

Gdańsk, dnia 21 marca 2019

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska
Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin
Katedra Biotechnologii
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Działo
zatytułowanej „Opracowanie strategii genetycznej i epigenetycznej modulacji aktywności
genu syntazy chalconu w lnie”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Działo, została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Żuk w Zakładzie Biochemii Genetycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu.

Przedmiotem badań było opracowanie strategii prowadzącej do zmiany ekspresji genu kodującego syntazę chalconu (CHS) w roślinach lnu bez ich transformacji genetycznej. Doktorantka i Pani Promotor założyły, iż dzięki zastosowaniu innowacyjnych metod takich jak: traktowanie komórek roślinnych krótkimi oligodeoksynukleotydami (OLIGO/ODN) lub hormonami roślinnymi uzyskają modulację ekspresji syntazy chalconu i w efekcie rośliny o zmienionym fenotypie wynikającym z indukcji modyfikacji epigenetycznych a nie genetycznych. Kolejnym ważnym celem badań opisanych w rozprawie było wykazanie, iż wyindukowane za pomocą OLIGO/ODN zmiany epigenetyczne są dziedziczone w kolejnych pokoleniach a zatem mogą być wykorzystane jako alternatywna do transformacji genetycznej metoda uzyskiwania roślin o zmienionej/podwyższonej wartości użytkowej.

Rośliny, tak rosnące w naturalnym środowisku a także te uprawiane przez człowieka są ekspozowane na stres tak abiotyczny jak i biotyczny. Technologie zmierzające do zwiększenie

odporności roślin na te czynniki polegają na modyfikacji genomu roślin poprzez wykorzystanie techniki bezwektorowej bądź wektorowej transformacji roślin. W tym ostatnim przypadku najczęściej wykorzystywanym wektorem są zmodyfikowane genetycznie bakteryjne patogeny roślin z gatunku *Agrobacterium tumefaciens*. Biotechnolodzy roślin mają w tym zakresie osiągnięcia polegające na wprowadzeniu do uprawy roślin transgenicznych (GMO) o zwiększonej odporności na herbicydy, wirusy i szkodniki. Problemem jest jednak brak akceptacji roślin modyfikowanych genetycznie przez społeczeństwo. Można snuć liczne teorie z czego wynika strach społeczeństwa przed GMO jest on jednak faktem i tak na przykład w Europie uprawa roślin GMO jest dozwolona zaledwie w pięciu krajach: Hiszpanii, Portugalii, Czechach, Rumunii i Słowacji. W Polsce obowiązuje zakaz uprawy GMO ale od roku 2006 już czterokrotnie przedłużano moratorium na sprowadzanie do kraju paszy uzyskanej z modyfikowanej genetycznie soi; ostateczne moratorium obowiązujące do końca roku 2020 ogłoszono w roku 2017.

Biorąc pod uwagę brak akceptacji dla uprawy roślin GMO oraz potrzebę wyhodowania i uprawy roślin o zwiększonej odporności na stres abiotyczny i biotyczny doktorantka podjęła się opracowania metod, które pozwolą na ulepszenie właściwości użytkowych lnu poprzez indukcję zmian epigenetycznych, czyli takich, które nie wynikają ze zmiany sekwencji DNA a są związane wyłącznie ze zmianami ekspresji endogennych genów.

Celem recenzowanej pracy było zatem opracowanie technologii pozwalających na ulepszenie fenotypu roślin uprawnych bez ingerencji w ich genotyp.

Rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Działo ma typową strukturę i składa się ze wstępu będącego przeglądem literatury, opisu wykorzystywanych materiałów i zastosowanych metod, analizy uzyskanych wyników, dyskusji i spisu literatury. Rozprawa zawiera także dobrze sprecyzowany cel pracy, spis zastosowanych skrótów, spis tabel i rycin, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz krótki akapit zawierający podsumowanie wyników badań.

