



Warszawa, 28.07.2019 r.

dr hab. Tomasz Sarnowski, prof. IBB
Instytut Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk
Zakład Biosyntezy Białka
Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Mariusza Banacha

pod tytułem

**„Wpływ temperatury i egzogennie podawanych hormonów na ekspresję genów szlaku
autonomicznego u *Lupinus luteus*”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Mariusza Banacha wykonana została pod kierunkiem dr hab. Jacka Kęsego oraz promotora pomocniczego dr Waldemara Wojciechowskiego w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczy identyfikacji poszczególnych elementów ścieżki autonomicznej regulacji czasu kwitnienia u łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) a także wpływu niektórych czynników takich jak egzogennie podane hormony czy zmiany warunków temperaturowych na ekspresję genów tej ścieżki. Podjęta problematyka badawcza jest interesująca ze względu na to, że rozszerza wiedzę na temat funkcjonowania szlaku autonomicznego regulacji czasu kwitnienia u roślin z rodziny bobowatych. Dodatkowo, biorąc pod uwagę potencjalne znaczenie łubinu żółtego jako rośliny użytkowej, identyfikacja

elementów szlaku autonomicznego kontroli czasu kwitnienia i poznanie zależności pomiędzy regulacją ich ekspresji a warunkami środowiskowymi i/lub wpływem podanych egzogennie hormonów może być istotne dla rolnictwa. Przedstawione w rozprawie wyniki mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad kontrolą czasu kwitnienia u łubinu a także prac mających na celu poprawę cech użytkowych roślin uprawnych.

Rozprawa doktorska mgr. M. Banacha ma układ typowy dla eksperymentalnych prac i składa się z następujących podstawowych rozdziałów: Spis treści, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Literatura. Praca liczy 152 strony, zawiera 53 ryciny, 18 tabel oraz 115 pozycji literaturowych i spełnia wymogi formalne dla rozpraw doktorskich.

Wstęp ocenianej pracy zawiera niezwykle dużo informacji podpartych różnymi schematami. Niektóre z tych informacji, jakkolwiek bardzo interesujących, nie mają bezpośredniego związku z zagadnieniami stanowiącymi meritum pracy. Jednym z przykładów może być opis sekwencjonowania genomu chloroplastowego łubinu żółtego, który zawarty został na str. 60. Natomiast, pomimo umieszczenia wielu schematów we wstępie zabrakło najważniejszego z nich, przedstawiającego zależność pomiędzy elementami ścieżki autonomicznej regulacji czasu kwitnienia. **Dlatego bardzo proszę doktoranta o zaprezentowanie takiego schematu oraz szczegółowe omówienie podczas obrony rozprawy doktorskiej.** Praca znacząco zyskałaby gdyby Wstęp był krótszy i bardziej zogniskowany na regulacji czasu kwitnienia poprzez ścieżkę autonomiczną.

Również Cel pracy jest niezwykle rozbudowany, opis zajmuje ok. 1 strony i jest do pewnego stopnia powtórzeniem informacji zawartych we wstępie. Zdecydowanie korzystniejsze dla rozprawy byłoby wydzielenie głównych celów szczegółowych w postaci punktów.

W części Materiały i metody mgr Banach opisał szczegółowo metody, które posłużyły do zrealizowania głównych założeń pracy. Zastanawiające jest dlaczego doktorant używał dwóch różnych metod izolacji RNA i odwrotnej transkrypcji w zależności od tego czy preparaty RNA miały być wykorzystane do analizy RT-qPCR czy też 5' lub 3' RACE. Dodatkowo, zastanawiające jest wykorzystanie przez doktoranta elektroforezy w żelu agarozowym do oceny zanieczyszczeń preparatów RNA genomowym DNA. **Bardzo proszę o komentarz doktoranta na ten temat.**

