

Recenzja pracy doktorskiej Pani Mgr Aleksandry Boby, pt. **”Terpenoidy w odpowiedzi lnu na fuzariozę”**

Terpeny (izoprenoidy) stanowią największą i najbardziej zróżnicowaną klasę związków lipidowych występujących u roślin. Pełnią one funkcję zarówno we wzroście i rozwoju, jak i w ochronie roślin przed zagrożeniami ze strony środowiska biotycznego i abiotycznego. Rosnące znaczenie udziału różnych grup terpenoidów w ochronie roślin przed patogenami i szkodnikami skłania do opracowania strategii ich zwalczania w oparciu o terpenoidy. Takie zamierzenie wymaga ciągłego pogłębiania wiedzy na temat molekularnych i metabolicznych sieci regulatorowych biosyntezy terpenoidów, w których rdzeń izoprenowy jest organizowany, przekształcany, a następnie dywersyfikowany w wyspecjalizowanych szlakach. Poznanie mechanizmów regulacyjnych biosyntezy terpenoidów w rozwoju roślin oraz w odpowiedzi na zagrożenia ze strony środowiska pozwoliłoby na określenie funkcji najważniejszych lotnych i stałych form terpenoidów, a dalej na zastosowanie wielu z nich w przemyśle i ochronie roślin.

Problematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Boby wpisuje się w ten zakres badań. Autorka zamierzała zidentyfikować terpenoidy, które są syntetyzowane u lnu w odpowiedzi na infekcję dwóch gatunków grzybów patogenicznych należących do rodzaju *Fusarium*. Ich zidentyfikowanie pozwoliłoby, z jednej strony na wyodrębnienie szlaku biosyntezy terpenoidów, którego produkt końcowy lub metabolity pośrednie pełniłyby funkcję w mechanizmach ochronnych lnu przed fuzariozą, a z drugiej, po ich zidentyfikowaniu, stosując metody inżynierii genetycznej można byłoby wytworzyć genotypy o zwiększonej zawartości tego związku, a w konsekwencji charakteryzujące się wyższą odpornością na patogeny. Ze względu na ogromną różnorodność związków terpenoidowych występujących w roślinach, analiza wszystkich pod kątem odporności na fuzariozę byłaby niemożliwa. Dlatego też, Autorka skupiła się na trzech grupach związków lipidowych należących do terpenoidów, takich jak sterole, karotenoidy oraz tokoferole, które już są wymieniane w literaturze pod kątem ich właściwości ochronnych względem patogenów i szkodników. U roślin, sterole powstają w cytoplazmatycznym szlaku biosyntezy terpenoidów MEV, natomiast tokoferole i karotenoidy w chloroplastowym szlaku MEP.

Dla rozwiązania celu Autorka przeprowadziła kompleksowe badania składające się z kilku etapów oraz obejmujących różne aspekty. Punktem wyjściowym zrealizowania badań było zidentyfikowanie genów kodujących enzymy dla wybranych szlaków terpenoidów, których ekspresja ulegałaby zwiększeniu w siewkach lnu odm. Nike w odpowiedzi na infekcję *Fusarium culmorum* i *Fusarium oxysporum*, a następnie określenie zawartości produkowanych steroli, karotenoidów i tokoferoli. Na wstępie, Autorka prześledziła zmiany

