

Poznań 18.09.2014.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Wiolety Wojtasik pt.:
„Ocena znaczenia polimerów ściany komórkowej w odpowiedzi lnu na fuzariozę”

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego na Uniwersytecie Wrocławskim, Wydziale Biotechnologii w Zakładzie Biochemii Genetycznej.

Autorka w swojej bardzo obszernej dysertacji doktorskiej, prawidłowo zapisała wszystkie rozdziały wymagane dla tego typu opracowań. Głównym celem pracy było określenie roli polimerów ściany komórkowej w odpowiedzi lnu na infekcje patogennymi szczepami *F. oxysporum* i *F. culmorum*.

We wstępie, doktorantka opisała gatunek len (*Linum usitatissimum* L.), roślinę oleistą i włóknistą Polski i Europy, gatunek najbardziej zagrożony patogenami z rodzaju *Fusarium* sp. Autorka w tym rozdziale scharakteryzowała surowce: włókno i olej wykorzystywane w przemyśle chemicznym: do produkcji farb i lakierów oraz surowce lniane mające szersze zastosowanie w przemyśle spożywczym, chemicznym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz papierniczym. Szczegółowo opisała włókno lniane i wskazała, że posiada ono poza celulozą ważne składniki o działaniu przeciwutleniającym, co z kolei stwarza możliwość ich wykorzystania w produktach biomedycznych. Ponadto obecność naturalnych antyoksydantów w włóknie lnu może wspomagać leczenie trudno gojących się ran. Dodała, że mikronizowane włókno można wykorzystać jako nośniki i stabilizatory substancji czynnych takich jak: leki, witaminy i hormony, a także włókno to można użyć do produkcji antybiotyków.

Autorka opracowania podała także informację dotyczącą nasion lnu, które posiadają dużą wartość odżywczą ze względu na obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, fitosteroli, witamin A i E oraz skwalenu i lignanów. Nasiona lnu wykorzystuje się w między innymi w leczeniu chorób układu pokarmowego, oddechowego i innych schorzeniach.

Autorka przedstawiła dane dotyczące możliwości zwiększenia odporności roślin na porażenie powodowane przez patogeny wykorzystując metody inżynierii genetycznej. Wskazała, że podniesienie odporności na choroby można osiągnąć poprzez nadekspresję genów związanych z patogenezą oraz nadekspresję genów syntezy ich wtórnych metabolitów.

Podrozdziały **wstępu** zapisano na 52 stronach w taki sposób, aby wprowadzić czytelnika w zagadnienia, które następnie w części empirycznej były opracowywane - badane. Opisy te dotyczyły:

- lnu zwyczajnego jako modelu badawczego; patogenów i chorób lnu;
- odporności roślin na czynniki stresowe;
- odpowiedzi obronnej roślin na działanie patogena;

Autorka opisała znane typy odporności: odporność wrodzoną, nieswoistą, swoistą, nabytą, indukowaną czy systemiczną.

W tym samym rozdziale przedstawiła rolę białek PR związanych z odpornością roślin, rolę β -glukanaz w odpowiedzi na stresy biotyczne i abiotyczne oraz rolę chitynaz. Opisała systemy

odporności roślin: odporność PTI/MTI, odporność ETI, reakcję nadwrażliwości (HR), rolę fitohormonów w odporności roślin, rolę SA, JA i ET w odpowiedzi immunologicznej roślin na atak patogenów.

Kolejny podrozdział wstępu dotyczył ściany komórkowej roślin. Przedstawiono w nim następujące zagadnienia: pierwotną i wtórną ścianę komórkową, występowanie i rolę celulozy, hemicelulozy, pektyn, ligniny, poliamid i kalozy.

Scharakteryzowano także włókno lniane, proces rosznienia lnu oraz właściwości prozdrowotne znanych polimerów występujących w ścianach komórkowych.

