. Niewątpliwe walory użytkowe, w tym bardzo wysoka zawartość białka w nasionach oraz możliwość uprawy w naszej strefie klimatycznej predestynują ten gatunek do zajęcia centralnej pozycji w hodowli roślin strączkowych w Europie. Niestety, łubin żółty mimo uzyskanych wiele lat temu odmian słodkich, i wysokiej pozycji na liście alternatywnych dla soi gatunków jest jak dotąd wykorzystywany jedynie jako biomasa. Podstawowym ograniczeniem w hodowli tej rośliny jako źródła białka jest niskie plonowanie spowodowane nasilonym procesem odcinania kwiatów górnych co skutkuje zawiązywaniem strąków tylko przez ok. 40% kwiatów. Mechanizmy zaangażowane w ten proces są bardzo złożone i mało zbadane. Zidentyfikowanie czynników regulujących rozwój kwiatów łubinu żółtego jest podstawą do zrozumienia mechanizmu odcinania kwiatów i warunkuje wyhodowanie odmian wyżej plonujących niż obecne. Wychodząc naprzeciw tej potrzebie, bardzo ważnej w obecnych czasach zagrożeń klimatycznych, Doktorantka, pod opieką naukową pana Profesora Jacka Kęsego i pani dr Pauliny Glazińskiej podjęła ambitne i istotne dla nauki wyzwanie rozpoznania na poziomie molekularnym procesów regulujących rozwój i odcinanie kwiatów *L. luteus*.

Ze względu na podstawowe znaczenie auksyny w rozwoju roślin, w tym kwiatów, zarodków i owoców, Doktoranta skupiła się na roli sygnalizacji auksynowej w kontroli odcinania kwiatów u łubinu żółtego. Cel pracy został jasno zdefiniowany i skupiony wokół udziału miRNA zaangażowanych w szlak transdukcji sygnału auksyn w decyzji o odcinaniu kwiatów u *L. luteus*. Skupienie badań na miRNA i regulatorach szlaku auksynowego dla rozpoznania mechanizmów regulujących odcinanie kwiatów uważam za jak najbardziej uzasadnione. miRNA regulując ekspresję tysięcy genów, w tym czynników transkrypcyjnych kontrolujących decyzje rozwojowe rośliny, odgrywają kluczową rolę także jako regulatory szlaków sygnalizacji fitohormonów, w tym auksyny. Dotychczasowa wiedza na ten roli miRNA w odcinaniu kwiatów jest niestety uboga, co wzmacnia zasadność tematu pracy. Poza celem głównym, w pracy wskazano szczegółowe pytania, na które miały odpowiedzieć badania. Za najwartościowsze dla nauki uważam pytania o różnice w kwiatkach dolnych i górnych (odcinanych) pod względem czasowo-przestrzennego wzoru IAA oraz ekspresji elementów szlaku sygnalizacji auksyny, w tym regulowanych przez miRNA.

Uniwersytet Śląski w Katowicach
Wydział Nauk Przyrodniczych
ul. Będzińska 60, 41-200 Sosnowiec
tel. 32 36 89 400, 32 20 09 351, e-mail: wnp@us.edu.pl



Podsumowując, podjęte w rozprawie badania uważam za aktualne i interesujące dla współczesnej nauki oraz mające w perspektywie duże znaczenie dla hodowli roślin strączkowych, a w szczególności *L. luteus*.