Przegląd literatury jest napisany bardzo ciekawie, jasnym, zwięzłym i naukowym językiem i obejmuje wszystkie najważniejsze dla przedstawionych w rozprawie badań zagadnienia. Zawarto w nim charakterystykę lnu jako rośliny użytkowej, opisano indukowane przez modyfikacje epigenetyczne źródła zmienności roślin, metody genetycznej modyfikacji roślin oraz metody modyfikacji roślin poprzez indukcję zmienności epigenetycznej. W dwóch kolejnych rozdziałach scharakteryzowano reakcje katalizowane przez syntazę chalkonu i jej izoformy oraz mechanizmy regulacji ekspresji genów kodujących CHS. Opisano także związki

flawonoidowe, których biosynteza jest wynikiem aktywności syntazy chalkonu. Przegląd literatury bardzo dobrze wprowadza czytelnika w tematykę rozprawy.

Materiały i metody wykorzystywane w badaniach prowadzonych przez doktorantkę zostały starannie opisane. Sposób opracowania tych rozdziałów wskazuje na bardzo dobrą znajomość opisanych metod i umiejętność sprawnego posługiwania się szeregiem nowoczesnych technologii wykorzystywanych w biotechnologii roślin.

Rozdział **Wyniki** jest starannie przygotowany i zaopatrzony w dobrą dokumentację graficzną. Opisano w nim wpływ 11 różnych OLIGO, homologicznych do różnych fragmentów genu CHS, na nadekspresję lub represję tego genu (mierzoną sumą ilości transkryptu dla genów *LuCHS6* i *LuSHS7* kodujących dwie izoformy CHS). Warto podkreślić, iż zaprojektowane OLIGO były homologiczne do różnych regionów genu kodującego CHS (5'UTR, eksonu 1 i 2, intronu oraz 3'UTR). Ponieważ założono, iż zastosowane OLIGO będą wpływać na metylację w kolejnym etapie zmierzono poziom 5-metylocytozyny w genomowym DNA roślin traktowanych OLIGO. Okazało się, iż zastosowane OLIGO w różny sposób wpływały na całkowity poziom metylacji; różne też były profile metylacji cytozynw specyficznych regionach genu CHS.

Przeprowadzono także badania ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w procesy związane z modyfikacjami epigenetycznymi, takie jak: metylacja DNA (chromometylaza 1 i 2, remodulacja chromatyny czy demetylacja DNA(glikozylazy DEMETER) oraz metylację i acetylację histonów. Takie same badania jak dla niezmodyfikowanych OLIGO przeprowadzono dla metylowanych oraz tiofosforowanych form OLIGO. Porównano poziom ekspresji genu CHS, oraz profile metylacji cytozym w zmiennych motywach CCGG w sekwencji genu CHS po traktowaniu roślin niezmodyfikowanymi i zmodyfikowanymi OLIGO. Zbadano także wpływ zmiany aktywności genu CHS na ekspresję genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę związków fenylopropanoidowych, skład związków fenolowych nie związanych i związanych ze ścianą komórkową, w słomie roślin lnu traktowanych OLIGO.

Zmiany epigenetyczne indukowane w wyniku stosowania OLIGO porównano ze zmianami indukowanymi poprzez zastosowanie fitohormonów takich jak kwas salicylowy, kwas abscysynowy i kwas jasmonowy. Wpływ zmian epigenetycznych wywołanych wymienionymi powyżej czynnikami (różnymi rodzajami OLIGO i różnymi fitohormonami) na poziom metylacji DNA i ekspresję genu syntazy chalkonu i kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę związków fenylopropanoidowych w tkankach traktowanych induktorami roślin lnu porównano

ze zmianami indukowanymi w wyniku transformacji genetycznej z zastosowaniem *Agrobacterium tumefaciens*.

Ważnym elementem rozprawy było przeprowadzenie badań mających na celu sprawdzenie, czy wyindukowane za pomocą niezmodyfikowanych bądź modyfikowanych OLIGO i/lub hormonów roślinnych zmiany epigenetyczne oraz zmiany wywołane transformacją genetyczną są przenoszone na pokolenie F1 i F2 roślin lnu. Niestety z przeprowadzonych badań wynika, iż dziedziczenie zmian epigenetycznych nie zawsze jest przewidywalne, chociaż stosunkowo dobre efekty uzyskano stosując zmodyfikowane OLIGO. Te ostatnie badania są niezwykle istotne gdyż dziedziczenie zmian epigenetycznych warunkuje możliwość ich wykorzystania w hodowli roślin.