Następny rozdział rozprawy doktorskiej to „**Cel Pracy**”. Jak już wspomniano na wstępie recenzji, najważniejszym celem przeprowadzonych badań była ocena i weryfikacja znaczenia roli ściany komórkowej w lnieniu. Autorka podkreśla, że patogeniczne grzyby w początkowym etapie infekcji wydzielają enzymy degradujące ścianę komórkową gospodarza, co w konsekwencji prowadzi do zniszczenia bariery ochronnej roślin i w efekcie prowadzi do ich śmierci. Dalszym etapem były badania zmierzające do wyjaśnienia odpowiedzi inokulowanych patogenem roślin i analiza transgenicznego lnu z nadekspresją genu β -1,3-glukanazy. Próbowano oszacować czy: większa odporność lnu „typu B” na porażenie przez *F. culmorum* i *F. oxysporum* jest spowodowana nadekspresją wprowadzonego genu. W tym zadaniu postanowiono przeanalizować jak β -1,3-glukanazy wpłynęły na ekspresję endogennych izoform β -1,3-glukanazy i chitynazy. Ponadto wykonano analizę ekspresji genów związanych z metabolizmem polimerów ściany komórkowej i oceniono zawartość: celulozy, hemicelulozy, pektyn, lignin i poliamin.

Kolejnym celem pracy była analiza surowców otrzymanych z transgenicznego lnu z nadekspresją β -1,3-glukanazy. Zbadano czy tego typu modyfikacja genetyczna wpływa na plonowanie i wartość użytkową podstawowych produktów lnianych. Problem ten poruszono, ponieważ do obecnego czasu nie odzyskano informacji dotyczących charakterystyki surowców otrzymanych z roślin transgenicznych lnu z nadekspresją jakiegokolwiek genu PR.

W rozdziale „**materiały i metody**”, na 15 stronach zapisano: użyte w badaniach zestawy odczynników, a także sprzęt. Ponadto opisano pożywki do hodowli bakterii, grzybów, roślin i oligonukleotydy użyte do reakcji PCR, startery do namnażania genu aktywny, startery dla genów metabolizmu pektyn, hemicelulozy, celulozy, lignin oraz startery dla genów syntezy kalozy i genów PR, poliamin. W następnym podrozdziale scharakteryzowano typy roślin lnu użyte w badaniach oraz konstrukt stosowany do wytworzenia roślin transgenicznych z nadekspresją β -1,3-glukanazy.

Po analizie Western blot, do dalszych badań w kulturach in vitro wybrano trzy linie transgeniczne: B10, B11 i B14 charakteryzujące się podwyższoną odpornością na porażenie przez *F. oxysporum* i *F. culmorum* oraz znacznie obniżoną zawartością cukrów prostych, kwasów tłuszczowych i kwasów organicznych, jak również podwyższonym poziomem wybranych aminokwasów, poliamin i antyoksydantów. Wykonano także analizy włókna i paździerzy lnianych dla linii B14, ponieważ w uprawie polowej charakteryzowała się ona najlepszą produktywnością w porównaniu do linii B10 i B11.

Następne podrozdziały dotyczyły przygotowania materiału roślinnego oraz kultur patogenów użytych do inokulacji „metodą grzybniową”. Dalej opisano przygotowanie włókien i paździerzy lnianych. Włókna i paździerze otrzymano z czwartego pokolenia transgenicznego lnu linii B14 oraz lnu odmiany *Nike*.

Przedstawiono także metody:

izolację całkowitego RNA z materiału roślinnego i elektroforezę RNA, syntezę cDNA na matrycy RNA, reakcje PCR i elektroforezę DNA w żelu agarozowym.

Następny etap to:

izolacja fragmentów DNA z żelu agarozowego, klonowanie produktów PCR, izolacja plazmidowego DNA, trawienie plazmidowego DNA, reakcja PCR w czasie rzeczywistym. Przedstawiono także metody: izolacji i frakcjonowania polisacharydów ściany komórkowej, oznaczania zawartości kwasów uronowych, oznaczenia zawartości cukrów całkowitych metodą fenolową.

Zidentyfikowano i oznaczano zawartość monosacharydów metodą ultrasprawną chromatografii cieczowej (UPLC), zawartości pektyn całkowitych i hemicelulozy całkowitej, zawartości celulozy, lignin, kalozy, poliamin i związków fenolowych metodą (UPLC). Przygotowano również poszczególne frakcje ściany komórkowej lnu do oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej, którą wyliczono wg wzoru:

$$\% \text{ hamowania} = 1 - A_{\text{próby}515\text{nm}} / A_{\text{kontroli}515\text{nm}} \times 100$$

Tym samym sposobem oznaczono aktywność antyoksydacyjną związków fenolowych lnu. Ponadto przy wykorzystaniu metody spektroskopii w podczerwieni wykonano analizy struktury i składu polimerów ściany komórkowej. Zanalizowano także mechaniczne właściwości włókna lnianego.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta. Wyliczono również średnie wartości odchylenia standardowego.