Struktura i język rozprawy

Pod względem formalnym rozprawa jest typową monografią o charakterze eksperymentalnym. Praca liczy 152 strony, i zawiera typowe rozdziały: streszczenie po polsku i angielsku, wykaz skrótów, wstęp (odpowiednik przeglądu literatury w innych rozprawach), cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i spis literatury. W większości poszczególne rozdziały spełniają oczekiwaną swoją funkcję, ale mam uwagi do Dyskusji i braku wniosków, do czego odniosę się w dalszej części recenzji. Wstęp przejrzysto wprowadza czytelnika w temat. Obok wyczerpującej i przekonującej charakterystyki łubinu żółtego, podsumowano stan wiedzy o przyczynach i czynnikach regulujących proces odcinania kwiatów oraz roli auksyny w tym procesie. W pracy opisano także zastosowane materiały i metody, z małymi brakami opisanymi w uwagach. Rozdział ten pozwala docenić szeroki wachlarz metod zastosowanych przez Doktorantkę, w tym metody immunolokalizacji IAA, analizy danych bioinformatycznych, analizy ekspresji genów metodą real-time RT-qPCR, oznaczenia ilości proliny w kwiatach i termograficzne analizy roślin. Wyniki ilustrowane są tabelami i rycinami, w tym wykresami, zdjęciami i schematami. Dyskusja jest bardzo obszerna i nie w pełni spełnia swoją rolę. Rozdział składa się z wielu podrozdziałów odnoszących się szczegółowo do wyników kolejnych analiz. Dyskusja uzyskanych wyników to bardzo istotna część prac naukowych, która najczęściej jest wyzwaniem dla Doktorantów, i nie tylko. Autorka chcąc, tak myślę, jak najrzetelniej wywiązać się z zadania zawarła w tym rozdziale zbyt wiele szczegółowych informacji zamiast kompaktowego, syntetycznego i jasnego usystematyzowania i przedstawienia najważniejszych wyników. Poszczególne podrozdziały powinny kończyć się wnioskami z naciskiem na nowatorskie aspekty pracy i wskazania dalszych badań niezbędnych dla potwierdzenia postawionych tez. Ponadto, rozdział ten zawiera zbyt wiele odniesień i powtórek z wiedzy natury ogólnej, dla których Wstęp byłby właściwym miejscem, np. opis receptorów TAAR (str. 107), czy działanie AUX/IAA jako represorów ARF (str. 108). W kolejnych podrozdziałach Dyskusji Autorka przytacza szczegółowo prawie wszystkie wyniki zamiast ich krytycznego przefiltrowania i syntezy w kierunku postawienia jasno sformułowanych tez naukowych. Chcę jednocześnie przyznać, że Doktorantka podejmowała próby syntezy wyników, czego dowodem jest np. Ryc. 50 (str. 118) podsumowująca wyniki analiz ekspresji w kwiatach łubinu trzech dojrzałych miRNA (łubinowych odpowiedników miR393, miR167 i miR160, o dobrze poznanej funkcji u *Arabidopsis*) oraz prawdopodobnie regulowanych przez te miRNA transkryptów kodujących centralne regulatory szlaku sygnalizacji auksyny (TAAR, AUX/IAA, ARF). Niestety komentarz do zebranych na tej rycinie wyników w tekście dyskusji nie przynosi ich syntetycznej interpretacji zakończonej konkluzjami. Podobne do Dyskusji wady ma rozdział Podsumowanie, w którym wyniki badań opisano syntetycznie w dziesięciu dość obszernych punktach nawiązujących do ogólnej wiedzy i przytaczających szczegółowe wyniki. Zgadza się całkowicie z piękną myślą Carla Sagana, którą Doktorantka cytuje na początku pracy, że „Nauka jest czymś więcej niż zbiorem wiedzy, jest ona sposobem myślenia”, odczuwam brak jasno sformułowanych i niekoniernie licznych wniosków. Przy formułowaniu wniosków należałoby odnieść się do szczegółowych pytań, które Doktorantka zadała określając cele badań (str. 35). Czy i w jakim zakresie badania udzieliły odpowiedzi na postawione pytania? **Mam nadzieję, że poprawne wnioski usłyszę od Doktorantki w trakcie obrony pracy.** Trud syntezy najważniejszych wyników warto podjąć bo nie mam wątpliwości, że zwartej i konkluzywnej dyskusji wyników oraz jasnych wniosków oczekują recenzenci w czasopiśmie naukowym. Sadzę, że niektóre wyniki Doktorantki są warte opublikowania.

Od strony językowej manuskrypt napisany jest dobrze. Należy pochwalić ładny język polski i dbałość Autorki o styl wypowiedzi, co nieczęsto się obecnie spotyka.

