

Prof. dr hab. Anna Mięka
Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie
ul. Prawdziwka 2
02-973 Warszawa

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Justyny Mierziak-Dereckiej
pt. „Znaczenie genu kodującego beta-ketotiolazę dla metabolizmu lnu”

Wprowadzenie

Przedstawiona rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Biochemii Genetycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego oraz promotora pomocniczego dr hab. Anny Kulmy. Zespół ten od wielu lat prowadzi wieloaspektowe badania nad *Linum usitatissimum*, zmierzające do poznania składu i struktury włókna lnianego, zidentyfikowania enzymów i genów zaangażowanych w proces jego biosyntezy, jak również udoskonalania i poszukiwania dla niego nowych zastosowań. Jednym z efektów tych badań jest uzyskanie transgenicznego lnu z nadprodukcją polihydroksymaślanu. Polimer ten, naturalnie produkowany przez bakterie, dzięki zdolności do biodegradacji znajduje zastosowanie w produkcji implantów, biomateriałów oraz tworzyw sztucznych. Zmiany w metabolizmie lnu uzyskane w wyniku modyfikacji przyczyniły się do podniesienia wytrzymałości włókna lnianego, a wyprodukowane z niego materiały biomedyczne wykazują korzystniejsze właściwości prozdrowotne.

Tematyka przedstawionej dysertacji wpisuje się w nakreślony nurt badań Zespołu. Doktorantka podjęła się zadania określenia zawartości i funkcji beta-hydroksymaślanu (monomeru polihydroksymaślanu), w aktywności którego upatruje podstawy zmian w metabolizmie lnu prowadzących do poprawienia jego właściwości. Biorąc pod uwagę fakt, że w dotychczasowej literaturze nie ma informacji na temat roli tego metabolitu w komórkach roślinnych podjęta tematyka jest trudna, ambitna i jednocześnie ważna z punktu widzenia poznawczego i praktycznego.

Dane formalne

Rozprawa doktorska została napisana w klasycznym układzie zawierającym wszystkie wymagane elementy. Liczy 165 stron plus 6-stronicowy załącznik, na który składa się 6 wykresów, rysunek i tabela. Zasadnicza część pracy jest poprzedzona streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz wykazami używanych skrótów, zamieszczonych rysunków, tabel i wykresów. Proporcje ilościowe pomiędzy rozdziałami dedykowanymi przeglądowi literatury (25 stron), celowi pracy (2 strony), metodyce (19 stron), wynikom (74 strony) i dyskusji (9 stron) są utrzymane z przewagą części poświęconej wynikom. W tekst wkomponowano 42 wykresy i 11 rysunków (niejednokrotnie podzielonych na panele) oraz 4 tabele. Całość pracy zamyka obszerne zestawienie cytowanej literatury, na które składają się 342 pozycje. Wśród nich 4 są zduplikowane. Spośród zacytowanych 338 prac jedynie dwie są polskojęzyczne. Na podkreślenie zasługuje fakt, że 175 pozycji (52%) pochodzi z ostatniej dekady.

Badania zostały zrealizowane w ramach grantu badawczego nr 2012/06/A/NZ1/00006 finansowanego przez Narodowego Centrum Nauki oraz trzech grantów wewnętrznych Wydziału Biotechnologii UWr.