W rozdziale „**Wyniki**” chronologicznie przedstawiono wszystkie elementy, które zostały wcześniej opisane w materiałach i metodach.

Najważniejszymi nowatorskimi osiągnięciami tej części pracy są:

1).

Identyfikacja i weryfikacja wybranych genów metabolizmu polimerów ściany komórkowej w lnie. Wyselekcjonowano kilkadziesiąt najważniejszych genów uczestniczących w syntezie i degradacji pektyn, hemicelulozy, celulozy, lignin i poliamin. **Ze względu na niedostępność sekwencji nukleotydowej genomu lnianego doktorantka dokonała identyfikacji częściowych fragmentów mRNA wybranych genów, które zidentyfikowała i zweryfikowała samodzielnie.**

2).

Analizy ekspresji genów PR w siewkach lnu po infekcji patogennym szczepem *F. oxysporum* i *F. culmorum*, wykazano w większości wzrost w czasie dla β -1,3 glukanazy 1 i 2 oraz chitynazy. **Autorskie wyniki informujące o włączeniu systemu odporności na patogeny w lnie.**

3). **Nowatorskie wyniki analiz ekspresji genów syntezy i degradacji celulozy (oraz 5 izoform syntazy celulozy i 2 izoform celulazy) w lnie inkulowanym patogennym szczepem *F. oxysporum* i *F. culmorum* przez 48 godzin.**

4).

Analizy ilości hemicelulozy charakteryzowana przez ilość cukrów prostych i całkowitych kwasów uronowych i ich zawartość w kolejnych frakcjach hemicelulozowych ściany komórkowej. Autorka dla inokulowanych lnu *F. oxysporum* nie odnotowała znaczących różnic wzrostu tych związków w przeciwieństwie do porażenia powodowanego przez *F. culmorum*, gdzie odnotowano wzrost kwasów uronowych.

5).

Nowatorskie wyniki analiz zawartości pektyn w siewkach lnu po inokulacji *F. oxysporum* i *F. culmorum*.

6).

Oryginalne wyniki ekspresji genów metabolizmu lignin (amoniakolizy fenyloalaniny; PAL, ligazy 4-hydroksycynamoilo: CoA; 4CL, syntazy chalkonu; CHS, transferazy *p*-hydroksy-cynamoiloCoA: kwas szikimowy/chinonowy; HCT, O-metylotransferazy kawoiloCoA; CCOACMT, 3/5-O-metylotransferazy kwasu kawowego/kwasu 5-hydroksyfenolowego; COMT, dehydrogenazy alkoholu synapinowego; SAD, dehydrogenazy alkoholu hydroksycynamonowego; CAD i transferazy glukozy; GT) w siewkach lnu inkubowanych przez 48 godzin z patogennym *F. oxysporum* i *F. culmorum*, gdzie w większości przypadków odnotowano wzrost powyższych metabolitów.

7).

Analizy zawartości lignin wykazały obniżenie ich poziom po inokulacji lnu *F. oxysporum* oraz wzrost po inokulacji szczepem *F. culmorum*.

8).

Oryginalne wyniki ekspresji genów metabolizmu poliamin (dekarboksylazy argininy; ADC, iminohydrolazy agmatyny; AIH, amidazy N-karbamoyloputrescyny; NCPAH, arginazy; ARG, dekarboksylazy ornityny; ODC, syntazy spermidyny; SPDS, syntazy sperminy; SPS) oraz **nieznacznie zmienioną ilość mRNA genów degradacji poliamin** (oksydazy poliaminowej; PAO i oksydazy diaminowej; DAO).

9).

Autorskie wyniki dotyczące zawartość poliamin w badanych siewkach lnu inokulowanych patogenami. Stwierdzono znaczący wzrost zawartości poliamin całkowitych po 48 godzinnym traktowaniu patogennym szczepem *F. oxysporum* i *F. culmorum*. w porównaniu z siewkami kontrolnymi. **Podział poliamin na trzy frakcje: poliaminy wolne, poliaminy skoniugowane z kwasami fenolowymi i poliaminy związane ze ścianą komórkową** uwidoczniły największy wzrost zawartości poliamin związanych ze ścianą komórkową.

