

Wrocław, 18.05.2015 r.

Prof. dr hab. Jan Oszmiański  
Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

R E C E N Z J A rozprawy doktorskiej

Recenzja przedłożonej rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner pt. **”Len transgeniczny jako źródło udoskonalonego włókna. Manipulacja metabolizmem polimerów ściany komórkowej włókna lnianego”**, wykonanej w Zakładzie Biochemii Genetycznej Uniwersytetu Wrocławskiego składa się z oceny następujących elementów:

1. Dobór i znaczenie tematu
2. Bibliografia i znajomość literatury
3. Układ pracy i wymogi formalne
4. Zastosowana metodyka badań
5. Koncepcja rozwiązania problemu naukowego i przedstawionych wyników
6. Prawidłowość wnioskowania
7. Ocena końcowa

Ad. 1. Ocena doboru i znaczenia tematu

W ostatnich latach dużą uwagę zwraca się na uprawy roślin wykorzystywanych nie tylko do produkcji żywności ale także do stosowania w różnych gałęziach przemysłu, w tym przemyśle włókienniczym. Naturalne, odnawialne surowce pochodzące z roślin ze względu na ich dostępność, niską toksyczność i przyjazny charakter dla środowiska zyskują coraz większą popularność na całym świecie, w tym także do produkcji tekstyliów. Notuje się duże zainteresowanie rozwojem produkcji naturalnego włókna wykorzystywanego w przemyśle tekstylnym. Wzrasta popyt na produkty "zielone" wytwarzane w oparciu o odnawialne źródła. W tym zakresie poszukuje się i udoskonala się rośliny dla praktycznego zastosowania w produkcji przemysłowej. Autorka w rozprawie doktorskiej podjęła się trudnego zadania poprawy jakości i właściwości włókna lnianego poprzez uzyskanie transgenicznych roślin z obniżoną zawartością lignin i pektyn. Istotnym zagadnieniem w rozprawie naukowej mgr inż. Marty Preisner była ocena wpływu wprowadzonych modyfikacji na skład, strukturę i właściwości ściany komórkowej surowca lnu –włókna, w tym także na fizjologię transgenicznego lnu włóknistego w uprawie polowej.

Z wykorzystaniem najnowocześniejszej aparatury analitycznej jak chromatografia cieczowa ze spektrometrią masową (LC-MS), technik analizy spektroskopowej w poczerwieni FT-IR, chromatografii gazowej GC-FID izolowała, identyfikowała i oznaczała składniki włókna, związki fenylopropanoidowe, sterole i inne substancje zawarte w tkankach lnu. Przedstawiona do recenzji praca obejmowała ponadto badania właściwości mechanicznych, wpływ ekstraktu włókna na bakterie patogenne, pojemność wiązania związków bioaktywnych przez włókna lnu i inne. Badania prowadziła w hodowlach *in vitro* i uprawach polowych, wykorzystywała różne techniki do uzyskania próbek lnu transgenicznego.

Praca ma dużą wartość poznawczą w zakresie oceny wpływu możliwości manipulacji genetycznej na składniki polimerów ściany komórkowej roślin. Wartość praktyczną pracy stanowi poprawa jakości włókna lnianego poprzez obniżenie zawartości lignin lub pektyn oraz skrócenie procesu rosznienia lnu. Doktorantka podjęła się trudnego, ważnego dla nauki i praktyki, interesującego tematu badań.

#### Ad. 2. Ocena bibliografii i znajomości literatury

Bibliografia pracy jest bardzo bogata, liczy 281 publikacji ściśle związanych z tematem badań. W tym tylko 2 prace są w języku polskim pozostałe w języku angielskim. Świadczy to o dużej dociekliwości i pracowitości w gromadzeniu informacji ze światowej literatury z zakresu przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Recenzent nie ma zastrzeżeń odnośnie znajomości tematu, zakresu i sposobu wykorzystania przedstawionej literatury.

#### Ad. 3. Ocena układu pracy i wymogów formalnych

Praca przedłożona do recenzji w formie maszynopisu zawiera 181 stron tekstu łącznie z wykazem literatury i załącznikiem. W rzeczywistości jest znacznie więcej stron, gdyż napisana jest małą czcionką z małymi odstępami i zawiera ponad 40 linii na stronie. Konstrukcja pracy jest zgodna z wymogami pisania rozpraw i oparta na podziale rzeczowym. Składa się z wprowadzenia literaturowego, celu pracy, rozdziałów części doświadczalnej obejmujących opis materiału i metod badawczych, oraz metod analitycznych, przedstawienia wyników, osobnego rozdziału dyskusji, podsumowania oraz wniosków. Wyniki badań zamieszczone są na 36 wykresach i w 6 tabelach.

