

Ocena pracy doktorskiej mgr Aleksandry Boby pt. „**Terpenoidy w odpowiedzi lnu na fuzariozę**”

Z powodu cennych właściwości jakie posiada len i niskich wymagań glebowych jego uprawa w Polsce ma długą tradycję. Jednak w ostatnich czasach jego areał maleje głównie za sprawą bawełny oraz małej odporności, przede wszystkim na fuzariozy czasami niszczące plantacje w znacznym stopniu. Wydaje się jednak, że wartość uzyskiwanego z lnu włókna i oleju, są tej miary, że należy robić wszystko by nie zniknął z pól. Sytuację może zmienić wiedza omiczna, w tym o mechanizmach reakcji rośliny na czynniki stresowe w tym biotyczne, do których należą patogeny. U lnu szczególnie groźnymi są grzyby z rodzaju *Fusarium* – *F. oxysporum* i *F. culmorum*. Odporność na nie jest jednym z najistotniejszych czynników determinujących przeżywalność i kondycję roślin – tym samym opłacalność uprawy

Poznanie mechanizmów infekcji i odpowiedzi rośliny jest podstawą skutecznego programowania i wprowadzania elementów mechanizmów reakcji obronnej rośliny nowoczesnymi metodami transgenezy i editingu genomowego.

Przedstawiona do oceny praca jest kontynuacją rozpoczętych przez promotora tej pracy prof. dr hab. J. Szopę-Skórkowskiego w latach 90-tych ubiegłego wieku zaawansowanych prac biotechnologicznych nad lnem w tym w ostatnich czasach również mechanizmami odporności na wymienione patogeny. Ich wynikiem było uzyskanie ważnej wiedzy, jak również nowych form (uzyskanych drogą transgenezy) mających nowe właściwości prozdrowotne i istotne gospodarczo.

Dane formalne i przegląd treści rozdziałów

Praca liczy 104 strony maszynopisu podzielone na 5 rozdziałów plus dodatki takie jak abstrakt podsumowanie wykaz skrótów, spis rycin i wykresów i inne. Dokumentację stanowiło – 16 rycin i 37 wykresów. Treść poszczególnych rozdziałów odpowiada zagadnieniom w nich omawianych.

Wstęp obejmujący 18 stron jest jednocześnie przeglądem literatury, w którym poruszone zostały najważniejsze, z punktu widzenia prowadzonych przez autorkę prac, zagadnienia. Pierwsza część jest przeglądem informacji na temat obiektu badań i stanu badań nad mechanizmami odporności oraz syntezy i roli w biorących w nich udział nich związków. Autorka wykazuje się dużą wiedzą z zakresu jej aktywności naukowej.

W następnym rozdziale postawiono cel pracy, a właściwie cele, które są zgodne z tytułem, który jest raczej pojemny. Stąd praca jest wieloaspektowa. Nie postawiono natomiast hipotezy badawczej, która nie jest jeszcze wymagana, ale coraz częściej stawiana.

Metody badań i materiały użyte do ich przeprowadzenia szczegółowo przedstawione zostały na 14 stronach. Materiałem roślinnym był len włóknisty odmiany Nike i oleisty linola (niskolinolenowy) oraz wcześniej wyprowadzone z tej ostatniej dwie linie „transgeniczne” z zablokowaną ekspresją analogu transgeny cyklazy β likopenu – genu *lcb*. Wytworzono też nowe transformanty zawierające transgeny syntazy fitoenu *crtB* i desaturazy karotenu *crtI* oraz ich kombinacje, związane syntezą karotenów. Metodyka obejmuje bardzo szerokie spektrum bardzo

złożonych procedur, od kultur *in vitro* roślin i bakterii, testów odpornościowych, analiz metabolitów po transgenezę i analizy kwasów nukleinowych w tym testy ilościowe transkryptów.

Uzyskane wyniki wraz z umieszczoną z nimi dokumentacją zajmujące 36 stron można z grubsza podzielić na grupy które odnoszą się do etapów pracy wymienionych przez autorkę w celu pracy.

Uzyskane wyniki były dyskutowane na 7 stronach. Dyskusję czyta się z dużą przyjemnością, ponieważ mimo ogromnej ilości skomplikowanych wyników jest rzeczowa, zwarta znamionująca panowanie nad tematem i dojrzałość naukową. Wniosków z dyskusji nie zamieszczono. W to miejsce zamieszczono podsumowanie.

Zamieszczony na końcu spis literatury obejmuje około 100 nie numerowanych pozycji .