10).

Znaczącym osiągnięciem przedstawionej do recenzji pracy są wyniki dotyczące analiz spektroskopii w podczerwieni ściany komórkowej lnu po inokulacji *F. oxysporum* i *F. culmorum*. Analizując widma spektroskopii w podczerwieni infekowanych i nieinfekowanych siewek lnu określono zmiany w zawartości celulozy, pektyn i lignin oraz zmiany w strukturze celulozy i stwierdzono większą ilość wiązań wodorowych w porównaniu do siewek nieinfekowanych.

Poniżej przedstawiono najważniejsze oryginalne osiągnięcia związane z użyciem transgenicznego lnu z nadekspresją β -1,3-glukanazy typu B.

11).

W lnie typu B zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost poziomu mRNA β -1,3-glukanazy 1 w linii B14 oraz obniżenie poziomów mRNA do 72% w linii B10 i do 87% w linii B11. Ekspresja genu β -1,3-glukanazy 2 nie uległa zmianie we wszystkich analizowanych liniach. Odnotowano 8,6-krotny wzrost poziomu transkryptu chitynazy w linii B14 oraz mniejszy wzrost w linii B11 oraz spadek do 60% w linii B10. Ekspresja 4 izoform genów syntazy kalozy nie zmieniła się w liniach lnu typu B, jedynie w przypadku ekspresji syntazy kalozy 2 odnotowano 1,6-krotny wzrost w linii B14.

12).

W transgenicznym lnie linii B14 stwierdzono zwiększony poziom ekspresji genów syntezy celulozy (1,5-krotny wzrost ekspresji genu syntazy celulozy 1 i 1,7-krotny wzrost ekspresji genu syntazy celulozy 3) oraz genu degradacji celulozy (2,15-krotny wzrost celulazy 1).

13).

Transgeniczna linia B11 charakteryzuje się 50% wzrostem zawartości celulozy, B14 70% wzrostem zawartości celulozy, podczas gdy dla B10 nie zaobserwowano znaczących zmian w poziomie celulozy w porównaniu z kontrolą.

14).

Po analizach poziomu ekspresji genów metabolizmu hemicelulozy w transgenicznym lnie z nadekspresją β -1,3-glukanazy, największą zmienność odnotowano w linii B14, u której zaobserwowano wzrost ekspresji jednego genu syntezy hemicelulozy.

15).

Po badaniach zawartości hemicelulozy w transgenicznym lnie z nadekspresją β -1,3-glukanazy odnotowano wzrost poziomu cukrów prostych oraz około 2-krotny wzrost zawartości całkowitych kwasów uronowych.

16).

Po analizach ekspresji genów metabolizmu pektyn w transgenicznym lnie z nadekspresją β -1,3-glukanazy najwięcej zmian w poziomach mRNA badanych genów zaobserwowano w linii B14 z nadekspresją β -1,3-glukanazy. Spośród genów uczestniczących w syntezie pektyn poziom ekspresji 4 epimerazy UDP-D glukuronianu wzrósł 1,2-krotnie, transferazy ksylozy ramnogalakturonianu II wzrósł 1,4-krotnie, transferazy arabinozy wzrósł 1,3-krotnie i metylotransferazy pektynowej wzrósł 1,75-krotnie. Większy wzrost poziomu mRNA zaobserwowano dla większości genów degradacji pektyny.

17).

Przebadano poziom całkowitych kwasów uronowych pektyn stanowiący sumę ilości trzech frakcji pektynowych (WSF, CSF i NSF). Nie uległ on zmianie w liniach B10 i B14 transgenicznego lnu, jedynie w linii B11 zaobserwowano 30% spadek ilości kwasów uronowych.

18).

Analizowano poziom ekspresji genów metabolizmu lignin w transgenicznym lnie z nadekspresją β -1,3-glukanazy i wykazano wzrost ekspresji wszystkich badanych genów w linii B14.

Pomimo znaczącego wzrostu ekspresji badanych genów w linii B14, zawartość lignin w tej linii nie zmieniła się.

19).

Po badaniach ekspresji genów metabolizmu poliamin w transgenicznym lnie z nadekspresją β -1,3-glukanazy tylko transgeniczna linia B14 charakteryzowała się większym wzrostem ekspresji genów degradacji poliamin oraz mniejszym wzrostem ekspresji genów syntezy poliamin.