We wstępie, w części literaturowej pracy na 37 stronach przedstawione są informacje o lnie i patogenach tej rośliny. Główną część wstępu poświęciła Doktorantka charakterystyce włókna lnianego, w tym szczególnie polimerom ściany komórkowej oraz modyfikacjom genetycznym mającym na celu poprawę jakości włókna lnianego. Zagadnienia te są ściśle związane z przedmiotem Jej badań, wykazała się bardzo dobrą ich znajomością. Bardzo trudny materiał opracowany jest z wykorzystaniem bogatego piśmiennictwa. Autorka przedstawiła bardzo szczegółowo poszczególne zagadnienia, wykazując się wyjątkowo bogatą wiedzą z tego zakresu badań. Do tej części pracy nie mam żadnych zastrzeżeń, tylko drobną uwagę że po tytułach rysunków nie stawia się kropek.

Cel pracy został przedstawiony zbyt obszernie, należałoby go skrócić a informacje zamieszczone na stronie 66 powinny być we wstępie teoretycznym.

W części doświadczalnej pracy na 22 stronach zaprezentowany jest opis materiału badawczego, wykonania doświadczeń i zastosowanych metod analitycznych. W tej części pracy są drobne błędy. Strona 86, (wiersz 7 od dołu) zamiast „cyjano-3-*O*-glukozydu” powinno być „cyjanidyno-3-*O*-glukozydu”. Autorka nie podaje wg kogo były wykonane analizy ekstraktu hydrofobowego z włókien (s.87), steroli (s.88), oceny pojemności wiązania włókien (s.90). Dlaczego detekcję rutyny przeprowadzono przy długości fali 320 nm? Rutyna jest flawonolem i ma maksimum absorpcji przy 360 nm i przy tej długości fali jest oznaczana. Autorka niepoprawnie używa określenia „prób” zamiast „próbek” (np. w punkcie 6.25. Ocena pojemności wiązania włókien s. 90)

Rozdział „Wyniki” jest przedstawiony na 47 stronach, podzielony w logiczny sposób na podrozdziały zgodnie z kolejnością przeprowadzonych doświadczeń. Dotyczy on kolejno badań nad oceną wpływu modyfikacji na ekspresję genów lnu w kulturze *in vitro*, następnie na parametry fenotypowe i agrotechniczne transgenicznych linii lnu w uprawie polowej, na skład i strukturę włókna oraz na jego właściwości użytkowe.

Wyniki badań są bogato ilustrowane wykresami, rysunkami obrazów mikroskopowych, tabelami oraz uzupełnione obliczeniami statystycznymi.

W rozdziale tym są drobne błędy jak np. podane są wartości: 284% (s.121) i 1000 % (s. 122). Jeżeli wyniki są powyżej 100% to lepiej podawać krotności np. 2,84 krotnie i 10 krotnie. Wykresy są zbyt mało czytelne np. „Wykres 22-23”. Wykres 18 i 27 nie powinien być przedstawiony jako sumaryczne słupki zawierające części flawony, antocyjany i związki flawonoidowe. Flawony i antocyjany to też są związki flawonoidowe. Na wykresie 33 podano niejasne objaśnienie „[mg związanej rutyny]”. Brak jest informacji w przeliczeniu na jaką masę włókna.

Dyskusję wyników zamieszczono jako osobny rozdział na 18 stronach. Została ona poprawnie przeprowadzona na podstawie bogatej bibliografii i zakończona, przejrzyste przedstawionym na 4 stronach podsumowaniem. Pierwsza strona dyskusji (s.139) zawiera informacje, które należałoby zamieścić raczej we wstępie i celu pracy niż w dyskusji. Są drobne błędy literowe np. s.139 , pierwszy wiersz od dołu jest „byłs” zamiast „była”; s.141, 17 wiersz od góry jest „Wwzrost” zamiast „Wzrost”

W końcowej części rozprawy doktorskiej mgr inż. Marta Preisner przedstawiła wnioski w formie opisowej, korzystniej byłoby ponumerować i podać je w skróconej formie w punktach. Ostatni rozdział to poprawnie przygotowany spis literatury i załącznik. W spisie literatury Autorka nie zachowała jednolitej formy, tytuły większości czasopism podaje w całości, natomiast część z nich stosując skróty. Poprawnie zostało przygotowane streszczenie, spisy rysunków, tabel, wykresów i zdjęć oraz pomocny w czytaniu tekstu pracy spis używanych skrótów .