w poziomie ekspresji genów kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie prekursora biosyntezy wszystkich terpenoidów, tj. jednostki izoprenowej, co pozwoliło na rozróżnienie szlaków MEV i MEP, a następnie prześledziła ekspresję genów kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie fitosteroli, karotenoidów i tokochromanoli. W wyniku przeprowadzonych badań Autorka wykazała, że u lnu następuje uruchomienie chloroplastowego szlaku MEP biosyntezy terpenoidów w odpowiedzi na infekcję obu patogenów, co przejawiało się zwiększonym poziomem ekspresji genu *DXR* kodującego chloroplastową reduktazę 1-deoksy-D-ksylulozo 5-fosforanu (DXP), kluczowego enzymu biosyntezy pirofosforanu izopentylu (IPP), a brak zmian w poziomie ekspresji genu *HMGR* kodującego reduktazę 3-hydroksy-metyloglutaryloCoA, enzymu szlaku MEV, który działa na tym samym etapie biosyntezy IPP w cytoplazmie. Dalej Autorka wykazała, że w ślad za zmianą w poziomie ekspresji genu *DXR* następuje zintensyfikowanie ekspresji genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy karotenoidów, a zwłaszcza genu *PSY* kodującego syntazę fitoenu oraz w mniejszym stopniu genów szlaku prowadzącego do powstania tokoferoli, np. genu *VTE2* kodującego fitylotransferazę homogentyzynianu (HPT). Jednak najwyraźniejsze zmiany w poziomie ekspresji Autorka wykazała dla genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy ABA, zwłaszcza genów *NCED* dla 9-cis epoksy dioksygenazy 3 i -6, nie obserwowała natomiast zwiększenia poziomu ekspresji genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy steroli i ich pochodnych. W przeciwieństwie do wzrostu poziomu ekspresji genów szlaku karotenoidowego, a także tokoferoli w odpowiedzi na infekcję *F. culmorum* i *F. oxysporum*, Autorka nie obserwowała istotnego wzrostu w zawartości produktów końcowych tych szlaków, tj. karotenoidów i α -tokoferolu; obserwowała natomiast istotny wzrost zawartości ABA. Zwiększenie poziomu ABA w komórce wiąże się z uruchomieniem wielu szlaków regulacyjnych, które są związane z adaptacją do warunków stresowych, a ograniczeniem wzrostu. Niezależnie, Autorka zaobserwowała wzrost ekspresji genu *PMR4* (*GLS5*) kodującego syntazę kalozy oraz zwiększoną zawartością kalozy, które wiąże ze zwiększoną zawartością ABA, i prawdopodobnie z regulacją ekspresji genu *PMR4* przez szlak ABA.

Podsumowując ten etap badań Autorka wykazała, że szlak prowadzący do syntezy ABA jest najsilniej indukowany po infekcji siewek lnu *F. culmorum* i *F. oxysporum*, co sugerowałoby, że odpowiedź lnu na infekcję Fusarium jest oparta głównie na ścieżkach regulacyjnych zależnych od kwasu abscysynowego. Te dane wydają się specyficzne dla lnu i posiadają wysoką wartość naukową. Ponadto, dla przeprowadzenia badań nad zmianami ekspresji genów w odpowiedzi na patogeny Autorka wyizolowała ponad 40 klonów reprezentujących geny związane ze szlakiem biosyntezy terpenoidów, około 20 sekwencji DNA niezwiązanych ze szlakiem terpenoidów, które były potrzebne dla wyjaśnienia wielu aspektów badań w ramach rozprawy doktorskiej, takich jak gen syntezy kalozy, geny związane z produkcją i rozkładem wolnych rodników, geny związane z metylacją DNA i modyfikacją potranslacyjną białek histonowych. Jak podaje Autorka, 24 geny zostały umieszczone w ogólnodostępnej bazie NCBI.

Po wykazaniu, że szlak karotenoidowy jest najbardziej powiązany z odpowiedzią lnu na infekcję *F. culmorum* i *F. oxysporum*, Autorka starała się bliżej określić drogę metaboliczną w szlaku karotenoidowym, która jest odpowiedzialna za reakcję na infekcję patogenów. W tym celu, przygotowała dwa typy roślin transgeniczných lnu w celu

zmodyfikowania wydajności szlaku karotenoidowego, jeden, z nadekspresją genu kodującego syntazę fitoenu (*CrtB*), enzymu produkującego fitoen oraz genu *CrtI* kodującego desaturazę karotenu, która bierze udział w przekształceniu ζ -karotenu w likopen. Transformowane geny *CrtB* i *CrtI* Autorka wyizolowała z bakterii *Erwinia uredovora*. Drugi typ roślin transgeniczných charakteryzował się wyłączoną ekspresją genu *LCB* kodującego likopenową β -cyklazę, która przekształca likopen w β -karoten. Z kolei, β -karoten jest przekształcany w cyklu ksantofilowym do wiolaksantyny, a ta stanowi substrat wyjściowy w szlaku biosyntezy kwasu abscysynowego (ABA). Rośliny nadekspresjonujące bakteryjne geny syntazy karotenoidów *CrtB* i *CrtI* charakteryzowały się zwiększoną zawartością karotenoidów w nasionach oraz γ -tokoferolu. Także potencjał antyoksydacyjny nasion został podwyższony. Z kolei, w analizowanych roślinach transgeniczných typu L odmiany Linola nastąpiło wyciszenie ekspresji transgenu *LCB*, którego skutkiem było obniżenie zawartości karotenoidów, a także tokoferoli, natomiast zawartość ABA nie uległa większym zmianom. Jest interesujące, że obserwowano wzrost odporności roślin typu L na patogeny z rodzaju *Fusarium*. Autorzy nie posiadają jeszcze danych eksperymentalnych dla wytłumaczenia mechanizmu wyciszenia ekspresji genu *LCB*, jak i ich zwiększonej odporności na patogeny, jednakże wykazali, że transgen *LCB* posiada zwiększony poziom metylacji, co może tłumaczyć wyciszenie jego ekspresji.