Najważniejsze wyniki pracy

Do najistotniejszych osiągnięć tej gigantycznej pracy zaliczyłbym: 1. Wykazanie istnienia specyficznej jak się wydaje dla lnu odpowiedzi na infekcję *F. culmorum* i *F. oxysporum* zależnej głównie od szlaków regulowanych przez ABA i prawdopodobnie za jego pośrednictwem następuje aktywizacja reakcji obronnych. 2 Autorka wykazała, że chloroplastowy szlak biosyntezy terpenoidów MEP jest uruchamiany u lnu w odpowiedzi na infekcję *Fusarium culmorum* i *Fusarium oxysporum*. 3. zidentyfikowanych i umieszczonych w bazie NCBI, zostało ponad 40 sekwencji nukleotydowych związanych ze szlakiem syntezy terpenoidów, oraz około 20 sekwencji spoza badanych szlaków, ale umożliwiające wyjaśnienie zagadnień podjętych w ramach pracy. Są to geny syntezy kalozy, geny związane z produkcją i rozkładem wolnych rodników, geny związane z metylacją DNA i modyfikacją potranslacyjną białek histonowych. 4. Stwierdzono, że w czasie infekcji wzrasta ekspresja genu *pmr4* i jednocześnie wzrasta zawartość kalozy, ważnego czynnika w systemie obrony przed infekcją. W promotorze genu *pmr4* zidentyfikowano elementy *cis* regulatorowe reakcji na ABA. 5. Uzyskano dość wiarygodne wyjaśnienie mechanizmu trwałego (jak dotąd) wyciszenia genu natywnego (*lcb*) przez transgen aktywny tylko przejściowo tuż po transformacji i nie nieobecny w genomie. Represja tego genu wpłynęła w różnym stopniu na zmianę ekspresji genów badanych szlaków, czego konsekwencją było obniżenie zawartości karotenoidów, co miało negatywne konsekwencje dla zawartości chlorofilu, ale nie ABA – poziom tego związku był wyższy. To może tłumaczyć wzrost odporności roślin L na oba patogeny. 6. Uzyskano formy transgeniczne z bakteryjnymi genami syntezy karotenoidów *crtI* i *crtB* pod promotorem 35S. Transformanty wykazywały zmieniony fenotyp oraz wyższą zawartość karotenoidów w nasionach. Nie zdążono jednak przetestować odporności tych roślin na patogeny. Obie kolekcje transgeników są dobrym materiałem do dalszych badań nad mechanizmami odpowiedzi na czynniki patogenne, być może nie tylko *Fusarium*.

Uwagi i komentarze

W zasadzie do pracy a szczególnie jej części merytorycznej istotnych zastrzeżeń nie mam. Chciałbym tylko zauważyć, że nie podano czy wymienione odmiany są liniami czystymi, czy zbiorem różnych genotypów. W tego typu badaniach może być to istotne. Najlepiej gdyby materiał był jednolity i homozygotyczny. Nie, uzasadniono też dlaczego do prac wybrano formę nisko linolenową (kwasy- ω -3), olej taki jest trwalszy, ale podobno mniej wartościowy właśnie ze względu na niższą zawartość tego kwasu. Na ryc. 15 B na ścieżce zaznaczonej X powinien być chyba prążek, bo wg legendy w ten sposób oznaczono próby zawierające oczekiwany produkt (dla genu *crtI*), a tam nic nie widać. Praca, jest napisana dobrym językiem w sposób, wskazujący na dużą swobodę w poruszaniu się w bardzo skomplikowanej materii pracy. Zdarzają się drobne błędy literowe, a niekiedy rzeczowe np. sekwencje nukleotydowe kodujące geny (str. 14); chyba

nie ma też fitohormonów nieroślinnych (str. 32); ekspresja może być chyba wyższa lub niższa a nie aktywna lub w domyśle nieaktywna (str. 45). Niektóre rysunki są mało czytelne, szczególnie rys. 6 bez szkła powiększającego nie da się odczytać.

Praca doktorska autorstwa mgr Aleksandry Boby zawiera wyniki wnoszące postęp w rozumieniu mechanizmów reakcji lnu na niezwykle groźne dla tego gatunku patogeny grzybowe, którymi są *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum*. Myślę, że analiza skutków inwazji tych patogenów i możliwości zapobieżenia im powinna być kontynuowana.

Uważam, że wyniki przedstawione w tej pracy kwalifikują jej autorkę do nadania stopnia doktora. Doktorantka przeprowadziła bardzo rozległe badania i uzyskała wiele bardzo wysokiej jakości dobrze udokumentowanych wyników. Stwierdzam, że Pani mgr Aleksandra Boba spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim.

Na podstawie powyższego zwracam się do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego z prośbą o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Boby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z pełnym przekonaniem wnoszę również o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie:

Autorka wykonała olbrzymią pracę, posługując się bardzo zaawansowaną i różnorodną metodyką, co pozwoliło Jej na uzyskanie niezwykle wysokiej jakości wyników wystarczających na dwa doktoraty. W szczególności:

- zidentyfikowanych i umieszczonych w bazie NCBI, zostało ponad 40 sekwencji nukleotydowych związanych ze szlakiem syntezy terpenoidów, oraz około 20 sekwencji spoza badanych szlaków, ale umożliwiające wyjaśnienie zagadnień podjętych w ramach pracy
- wykazano, że infekcja *Fusarium* u lnu uruchamia chloroplastowy szlak biosyntezy terpenoidów MEP
- wykazano, że pod wpływem patogenów indukowane są szlaki biosyntezy karotenoidów, biosyntezy kwasu abscysynowego oraz częściowo tokoferoli,
- Autorka dowiodła, że odpowiedź lnu na infekcję *Fusarium* jest związana z indukcją biosyntezy ABA.
- zdobytą wiedzę Autorka próbowała sprawdzić i wykorzystać konstruując formy transgeniczne o zawierające transgeny, które powinny zmieniać zawartość karotenoidów.


Prof. dr hab. Zbigniew Przybecki