#### Ad.4 Ocena zastosowanej metodyki badań

Autorka zastosowała w swych badaniach bardzo różnorodne, nowoczesne techniki z zakresu genetyki jak: elektroforeza, metoda PCR i inne, techniki mikroskopowe jak: skaningowa mikroskopia elektronowa, techniki analityczne z wykorzystaniem chromatografii ciekłej UPLC z detektorem diodowym, chromatografii gazowej GC-FID. Wykonywała oznaczenia aktywności przeciwutleniającej i zawartości różnych związków izolowanych z ściany komórkowej włókna lnianego metodami spektrofotometrycznymi. Korzystała także z pomocy innych ośrodków wykonując testy mechaniczne włókien lnianych w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu Rzeszowskiego, analizę spektroskopową w podczerwieni FT-IR włókien lnianych w Katedrze Chemii Bioorganicznej Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Ważną część Jej badań stanowiły analizy mikrobiologiczne patogennych dla człowieka szczepów bakterii.

Zastosowane w rozprawie metody badawcze były wyjątkowo złożone i czasochłonne, wymagały dużego nakładu pracy i umiejętności posługiwania się różnymi technikami badawczymi.

Szkoda, że Doktorantka dysponując możliwością korzystania z nowoczesnej techniki analitycznej jak UPLC-PDA oznaczała zawartość wolnych fenylopropanoidów jak : antocyjany, flawony, fenole ogółem tylko metodami spektrofotometrycznymi, jak sama stwierdza „metodami mniej dokładnymi, kolorymetrycznymi, które pozwalają szacunkowo i

porównawczo ocenić sumarycznie stężenie danej grupy związków” (s.116). Mogła w tym celu wykorzystać techniki SPE, które pozwalają w łatwy sposób zageścić i oczyścić związki polifenolowe, wówczas możliwe byłoby ich oznaczenie i identyfikacja. Moim zdaniem Autorka także zastosowała zbyt drastyczne warunki dla uwalnianych związanych związków polifenolowych ze ścianą komórkową z udziałem 2 M NaOH przez 48 godzin w temperaturze pokojowej. W takich warunkach następują duże straty tych związków w wyniku utleniania, konieczne jest zastosowanie atmosfery gazu obojętnego lub dodatek przeciwutleniaczy, dla ochrony przed stratami tych związków.

Inne zastosowane w rozprawie metody badawcze były właściwie dobrane, wymagały dużego wkładu pracy, zwłaszcza ze względu na konieczność współpracy z innymi ośrodkami badawczymi. Tak kompleksowe badania wniosły wiele nowych informacji z zakresu manipulacji metabolizmem polimerów ściany komórkowej włókna lnianego.

Część analityczna, która obejmowała dużą ilość bardzo trudnych, czasochłonnych i pracochłonnych analiz zasługuje na szczególne podkreślenie i stanowi najwartościowsze osiągnięcie Autorki pracy. Duża ilość badań pozwoliła na uzyskanie wielu nowych informacji

#### Ad.5.Ocena koncepcji rozwiązania problemu naukowego i przedstawionych wyników

Badania mgr inż. Marty Preisner dotyczyły trudnego i ambitnego zadania poprawy jakości i właściwości włókna lnianego poprzez wytworzenie roślin transgenicznych lnu z obniżoną zawartością lignin (poprzez wyciszenie genu dehydrogenazy alkoholu cynamonowego, CAD) lub pektyn (poprzez wprowadzenie grzybowych enzymów pektynolitycznych, PGI lub RHA). Były one przeprowadzone, kompleksowo i w szerokim zakresie. Szczególnie ważnym, trudnym i pionierskim zagadnieniem naukowym w pracy była ocena wpływu wprowadzonych modyfikacji na poszczególne składniki, strukturę i właściwości ściany komórkowej włókna lnu, oraz fizjologię lnu włóknistego w badaniach w kulturach tkankowych i uprawach polowych. Efektem praktycznym uzyskanym w wyniku przeprowadzonych badań była poprawa jakości roszenia lnu. Uzyskane transgeniczne próbki lnu z obniżoną zawartością pektyn, dały możliwość skrócenia czasu roszenia co pozwoliło na poprawę jakości włókna jego faktury, barwy i ograniczenia mikrouszkodzeń.