Z kolei całkowita zawartość poliamin nie różniła się znacząco pomiędzy zbadanymi liniami lnu typu B a roślinami kontrolnymi.

W dalszej części recenzji przedstawiono najważniejsze oryginalne osiągnięcia związane z użyciem transgenicznego lnu z nadekspresją β -1,3-glukanazy typu B jako surowca.

20)

Dużym osiągnięciem pracy jest wskazanie, że włókno otrzymane z transgenicznego lnu linii B14 charakteryzowało się: niezmiennymi parametrami mechanicznymi, mniejszą zawartością lignin oraz większą zawartością pektyn i hemicelulozy, obniżonym poziomem kalozy, rearanżacją struktury pektyn, hemicelulozy i celulozy, wzrostem zawartości związków fenolowych ściany komórkowej oraz zwiększonym potencjałem antyoksydacyjnym frakcji hemicelulozowych.

21)

Kontynuując powyższe zagadnienia wykazano, że paździerze uzyskane po wydzieleniu włókna ze słomy z transgenicznego lnu linii B14 charakteryzowały się: zwiększoną zawartością lignin, pektyn i hemicelulozy, obniżonym poziomem kalozy, rearanżacją struktury pektyn, hemicelulozy i celulozy; obniżonym poziomem zawartości związków fenolowych, spadkiem potencjału antyoksydacyjnego frakcji hemicelulozowych i frakcji wodnej pektyn.

Wszystkie otrzymane wyniki zostały precyzyjnie i logicznie zapisane, posiadają charakter oryginalny i stanowią bardzo bogate źródło wiedzy na temat roli genów oraz metabolitów ściany komórkowej uczestniczących w odpowiedzi lnu na fuzariozę.

Dyskusję wyników przeprowadzono wzorcowo zapisując ją na 13 stronach. Zinterpretowano poprawnie, bardzo szczegółowo, wszystkie elementy empiryczne pracy badawczej. Na podkreślenie zasługuje fakt precyzyjnie dobranej i umiejętnie wkomponowanej w tekst najnowszej literatury.

W pracy zrezygnowano z tradycyjnego zapisu wniosków, zastępując go rozdziałem „Podsumowanie”, w którym przedstawiono 3 zagadnienia:

1). Wykazano znaczący udział polimerów ściany komórkowej w lnie w odpowiedzi na infekcje patogennymi szczepami *F. oxysporum* i *F. culmorum*.

2). Zweryfikowano poglądy dotyczące znaczenia polimerów ściany komórkowej w odpowiedzi roślin na infekcje powodowane przez patogeny stosując w badaniach analizę transgenicznego lnu z nadekspresją β -1,3-glukanazy.

3) Scharakteryzowano surowce: włókno, paździerz, transgenicznego lnu z nadekspresją genu β -1,3-glukanazy.

Literatura rozprawy doktorskiej zapisana w sposób idealny obejmuje 290 pozycji, publikacji anglojęzycznych bezpośrednio związanych z pracą. Do dysertacji doktorskiej dołączono wykaz stosowanych skrótów oraz załącznik, w którym przedstawiono: Zidentyfikowane – autorskie fragmenty cDNA genów uczestniczących w metabolizmie polimerów ściany komórkowej w lnie (*Linum usitatissimum* L. cv. Nike).

Przy tak obszernej pracy, o czym wspomniano na początku, trudno o uniknięcie błędów, których oprócz przekłamań literowych i interpunkcyjnych było i tak bardzo mało. Niektóre z nich, zwłaszcza merytoryczne i redakcyjne przedstawiam:

- **Str. 3.** Zapis cyt. *Dziękuję dr Magdalenie Żuk, mgr Aleksandrze Bobie za pomoc w rozwiązywaniu problemów naukowych, mgr Justynie Mierziak i mgr Katarzynie Namysł za miłą atmosferę, możliwość przekazania im swojej wiedzy oraz wsparcie.* (powinno być: *mi swojej wiedzy oraz wsparcia*)
- **Str. 8.** Zapis cyt. 4.1.2. Analiza fenotypowa siewek lnu inkubowanych przez 48 godzin z patogennym szczepem *Fusarium oxysporum*... (powinno być: *inokulowanych*)
- **Str. 12.** Zapis cyt. MS *medium* Murashige i Skoog (powinno być: *pożywka*)
- **Str. 15.** Zapis cyt. Len (*Linum usitatissimum*) od dawna ceniony jako źródło wartościowych surowców,... (powinno być: (*Linum usitatissimum* L.))
- **Str. 15.** Zapis cyt. **Styl.** Oba typy fuzariozy obniżają uzyskany plon oraz jakość otrzymanych surowców. (powinno być: *Oba typy fuzariozy wpływają na obniżenie plonu oraz jakość otrzymanych surowców.*)
- **Str. 20.** Zapis cyt. After *F.culmorum* infection in flax,(powinno być: *F. culmorum* infection in flax,) Tego typu zły zapis, bez spacji jest w bardzo wielu miejscach „rozprawy doktorskiej”, np. na str. 173 występuje aż o 19 razy proszę to poprawić.
- **Str. 27.** Zapis cyt. Len zwyczajny (*Linum usitatissimum*) jest znaną i cenioną od wieków rośliną uprawną,(powinno być: (*Linum usitatissimum* L.))
- **Str. 29.** Zapis cyt. Podczas procesu infekcji patogeny wydzielają enzymy degradujące ścianę komórkową roślin oraz różnego typu elicitory. (powinno być: *Podczas procesu infekcji patogeny wydzielają enzymy degradujące ścianę komórkową roślin oraz wydzielają różnego typu elicitory.*)
- **Str. 30.** Zapis cyt. ODPORNOŚĆ „GEN **ZA** GEN” (powinno być: ODPORNOŚĆ „GEN **NA** GEN” w całej pracy w wielu miejscach stosowano zły zapis)
- **Str. 31.** Zapis cyt. **Zły zapis.** Przykładem mogą być grzybowe choroby ziemniaka tj.: rdza żdźbłowa (Song i wsp. 2003). (powinno być: *Przykładem mogą być grzybowe choroby ziemniaka tj.: zaraza ziemniaka-Phytophthora infestans* (Song i wsp. 2003)

- **Str. 32.** Zapis cyt. Klasyczny mechanizm „gen na gen” opiera się na interakcji produktu genu odporności roślin (R) oraz produktu patogenicznego genu awirulencji (Avr)....
(powinno być: proponuję w tym miejscu dołączyć tabelę:

Interakcja odporności roślin i wirulencji patogenów (wg Flor H. H. 1971)

- Najczęściej u roślin występują **dominujące geny odporności** na patogeny: „R”
- U roślin występują także **recesywne geny** odpowiedzialne za brak odporności: „r”
- U patogenów najczęściej występują **dominujące geny awirulencji** (patotypy **słabo** atakujące): „avir A”
- U patogenów mniej licznie występują **recesywne geny wirulencji** (patotypy **silnie** atakujące): „vir a”

Roślina	R	r
avir A	R- avir A (całkowicie odporne rośliny)	r- avir A (średnio odporne rośliny)
vir a	R- vir a (średnio odporne rośliny)	r- vir a (totalnie porażone rośliny)

- **Str. 48.** Zapis cyt. U dwuliściennych np. *Arabidopsis thaliana* zawartość celulozy w suchej masie wynosi od 15% w liściach do 33% w ścianach łądyg, natomiast u jednoliściennych traw jej zawartość mieści się w granicach 6-10% w liściach i 20-40% w łądygach (powinno być: U **roślin** dwuliściennych np. *Arabidopsis thaliana* zawartość celulozy w suchej masie wynosi od 15% w liściach do 33% w ścianach łądyg, natomiast u **roślin** jednoliściennych traw jej zawartość mieści się w granicach 6-10% w liściach i 20-40% w łądygach)
 - **Str. 52.** Zapis cyt. Dominują one wśród niecelulozowych polisacharydów wtórnej ściany komórkowej u dwuliściennych. (powinno być: Dominują one wśród niecelulozowych polisacharydów wtórnej ściany komórkowej u **roślin** dwuliściennych.)
 - **Str. 66** Zapis cyt. Podobną zależność obserwuje się u *A.thaliana*, gdzie wiązki naczyniowe komórek naczyń zawierają ligniny G,... (powinno być: Podobną zależność obserwuje się u *A. thaliana*, gdzie wiązki naczyniowe komórek naczyń zawierają ligniny G,...)
 - **Str. 73.** Zapis cyt. (Divon i Fluhr **2007**) **Spadek** (powinno być: (Divon i Fluhr **2007**). **Spadek**) brak kropki.
 - **Str. 75.** Zapis cyt. Jednak obecnie prawie wogóle nie stosuje się tej metody.... (powinno być: Jednak obecnie prawie **w ogóle** nie stosuje się tej metody....)
- Str. 82. i 83.** Zapis cyt. 3.1.4. Media hodowlane 3.1.4.1. Media bakteryjne (powinno być: 3.1.4. **Pożywki** hodowlane 3.1.4.1. **Pożywki** bakteryjne) Proszę wszędzie gdzie zapisano „Media” zmienić na „pożywki”.
- **Str. 83.** Zapis cyt. Szczepy patogenne: *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum* uzyskano z Instytutu(powinno być: Szczepy patogenne: *Fusarium oxysporum* i *Fusarium culmorum* **otrzymano** z Instytutu...)