W sumie, Pani mgr Aleksandra Boba wykonała gigantyczną pracę, składającą się z wielu aspektów i prowadzoną na wielu poziomach. Zakres wykonanych badań wystarczyłby przynajmniej na dwie prace doktorskie. Efektem wykonanych badań było wykazanie, że u lnu następuje uruchomienie chloroplastowego szlaku MEP biosyntezy terpenoidów w odpowiedzi na infekcję *F. culmorum* i *F. oxysporum*. Na dalszych etapach biosyntezy terpenoidów następuje wzrost poziomu ekspresji genów należących do szlaku karotenoidowego, tokoferoli oraz kwasu abscysynowego. Jednak, w przeciwieństwie do obserwowanego wzrostu poziomu ekspresji genów, Autorka nie obserwowała istotnego wzrostu zawartości karotenoidów i α -tokoferolu, natomiast obserwowała istotny wzrost zawartości ABA. Z uzyskanych danych wynika, że indukcja szlaku karotenoidowego u lnu pod wpływem gatunków należących do rodzaju *Fusarium* jest związana ze zwiększeniem poziomu ABA, i prawdopodobnie za jego udziałem następuje uruchomienie reakcji obronnych.

Jako recenzent nie mam zastrzeżeń do jakości przeprowadzonych badań. Ogrom zastosowanych w pracy technik oraz zakres uzyskanych wyników sprawiają, że ogólny wynik badań oraz wypływające z nich wnioski są imponujące. Wykonane badania zasługują w pełni na wyróżnienie.

Oceniając stronę formalną rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Boby, należy podkreślić, że Autorka przedstawiła bardzo szeroki Wstęp do badań, w którym charakteryzuje szlaki biosyntezy terpenoidów, szczegółowy opis stosowanych metod oraz znakomicie udokumentowane Wyniki badań. W części rozprawy "Dyskusja" Autorka starała się w sposób rzeczowy przedyskutować wszystkie konsekwencje wynikające z uzyskanych wyników. Pomimo ogromnego skomplikowania przedmiotu badań, praca doktorska została napisana poprawnym językiem, wskazującym na dużą dojrzałość naukową Pani mgr Aleksandry Boby. Z obowiązku recenzenta muszą zaznaczyć, że na niektórych wykresach zmiany w ekspresji analizowanych genów nie przebiegają płynnie w miarę wydłużania czasu infekcji. Być może

jest to spowodowane niedostateczną liczbą powtórzeń. Myślę, że rysunki przedstawiające przebieg etapów biosyntezy terpenoidów u roślin są mało czytelne, co zmusza czytelnika do sięgania do literatury.

Biorąc pod uwagę rozległy zakres badań będących przedmiotem rozprawy, wysoką jakość uzyskanych wyników, a także bardzo dobre ich udokumentowanie oraz wiedzę, którą Pani mgr Aleksandra Boba zdobyła podczas wykonywania niniejszej pracy, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że Pani mgr Aleksandra Boba spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też, wnoszę wniosek do Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Boby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na doniosłość uzyskanych wyników, w oddzielnym piśmie składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Boby.



- 1- Przewodniczący Rady Naukowej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego
- 2- Przewodniczący Komisji ds. przewodu doktorskiego mgr Aleksandry Boby

Uzasadnienie Wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Boby

1. Autorka przeprowadziła wszechstronne badania pozwalające na określenie funkcji terpenoidów w odpowiedzi lnu na infekcję grzybami patogenicznymi należącymi do rodzaju *Fusarium*.
2. Autorka wykazała, że chloroplastowy szlak biosyntezy terpenoidów MEP jest uruchamiany u lnu w odpowiedzi na infekcję *Fusarium culmorum* i *Fusarium oxysporum*.
3. Na poziomie ekspresji genów kodujących enzymy biosyntezy terpenoidów tylko szlak prowadzący do biosyntezy karotenoidów oraz częściowo tokoferoli, a także szlak prowadzący do biosyntezy kwasu abscysynowego są indukowane pod wpływem patogenów.
4. Badania Pani mgr A. Boby dostarczyły bezpośrednich dowodów, że odpowiedź lnu na infekcję *F. culmorum* i *F. oxysporum* jest ściśle powiązana z uruchomieniem szlaku biosyntezy ABA.
5. Do wykonania badań Autorka musiała posłużyć się najnowszą metodyką badawczą, którą opanowała w znakomitym stopniu.