Założenia i koncepcja rozwiązania problemu naukowego w pracy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner były poprawne. Praca obejmowała szeroki zakres badań, które zostały zrealizowane z dużym sukcesem. Zadania dotyczyły trzech transgenicznych typów lnu w których Autorka oceniła: ekspresje wybranych genów metabolizmu polimerów ściany

komórkowej oraz genów białek związanych z patogenezą w transgenicznym roślinach *in vitro*, fenotyp transgenicznym roślin w uprawie polowej, skład i strukturę włókna lnianego z roślin transgenicznym oraz jego właściwości użytkowe.

Na podkreślenie zasługuje determinacja mgr inż. Marty Preisner w osiągnięciu pożądanego efektu. Badania zostały przeprowadzone kompleksowo nie tylko we własnym ośrodku naukowym ale także na Uniwersytecie Rzeszowskim i Uniwersytecie Ekonomicznym we Wrocławiu.

Wysoko oceniam nie tylko doświadczenia z zakresu genetyki dotyczące uzyskania roślin transgenicznym, ale także dotyczące szczegółowej analizy składników włókna z wykorzystaniem nowoczesnych technik analitycznych jak chromatografia cieczowa, gazowa i analiza spektroskopowa w podczerwieni (FT-IR). Są to zagadnienia trudne wymagają dużym umiejętności w ich wykonaniu i wiedzy w interpretacji wyników analiz.

Dużą wartość poznawczą mają przeprowadzone doświadczenia w których Doktorantka wykazała, że modyfikacja genetyczna powoduje zmiany w składzie ściany komórkowej i właściwościach użytkowych włókna lnu. Dowiodła w swych badaniach, że zmiany w zawartości lignin lub pektyn są kompensowane przez korzystne zwiększenie zawartości celulozy we włóknie lnianym. Są to oryginalne, ważne dla praktyki osiągnięcia Doktorantki. Szeroki zakres bardzo pracochłonnym i czasochłonnym badań przewyższa jedną rozprawę doktorską. Wyniki Jej badań mają dużą wartość praktyczną i poznawczą.

#### Ad.6. Ocena prawidłowości wnioskowania

Autorka sformułowała poprawnie wnioski w których przedstawiła najważniejsze wyniki dobrze udokumentowanych własnym badań.

#### Ad..7. Ocena końcowa

Oceniając merytorycznie przedłożoną do recenzji pracę doktorską mgr inż. Marty Preisner stwierdzam, że Autorka wykazała się gruntowną znajomością tematyki badań, poprawnie zaplanowała i wykonała wyjątkowo trudne eksperymenty wykazując się umiejętnością posługiwania najnowocześniejszą dostępną aparaturą analityczną uzyskując dużą ilość wartościowych wyników. Szczególnie należy podkreślić bardzo duży zakres różnorodnym, czasochłonnym analiz nad składnikami polimerów ściany komórkowej. Na podstawie swym badań Autorka przedstawiła obszerny materiał dotyczący możliwości

manipulacji metabolizmem polimerów ściany komórkowej włókna lnu. Wyniki tej pracy stanowią ważny wkład w poznanie metabolizmu składników ściany komórkowej wywołanych modyfikacjami genetycznymi lnu. Praca zawiera elementy nowości naukowej, zwłaszcza w zakresie badań nad składem i metabolizmem polimerycznych związków ściany komórkowej lnu. Bardzo duża ilość doświadczeń wniosła wiele nowych informacji z ważnego dla nauki i praktyki zakresu badań.

Dużą wartość naukową mają wyniki badań wpływu ekstraktów związków fenylopropanoidowych z włókien transgenicznego lnu na patogenne szczepy bakterii. Na szczególne podkreślenie zasługuje prowadzenie badań także w innych ośrodkach naukowych, co pozwoliło dodatkowo uzyskać wartościowe wyniki istotne w ocenie włókna lnu.

Niewielka ilość uwag krytycznych recenzenta ma charakter dyskusyjny. Oceniający głównie skupił się na błędach, które należałoby skorygować w przygotowywaniu pracy do druku.

Dyskusyjne uchybienia w pracy nie umniejszają jej wartości merytorycznej. Uważam, że będąca przedmiotem oceny rozprawa mgr inż. Marty Preisner w pełni odpowiada wymogom art. 20, punkt 1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 03,65,595) stawianym pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Przedstawiona do recenzji rozprawa i załączony w Curriculum Vitae dotychczasowy dorobek naukowy (7 publikacji) w pełni uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.

Jednocześnie proponuję wyróżnić rozprawę mgr inż. Marty Preisner za szczególnie duży wkład pracy w opracowanie literaturowe, determinację w wykonaniu doświadczeń nad manipulacją metabolizmem polimerów ściany komórkowej włókna lnianego, oraz zakres badań znacznie przekraczający pracę doktorską.