Badania finansowano z wewnętrznych i zewnętrznych źródeł, w tym grantu NCN Preludium uzyskanego przez Autorkę badań. Status kierownika własnego grantu bardzo dobrze świadczy o możliwościach naukowych Doktorantki w przeszłości.

Uzyskane wyniki i ich znaczenie naukowe

Biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych prac macierzystego Zespołu sugerujących rolę kwiatu w procesie odcinania tego organu u łubinu żółtego, Doktorantka rozpoczęła badania od obserwacji morfologicznych kwiatów dolnych zawiązujących strąki i górnych, zwykle odcinanych, na różnych etapach rozwoju kwiatostanu. Analizy nie wykazały istotnych makroskopowych różnic pomiędzy dolnymi i górnymi kwiatami aż do ostatniego etapu rozwoju. Podobnie, dolne i górne kwiaty wykazywały podobną retencję i kiełkowanie pyłku na znamionach słupek. W tekście nie znalazłam potwierdzenia, czy u badanego gatunku nie dochodzi do zapłodnienia w górnych tj. odcinanych kwiatach. Wprowadzając w temat Doktorantka na str. 16 deklaruje, że „...brak zapylenia i zapłodnienia” jest najczęstszą przyczyną odcinania kwiatów u roślin, ale nie podaje, jak jest u badanego łubinu? Skoro badano funkcjonalność pyłku to może nie dochodzi do zapłodnienia? W Dyskusji na str. 105 czytamy o „załążkach izolowanych z kwiatów górnych”, ale czy były zapłodnione nie wiadomo. **Proszę o wyjaśnienie tego zagadnienia.**

Zmierzając do wyjaśnienia procesu odcinania kwiatów na poziomie molekularnym Doktorantka słusznie skoncentrowała badania wokół danych pozyskanych z analiz RNAseq dla mRNA, sRNA i degradomu wykonanych w ramach projektu SONATA pod kierownictwem dr hab. Paulinę Glazińską, pełniącej rolę promotora pomocniczego rozprawy mgr Kulasek. Wyniki globalnych analiz RNA w kwiatach łubinu zostały opublikowane w *Int. J. Mol. Sc.* w 2019. Druga pozycja Doktorantki na liście 5. współautorów tej pracy pozwala sądzić o znacznym udziale Doktorantki w badaniach transkryptomicznych, a informacje w sekcji *Author contributions* potwierdzają jej udział a eksperymentach, wizualizacji danych i przygotowaniu manuskryptu.

W rozprawie postawiono pytanie o udział kontrolowanych przez miRNA genów związanych z sygnalizacją auksyny w procesie odcinania kwiatów. Badania dotyczące działania wybranych elementów szlaku sygnalizacji auksyny w tym procesie skupiono na dwóch grupach regulatorów (i) białkach o centralnej funkcji w kompleksie sygnalizacji auksyny oraz (ii) trzech dobrze opisanych u *Arabidopsis* miRNA, w tym miR393, miR160 i miR167 o znanej funkcji w regulacji odpowiednio TIR1, ARF18 i ARF6.

Początkowe analizy transkryptomu zaowocowały wskazaniem 20 genów w każdej z pięciu rodzin powiązanych z auksyną, w tym *YUCCA*, *GH3*, *PIN*, *PILS* i *AUX/LAX* o najsilniejszej ekspresji w dwóch grupach kwiatów, dolnych i górnych. Dziwi brak w tym zestawie genów z rodziny ARF. **Poprosiłaby o komentarz na obronie.**