- **Str. 85.** Zapis cyt. Badania przeprowadzano na włóknistej odmianie lnu (*Linum usitatissimum* L. cv. Nike), która została wyhodowana w Instytucie Włókien Naturalnych w Poznaniu i zarejestrowana w 1987 r. oraz (powinno być: Badania przeprowadzano na włóknistej odmianie lnu (*Linum usitatissimum* L. cv. Nike), która została wyhodowana w Instytucie Włókien Naturalnych w Poznaniu i zarejestrowana w **COBORU** w 1987 r. oraz...)
- **Str. 128.** Zapis cyt. Siewki inkubowane z *F.culmorum* charakteryzowały się o 10% większą ilością wiązań wodorowych w porównaniu do siewek nieinfekowanych. (powinno być: Siewki inokulowane z **F. culmorum** charakteryzowały się o 10% większą ilością wiązań wodorowych w porównaniu do siewek nieinfekowanych.)
- Str. 129. Zapis cyt. ten sam wykres „A” został przedstawiony na str. 112 (powinno być: proszę w przyszłości nie powtarzać wyników)
- Str. 167. Zapis cyt. Len (*Linum usitatissimum*) jest jedną z nielicznych roślin, z których pozyskuje się dwójakiego rodzaju surowce: włókno i olej. Obecnie są uprawiane dwa typu lnu: len włóknisty (np.: *Linum usitatissimum* sp. Nike), charakteryzujący się długą, nierozgałęzioną łodygą, z którego pozyskuje się włókno oraz len oleisty (np.: *Linum usitatissimum* sp. Linola), (powinno być: **Linum usitatissimum** L. cv. Nike; **Linum usitatissimum** L. cv. Linola), w dalszej części pracy proszę ten zapis poprawić.
- Str. 183. Zapis cyt. (*Zizania aquatica* L.) (powinno być: (**Zizania aquatica** L.))
- Str. 188. Zapis cyt. **A Review on the vanillin** (powinno być: **A review on the vanillin**)
- Str. 193. Zapis cyt. van den Oever (powinno być: **Van** den Oever), pierwszy zapis z dużej litery np. **Van** Loon (następna pozycja).

Wnioski końcowe

Jak przedstawiono powyżej ilość, jak i jakość błędów w żaden sposób nie może mieć wpływu na ostateczną ocenę całej pracy, która jest bardzo dobra i swoim rozmachem badawczym przewyższa dotychczas znane opracowania.

Oryginalność, wiedza teoretyczna, samodzielność i umiejętności wykonawcze doktorantki, wskazują na jej dużą dojrzałość naukową. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska z dołączoną dokumentacją dorobku naukowego: tytułów projektów badawczych, publikacji, zgłoszeń patentowych, udziału w konferencjach naukowych, a także z dołączoną dokumentacją raportu „Systemu Antyplagiatowego” uzasadnia nadanie stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia. Powyższa ocena w pełni odpowiada wymogom stawianym przez USTAWĘ z dnia 18 marca 2011 r., Art. 13. 1., o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Ponadto za wybitne opracowanie przez Panią mgr Wioletę Wojtasik rozprawy doktorskiej, która w pełni spełnia warunki nowatorstwa, wychodząc naprzeciw oczekiwaniom genetyki molekularnej oraz fitopatologii, stawiam wniosek do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o jej wyróżnienie.


dr hab. inż. Michał Starzycki Prof. nw. IHAR PIB