Sekcja Wyniki zawiera szczegółowy opis zidentyfikowanych sekwencji oraz przedstawia analizę filogenetyczną. Dla pięciu zidentyfikowanych genów doktorant przedstawia również analizę wzoru ekspresji po podaniu egzogennych giberelin i kwasu

abscysynowego. Nie jest jasne dlaczego taka analiza nie została przeprowadzona dla *LILD-like* jak również *LILD*. **Bardzo proszę doktoranta o wyjaśnienie.** W rozdziale tym zabrakło również wyraźnego zaznaczenia oceny wpływu temperatury na ekspresję badanych genów. Co prawda doktorant wyjaśnia w dyskusji, że ocena wpływu temperatury nie dała jednoznacznych wyników ale, biorąc pod uwagę, że w tytule pracy zaznaczona jest ocena wpływu tego czynnika na ekspresję badanych genów powinno to zostać zaznaczone również w części Wyniki, tym bardziej, że w ostatnim akapicie dyskusji doktorant stwierdza, że „W niniejszej pracy wykazano wrażliwość badanych genów szlaku autonomicznego na zmiany temperatury otoczenia...” (str. 140). **Bardzo proszę o szczegółowe wyjaśnienie tej kwestii podczas obrony rozprawy.** Dodatkowo w części Wyniki doktorant wielokrotnie używa zamiennie słów „peptyd” i „białko”. **Proszę doktoranta o stosowne wyjaśnienie.**

W części Dyskusja doktorant również nie ustrzegł się niefortunnych sformułowań, takich jak np. „domniemane sekwencje”, „prognozowane sekwencje”, „przewidywane sekwencje” (str. 126) w kontekście sekwencji, które w rzeczywistości zostały zidentyfikowane podczas wykonywania ocenianej rozprawy doktorskiej. Biorąc pod uwagę, to że sekwencje te nie były jak dotąd poznane a ich poznanie jest wymiernym efektem tej rozprawy doktorskiej, doktorant powinien zdecydowanie bardziej podkreślić to w dyskusji.

W tej części rozprawy doktorant odnosi się również do niepublikowanych i nieopisanych w rozprawie danych transkryptomicznych typu RNAseq, które zostały przeprowadzone w Katedrze, jak sądzę przez kogoś innego. Biorąc pod uwagę, że dane te nie zostały opisane w części Wyniki a także w rozprawie nie jest umieszczony opis metody pozwalający na weryfikację poprawności analiz odnoszenie się do takich danych jest niewłaściwe i nie powinno to zostać umieszczone w rozprawie. Dodatkowo, odnosi się wrażenie że wykonane eksperymenty zostały sztucznie rozdzielone na więcej niż jedną pracę. **Proszę doktoranta o stosowny komentarz.** Zastanawiające jest również stwierdzenie doktoranta, że „Uzyskane wyniki podważają pogląd o niezależności szlaku autonomicznego od wpływu warunków środowiskowych” (Streszczenie, str. 8). Wiadomo, że geny szlaku autonomicznego odpowiadają na warunki środowiskowe i jest to również podkreślane przez doktoranta np. we Wstępie (str. 37-38) i Dyskusji. **W związku z tym, bardzo proszę o wyjaśnienie, co doktorant rozumie poprzez przytoczone powyżej stwierdzenie.**

Doktorant w swojej rozprawie nie ustrzegł się wielu błędów edytorskich. Na wykresach w części Wyniki nie umieszczono podpisów przy osiach Y. Praca zawiera bardzo dużo literówek oraz zdań nie zakończonych kropką. Jednym z przykładów wskazujących na pobieżność ostatecznej korekty pracy jest następujące zdanie „Do przeprowadzenia

łańcuchowej reakcji polimerazy używano trzech zestawów firmy Kappa Biosystem czy jakoś tak to do sprawdzenia: KAPA3G Plant PCR Kits, KAPA Taq HotStart PCR Kit i KAPA Taq Read Mix PCR Kit.”

Wniosek końcowy

Pomimo moich uwag uważam, że mgr Banach osiągnął założone przez siebie cele a prowadzone przez niego badania doprowadziły do identyfikacji genów zaangażowanych w autonomiczny szlak kontroli czasu kwitnienia u łubinu żółtego oraz określenia wpływu fitohormonów na ten szlak, co stanowi znaczący wkład w badania prowadzone nad biologią tej rośliny. Stwierdzam również, że rozprawa przedstawiona mi do oceny spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wnioskuje do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr. Banacha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Instytut Biochemii i Biofizyki
Polskiej Akademii Nauk
ul. A. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa
tel. 22 592-21-45