Znaczne różnice pomiędzy kwiatami ze skrajnych okółków w ekspresji genów z wyróżnionych rodzin powiązane ze zróżnicowanymi wzorami dystrybucji IAA w kwiatach. Metodą immunohistochemiczną stwierdzono silny sygnał auksyny w ziarnach pyłku i nitkach pylników w obu grupach kwiatów. Dynamiczne zmiany w akumulacji IAA wykazano także w rozwijających się słupek kwiatów, wysoki poziom IAA w młodszych kwiatach i zanik sygnału w starszym stadium 3. Doktorantka podsumowując analizy IAA stwierdza, że wyniki te „nie do końca pokrywają się” z badaniami na innych roślinach, w tym tytoniu i *Arabidopsis*. Nie jest to naukowe stwierdzenie, ale rozumiem, że Autorka stawia tezę o zmienność w czasowo-przestrzennej dystrybucji IAA pomiędzy kwiatami różnych gatunków. Zmienność ta wymaga jednak potwierdzenia w szerszych badaniach, podobnie jak przyczyny i znaczenie biologiczne tej zmienności. Wobec skąpych, jak dotąd, analiz immunohistochemicznych IAA w rozwijających się kwiatach roślin, analizy wykonane w pracy są cenne. Za ciekawy wynik badań IAA w kwiatach łubinu uważam wykazanie silniejszej i specyficznej dla kwiatów górnych łubinu akumulacji tego fitohormonu w cytoplazmie komórek wokół woreczka zalążkowego w stadium 2B. Wynik ten był podstawą postawienia tezy, że pojawiająca się w cytoplazmie tkanki okalającej woreczek zalążkowy auksyna może zaburzać transdukcję sygnału i kierować kwiat do odcinania.

Centralną część badań stanowiła zintegrowana analiza danych transkryptomu, sRNA i degradomu zmierzająca do identyfikacji miRNA regulujących elementy szlaku sygnalizacji auksyny w kwiatach łubinu. W oparciu o te analizy Doktorantka wytypowała moduły regulacyjne zawierające miRNA i kontrolowane przez te miRNA elementy sygnalizacji auksyny z rodzin TAAR, AUX/IAA i ARF.

Poza danymi o ekspresji genów opartymi o analizy NGS, dla czterech genów, łubinowych homologów *AFB3*, *IAA14*, *ARF4* i *ARF6*, Doktorantka zbadała poziom ich transkrypcji w czasie rozwoju kwiatów metodą real time qPCR. Komentując te wyniki w Dyskusji Autorka stwierdza: " W kilku przypadkach (np. *LIARF3*) zaobserwowano różnice między wynikami uzyskanymi za pomocą qPCR i sekwencjonowania transkryptomu". Co oznacza „w kilku przypadkach” skoro tylko 4 geny analizowano? Czego dotyczyły stwierdzone różnice? Mało czytelna grafika dla wyników z analizy transkryptomu utrudnia wnioskowanie. Doktorantka podaje możliwe przyczyny różnic w wynikach analiz NGS vs RT-qPCR, w tym inne warunki wzrostu roślin i normalizacji poziomu transkryptów w obu doświadczeniach. Nasuwa się więc pytanie, czego oczekiwała Doktorantka porównując wyniki tych doświadczeń? Jakie wnioski dla przyszłych analiz?

Za ciekawe dla nauki wyniki pracy uważam dostarczenie obszernych i cennych wskazówek o kandydatach wśród cząsteczek miRNA i regulatorach sygnalizacji auksynowej do roli regulatorów kwiatu u łubinu żółtego, a w szczególności:

- Wskazanie na potencjalne funkcjonowanie w kwiatach *Lupinus aureus* transkryptów trzech białek receptorowych auksyny z rodziny TAAR, w tym LITR1, LIAFB2 i LIAFB3;
- Zidentyfikowanie w kwiatach łubinu żółtego transkryptów dla 12 genów LIAUX/IAA, 16 genów ARF i 3 transkryptów kodujących ko-represory TOPLESS. Transkrypty te potencjalnie produkują 30 funkcjonalnych białek AUX/IAA; białka ARF, o funkcji aktywatorów oraz represorów oraz korepresory LITPLa-c, co jednak wymaga potwierdzenia;
- Wskazanie podobieństwa filogenetycznego sekwencji białkowych LIARF u łubinu żółtego do innych roślin, w tym *A. thaliana*, *Glycine max* i *L. angustifolius*.
- Na podstawie analizy degradomu, postawienie tezy, że w kwiatach łubinu miRNA nie reguluje LIAA przez cięcie transkryptów. Wyciszenie genów *AUX/IAA* przez miR390 poprzez hamowanie translacji czy inne procesy związane z remodelowaniem chromatyn, co sugeruje Doktorantka wymaga weryfikacji;
- Dostarczenie transkryptomicznych wskazań dla prawdopodobnego udziału modułu miR167-białka ARF6/ARF8, o udokumentowanej roli w rozwoju kwiatów u *Arabidopsis*, w regulacji rozwoju kwiatów łubinu
- Opisanie zmian we wzorze ekspresji w kwiatach łubinu żółtego wybranych 5. genów markerowych dla stresu suszy