Także rozdziały **Dyskusja i Podsumowanie** są napisane bardzo ciekawie. Doktorantka omawia i dyskutuje swoje wyniki w świetle dostępnej literatury przedmiotu. Szczególnie interesująca jest ta część dyskusji w której omówione są mechanizmy molekularne warunkujące/determinujące indukcję zmian epigenetycznych. Tak z przeprowadzonych w ramach realizacji rozprawy badań jak i z przeglądu literatury wynika, iż nie jest przewidywalna trwałość zmian epigenetycznych w następnych pokoleniach roślin. Stąd, uważam że wniosek 9 zamieszczony w **Podsumowaniu** rozprawy uważam za zbyt ogólny i w związku z tym nieuprawniony.

Nasuują mi się następujące pytania do Doktorantki. Czy zbadano takie cechy zmodyfikowanych metodami epigenetycznymi roślin jak plon, jakość uzyskiwanego włókna, czy oleju. Czy wyprowadzone za pomocą OLIGO rośliny będą mogły, tak jak w przypadku roślin modyfikowanych genetycznie, być uznane za nowe odmiany? Jaka jest szansa na zarejestrowanie takich odmian przy słabo jednak poznanych mechanizmach molekularnych warunkujących tę zmienność?

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa zawiera cenne wyniki, a ich analiza pozwala na stwierdzenie, że doktorantka osiągnęła założone cele. Wykazała bowiem, iż wyindukowane za pomocą OLIGO lub fitohormonów zmiany epigenetyczne mogą w sposób istotny wpływać na cechy uzyskanych roślin; wykazała także, iż zmiany epigenetyczne w przypadku kilku linii roślin lnu były przenoszone na pokolenie F1 i F2. Recenzowana rozprawa doktorska napisana jest dobrym językiem, wyniki badań są bardzo dobrze udokumentowane, a całość rozprawy reprezentuje bardzo nowoczesny kierunek badawczy zmierzający do opracowania efektywnych metod modyfikacji roślin użytkowych bez potrzeby prowadzenia, ciągle jeszcze trudno akceptowalnych przez społeczeństwo, modyfikacji genetycznych. Badania są tym cenniejsze, iż

przeprowadzone na roślinie użytkowej o szerokim zastosowaniu – Inie. Część z uzyskanych wyników została już opublikowana w 2017 r. w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science*.

Oceniana praca dokumentuje opanowany przez Panią magister warsztat naukowy, który umożliwia prowadzenie ważnych, poznawczych i aplikacyjnych badań związanych z szerokim zastosowaniem metod biotechnologii molekularnej, inżynierii genetycznej, biologii molekularnej i biochemii. Poznane metody badawcze powinny pozwolić Doktorantce na kontynuację pracy naukowej/zawodowej w różnych kierunkach.

Bardzo dobrym uzupełnieniem rozprawy jest włączenie do niej opisu najważniejszych osiągnięć Doktorantki, takich jak współautorstwo publikacji, kierowanie projektami badawczymi czy prezentacja wyników badań na konferencjach naukowych. Przytoczone dane, takie jak współautorstwo 5 publikacji i 10 wystąpień na konferencjach naukowych, wskazują na wysoką aktywność naukową Doktorantki.

Wnioski końcowe

***W świetle przedstawionej powyżej, pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej
magister Magdaleny Działo wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu
Wrocławskiego o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.***

Stwierdzam, iż przedstawione badania reprezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą nowe i ważne treści do ogólnej wiedzy na temat możliwości regulacji adaptacji roślin do warunków niedoboru wody. Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne, zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.), stawiane rozprawom doktorskim.

Ze względu na wysoką wartość i innowacyjność przeprowadzonych badań oraz fakt, iż część wyników jest już opublikowana w renomowanych czasopiśmie międzynarodowym wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Działo.