Praca jest wstępnym i niezbędnym krokiem na drodze do zidentyfikowania regulowanej auksyną sieci czynników molekularnych kontrolujących rozwój kwiatu, w tym ich odcinanie, u potencjalnie ważnego dla gospodarki i żywienia gatunku, łubinu żółtego. Dostarczone w globalnych analizach bioinformatycznych wyniki stanowią bardzo dobry punkt wyjścia do dalszych badań weryfikujących tezy postawione w oparciu o wnioski płynące z analiz bioinformatycznych.

Doktorantka bardzo dobrze opanowała analizy bioinformatyczne na poziomie transkryptomu i białek, a które szeroko przedstawiła w rozdziale Wyniki. W Dyskusji Autorka prezentuje między innymi pokrewieństwo filogenetyczne białek, różne izoformy białek, ich strukturę przestrzenną, możliwości wiązania się różnych domen białek w kompleksach regulacyjnych, potencjalne wiązanie domen białek z sekwencjami regulacyjnymi w DNA i inne. Przedstawione analizy dowodzą, że obróbka danych z NGS i zaawansowane analizy bioinformatyczne transkryptomu i białek są bliskie mgr Kulasek. Umiejętności te stwarzają dla Doktorantki szerokie perspektywy współpracy naukowej.

Należy jednak pamiętać, że analizy typu „dry lab”, w tym analizy *in silico* z zakresu genomiki, są bardzo cennym lecz wstępnym etapem badań biologicznych. Wytyczają one kierunki dalszych żmudnych badań laboratoryjnych walidujących w eksperymentach z materiałem biologicznym, hipotezy oparte na wynikach uzyskanych *in silico*.

W Podsumowaniu pracy Doktorantka stwierdza, że wyniki badań mogą mieć zastosowanie praktyczne w hodowli nowych linii łubinu żółtego (podobnie stwierdzono w Conclusions w pracy Glazińska i in., z 2019 roku, w której p. mgr Kulasek jest współautorem :” work may contribute to the optimization of field crops”). **Prosiłabym o rozwinięcie tego stwierdzenia na obronie i wskazanie możliwości zastosowania uzyskanych wyników.**

Inne uwagi, komentarze

- Prowadzone w pracy badania dotyczyły transkryptomu i degradomu, a więc ekspresji genów. Ekspresja genu nie jest jednak, dowodem na powstawanie funkcjonalnego białkowego produktu genu. Ten podstawowy fakt powinien skłaniać do ostrożnego formułowania stwierdzeń i precyzyjnego dobierania terminologii. W pracy nie potwierdzano obecności białek w eksperymentach laboratoryjnych. Jedynie analizy bioinformatyczne oparte na eksperymentalnie uzyskanych danych o ekspresji genów wskazywały *in silico* możliwość powstawania określonych produktów genów -białek i ich izoform. Nie ma więc podstaw dla wnioskowania na poziomie funkcjonalnych białek. Niestety Doktorantka wielokrotnie nadinterpretowuje wyniki, zamiennie stosuje terminy ekspresja genu i obecność białka, często też stwierdzenia są niejednoznaczne, np. str. 105: „ W rozwijających się kwiatach łubinu żółtego zidentyfikowano wszystkie elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn”. Należałoby sprecyzować na jakim poziomie analizy- genu czy białka - oparto to stwierdzenie? Chyba jednak Autorka ma na myśli białka skoro w kolejnym zdaniu czytamy: „W obrębie rodzin białkowych, do których należą, białka te różnią się właściwościami ...”. Str. 207; „W kwiatach łubinu żółtego zidentyfikowano cztery w pełni funkcjonalne białka należące do rodziny TAAR,...”. Praca nie dostarcza dowodów na funkcjonowanie tych białek w kwiatach. Podobnie, podpis pod Ryc. 49 błędnie informuje, że schemat pokazuje białka zidentyfikowane w kwiatach łubinu. Właściwy i adekwatny do wyników podpis to: „ Podsumowanie analiz *in silico* wskazujące białka z rodzin TAAR, AUX/IAA i ARF o potencjalnej funkcji w kwiatach łubinu”. Jako kryterium funkcji u łubinu Doktorantka przyjęła obecność domen niezbędnych w badanym procesie. To podejście wprowadzające w błąd., np. dyskusja wyników dla białek TPL (str. 111).
- Podobnie tytuł rozdziału w Dyskusji „ Rola modułów regulacyjnych...” (str. 117), jak i podpis ryciny Ryc. 50 (str. 118) w tym rozdziale to nadinterpretacja. Dla potwierdzenia sugerowanych w pracy relacji regulatorowych konieczne są dalsze badania z zakresu genomiki funkcjonalnej, w tym na poziomie białek. Stąd też, adekwatnie do wyników, na Ryc. 50 podsumowano nie rolę modułów, ale zmiany w poziomie ekspresji w rozwoju kwiatów wybranych cząsteczek miRNA i genów potencjalnie przez nie regulowanych. Wyniki te sugerują , ale nie dowodzą roli wskazywanych modułów regulatorowych w rozwoju kwiatów.
- Jednym z celów pracy było wskazanie par regulacyjnych miRNA – mRNA dla gen ze szlaku transdukcji sygnału. Stąd też wśród metod analizy na str. 47 podano obliczanie współczynnika korelacji Pearsona. Niestety w wynikach Doktorantka nie podaje wartości obliczonych współczynników dla poparcia swoich wniosków o związkach regulacyjnych, np. czytamy o braku negatywnej korelacji dla pary LlmiR224-miR393 i genu TIR1 w kwiatach łubinu (str. 40) oraz o wystąpieniu negatywnej korelacji dla par łubinowego miR160 –ARF18d oraz miR167 –ARF8a – str. 96.

Powyższe uwagi choć krytyczne nie umniejszają nowatorstwa i przydatności dla nauki opisanych w rozprawie wyników. Tymi obszernymi komentarzami chciałabym skłonić Doktorantkę, stojącą na początku swej drogi naukowej, do ostrożnego wnioskowania i stosowania adekwatnej do zakresu badań terminologii. Jak sama Autorka wielokrotnie w tekście podkreśla, w tym w końcowym akapicie Dyskusji oraz w Podsumowaniu, sieci regulacyjne pomiędzy miRNA i genami docelowymi mają „niezwykle skomplikowany charakter”. Stąd też zależności widoczne na poziomie transkryptomu są jedynie bazą dla hipotez i planowania dalszych analiz zachodzących interakcji, z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi, w tym mutantów/linii transgenicznych. Doktorantka wydaje się świadoma konieczności dalszych analiz, na co sama wskazuje w punkcie czwartym Podsumowania. **W związku z tym, mam prośbę o nakreślenie w trakcie obrony ogólnego planu eksperymentów weryfikujących tezę o regulowaniu przez wskazane w pracy miRNA elementy szlaku sygnału auksyny w kwiatach łubinu.** Jakie materiały, metody i narzędzia badawcze pozwolą zweryfikować np. tezę, że łubinowy miR167 kontroluje LIARF8A na ostatnim etapie rozwoju kwiatu łubinu (str. 96). Autorka sugeruje taką parę regulacyjną na podstawie wyników real time qPCR (Ryc. 42) stwierdzając „negatywna korelację” między poziomem akumulacji tych cząsteczek w ostatnim etapie rozwoju kwiatów. Nawiasem mówiąc, trudno zależności regulacyjne odczytać z wyników pokazanych na Ryc. 40-42, co komentowałam już wyżej pytając o wartości współczynników korelacji.

Mniej ważne niedostatki manuskryptu:

Z racji mojej funkcji recenzentki pozwolę sobie zwrócić także uwagę na mniej zasadnicze elementy pracy i wypunktować drobne niedostatki manuskryptu. Uwagi te mogą być przydatne przy redagowaniu manuskryptu pracy do celów publikacyjnych.

- Tekst rozprawy znacznie zyskałby na przejrzystości merytorycznej i edycyjnej gdyby Autorka zastosowała numerację kolejnych rozdziałów, a w szczególności uszeregowała w hierarchii nadrzędności i podrzędności liczne wprowadzone podrozdziały we Wstępie, Materiałach i Metodach, Wynikach, Dyskusji i Podsumowaniu.

- podpisy pod większością rycin są bardzo lakoniczne, nie dostarczają pełnej informacji niezbędnych do prawidłowego odczytania schematów, wykresów, czy zdjęć; np. Ryc. 11, podpis pod zdjęciami kwiatów kieruje do Tabeli 5 ale tam też nie znajdziemy wyjaśnienia co pokazano w górnym, a co w dolnym szeregu kwiatów dolnych/górnych.

-Niespójna terminologia utrudnia zrozumienie, np. raz przyjęty i wyjaśniony termin „kwiaty dolne i górne” powinien być konsekwentnie stosowany; podpis pod Ryc. 14 opisuje natomiast „szczytowe” i „najniższe” okółki kwiatostanu widoczne na zdjęciu. Czy to inna grupa kwiatów od górnych i dolnych? W tekstach naukowych nie należy stosować zamiennie różnych terminów bo nie są oczywiste i wprowadzają w błąd. Należy bardzo ostrożnie urozmaicać słownictwo w tekście naukowym, bo taki zabieg najczęściej utrudnia zrozumienie i rodzi niepotrzebne wątpliwości.

- niekompletne informacje na temat metod; np. w Rozdziale M&M nie znalazłam informacji o warunkach uprawy roślin w stresie suszy chociaż w Wynikach (str. 97) badano materiał „... z roślin, które doświadczają stresu suszy”. Jedynie w Dyskusji (str. 120) podano, że materiał zbierano 2 tyg. po zakończeniu podlewania. To stanowczo nie wystarczający opis. Określenie warunków doświadczenia ma podstawowe znaczenie w badaniach nad reakcją roślin na stres suszy/niedobór wody. Minimalne wymogi to podanie zawartości wody w glebie przed i po zaprzestaniu podlewania. Ponadto nie jestem pewna, czy badano stres suszy czy stres niedoboru wody bo specjaliści z tego zakresu (a ja nim nie jestem) rozróżniają te terminy.

- wnioskując o różnicach ilościowych między porównywani próbami/kombinacjami należy pokazać statystyczną istotność tych różnic, uwaga dotyczy np. stwierdzenia o mniejszej częstości kiełkujących ziaren pyłku w kwiatach dolnych (str. 60; Ryc. 15 B).

- w rozprawie, wzorem niektórych czasopism naukowych, przyjęto numeryczne cytowanie prac w tekście. Taka forma zmniejsza liczbę znaków w tekście ale jest w mojej opinii mało komunikatywna; podawanie nazwiska i roku autora zamiast anonimowych liczb pozwala łatwiej śledzić, kontrolować i zapamiętywać cytowania; oczywiście to jedynie subiektywna opinia a nie krytyka.

- Termin *anteza* (*anthesis*) w botanice jest niejednoznaczny, może on oznaczać „otwieranie się kwiatu, okres kwitnienia albo pylenie” [wg. *Fragm. Flor. Geobot. Polonica* 12(1), 2005]; w jakim znaczeniu używa go Autorka opisując etapy rozwoju kwiatów łubinu żółtego np. w Tab. 5, str. 103, 105 i więcej. Jakie stadium w rozwoju kwiatu definiuje jako „anteza I” i „anteza II” (Tab. 5)?

- Na str. 111 : Doktoranta błędnie wskazuje ARF2 U *Arabidopsis* jako pozbawiony domeny PB1, mimo że także w cytowanej w tym zdaniu pracy Choi i in., (2018) schemat białka ARF2 pokazuje domenę PB1

- pomimo ogólnie „dobrego pióra”, Doktorantka nie ustrzegła się niefortunnnych wyrazów, w tym źle brzmiących kopii terminów angielskojęzycznych np. str. 109: „...domena PB1 jest prerekwizytem funkcjonalności Aux/IAA” . Znacznie łatwiej jest zrozumieć zdanie, że „... domena PB1 jest niezbędna dla funkcji AUX/IAA”.

- Zrozumienie tekstu utrudnia zamienne nazewnictwo, np. str. 96: łubinowy LIARF6a zamiennie, w tym samym akapicie, nazywany jest nazwą genu albo długim symbolem identyfikującym transkrypt tego genu w bazie danych RNAseq

- str. 113: „...zwerifikowano, jakim rekordom w transkryptomie odpowiadają badane do tego czasu mRNA i porównano wyniki dotyczące ekspresji” – to jeden z przykładów zdania niejasnego, z żargonami („rekordom”) Do jakiego czasu? Co z czym porównywano? Ekspresji czego?

- Ryciny 40, 41 i 42 pokazują wyniki ekspresji wybranych genów badane metodą real time qPCR; ta informacja powinna być zamieszczona w legendzie rycin, powinien być w niej także podany gen referencyjny do którego porównywano badane geny. Ponadto prezentacja na odrębnych wykresach wyników poziomu ekspresji genów i akumulacji ich prawdopodobnego regulującego miRNA, nie służy celowi analizy tj. identyfikacji par miRNA-gen regulowany; podobne uwagi do wykresów 45, 46 i 47.

- Ryc. 50 (str.118): Oznaczenia na schemacie i legenda nie są jasne, np. które koła to te „jaśniej zaciemnione”? na rycinie koła są białe albo kolorowe;

- Niedostatki w edycji tekstu, np. str. niedokończony podpis pod Ryc. 4; niepełne dane o cytowanych pracach w spisie literatury, nr. praca nr 136, Gluzińska i in. 2015; trudne w zrozumieniu, niekompletne informacje np. na str. 88 w rozdziale nt identyfikacji miRNA regulujących ekspresję badanych genów czytamy, że po analizach *in silico*:” Oprócz znacznie większej liczby zidentyfikowanych par regulatorowych...”- „większej liczby” od czego? Ilu par regulatorowych i na jakiej podstawie spodziewano się?

Podsumowując poziom merytoryczny rozprawy uważam, że prezentowane przez Doktorantkę praca stanowi wartościowy wkład we współczesną naukę. Autorka podjęła się wielokierunkowych analiz z zakresu genomiki i bioinformatyki u ważnej w hodowli ale mało poznanej w genomice rośliny, łubinu żółtego. Należy podkreślić szeroki i zaawansowany technicznie warsztat metodyczny zastosowany przez Doktorantkę, który obok rozległych analiz bioinformatycznych objął także eksperymenty laboratoryjne wykorzystujące metody z zakresu biologii molekularnej.

Wniosek końcowy

Nie mam wątpliwości, że w swojej rozprawie Pani mgr Milena Kulasek podjęła istotny problem badawczy oraz przedstawiła w sposób satysfakcjonujący jego rozwiązanie. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca Pani mgr Mileny Kulasek pt. **„Udział genów kodujących szlaki transdukcji sygnału auksyn, regulowanych przez miRNA w kontroli rozwoju kwiatu tubinu żółtego”** spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym art. 14 ust. 2 pkt.2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, który stanowi, że „w okresie od dnia wejścia w życie ustawy, o której mowa w art. 1, do dnia 30 kwietnia 2019 r. przewody doktorskie (...) wszczyna się na podstawie przepisów dotychczasowych”.

W związku z tym wnoszę do Rady w Dyscyplinie Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Mileny Kulasek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