Ocena merytoryczna

We wstępie Doktorantka krótko przybliżyła właściwości lnu włóknistego i oleistego, wskazując na zasadnicze różnice pomiędzy tymi dwiema odmianami. Następnie skupiła się na szczegółowym omówieniu tiolaz pokazując ich zaangażowanie u roślin w beta-oksydację kwasów tłuszczowych, szlak biosyntezy związków benzenoidowych i powiązanie ze szlakiem fenylopropanoidowym, a u bakterii w syntezę polihydroksymaślanu (PHB). Przeanalizowała metabolizm acetylo-CoA u roślin oraz lokalizację tiolaz w komórkach roślinnych i zwierzęcych, sygnalizując ograniczoność informacji w przypadku tych pierwszych. Przybliżyła wiedzę na temat struktury beta-ketotiolaz, genów kodujących te białka oraz odpowiedzi tkanek roślinnych śledzonych z wykorzystaniem mutantów. Krótko opisała historię wyprowadzenia transgenicznego lnu z nadprodukcją polihydroksymaślanu, wpływ tej modyfikacji na metabolizm fenylopropanoidów, cukrów i kwasów tłuszczowych oraz właściwości lecznicze tkanin wytworzonych z włókien lnianych bogatych w ten polimer. Następnie Doktorantka, w oparciu o literaturę dotyczącą zwierząt i ludzi, scharakteryzowała właściwości, występowanie i znaczenie beta-hydroksymaślanu oraz drogę jego biosyntezy w komórkach zwierzęcych i bakteryjnych. Wspomniała też o metodach produkcji tego związku na skalę przemysłową. Z przeglądu literatury wynika, że beta-hydroksymaślan podnosi poziom acetylacji histonów, przez co powoduje zmiany w strukturze chromatyny i ekspresji genów. Może modulować kaskady sygnałowe zaangażowane we wzrost komórki, proliferację i obronę przed stresem oksydacyjnym. Zdaniem Doktorantki, to właśnie aktywność tego metabolitu, który wydaje się pełnić ważną funkcję regulatorową, może być podstawą prozdrowotnych właściwości transgenicznego lnu.

W dalszej części wstępu Doktorantka omówiła modyfikacje epigenetyczne i ich rolę we wzroście i rozwoju roślin, w tym metylację i demetylację DNA oraz potranslacyjne modyfikacje histonów. Wskazała powiązania pomiędzy deacetylazami histonowymi i genami w odpowiedzi roślin na stres abiotyczny i biotyczny oraz w trakcie różnych etapów rozwoju rośliny. Scharakteryzowała szlaki związków fenylopropanoidowych tj. lignin, lignanów, flawonoidów i benzenoidów. Ostatnią część wstępu Doktorantka poświęciła krótkiemu omówieniu techniki OLIGO, którą wykorzystywała w pracy do otrzymania roślin z nadekspresją beta-ketotiolazy.

Wstęp jest napisany w zwarty i logiczny sposób, dzięki czemu doskonale wprowadza czytelnika w temat pracy oraz zakres problemów, które są w niej rozwiązywane.

W oparciu o poznaną literaturę i efekty badań uzyskanych przez poprzedników Doktorantka założyła, że kluczowym enzymem w syntezie polihydroksymaślanu i jego monomeru beta-hydroksymaślanu jest beta-ketotiolaza, a rośliny z nadekspresją genu kodującego ten enzym będą odpowiednim materiałem badawczym do określenia funkcji tego monomeru u roślin. Hipoteza, cel pracy i zadania badawcze zostały jasno sformułowane. Biorąc pod uwagę wartość jaką wnoszą len z nadprodukcją polihydroksymaślanu do medycyny i gospodarki, jak również brak informacji o regulacji procesu jego syntezy w roślinach, podjęcie badań nad określeniem zawartości beta-hydroksymaślanu w lnie i potencjalnej jego funkcji w komórkach roślinnych należy uznać za zasadne. Dla osiągnięcia celu Doktorantka wyznaczyła 4 zadania szczegółowe, w których założyła przeanalizowanie: 1) zawartości beta-hydroksymaślanu w roślinach lnu; 2) zmian w ekspresji genów zaangażowanych w modyfikację chromatyny; 3) wpływu ekspresji genu kodującego beta-ketotiolazę i nadprodukcji beta-hydroksymaślanu na metabolizm i wzrost roślin; 4) jakości surowca uzyskiwanego ze zmodyfikowanych roślin. Do realizacji tych zadań wykorzystywała szeroką gamę narzędzi biologii molekularnej, fitochemii, biochemii, mikrobiologii i krystalografii.

Rozdział Materiał i Metody Doktorantka rozpoczęła zestawieniem użytych do badań odczynników, sprzętu i aparatury (na liście nie znajdują autoklawu i komory laminarnej),

warunków kultury oraz pożywek. Wymieniła 5 szczepów bakteryjnych i określiła ich pochodzenie. W dalszej pracy nie znajdują jednak informacji o użyciu do badań szczepu *Escherichia coli* DH5a. Dalej przedstawiła sekwencje 42 starterów zastosowanych w reakcjach PCR i opisała materiał roślinny będący podstawą prowadzonych eksperymentów. Następnie w 33 punktach zostały opisane metody i techniki analityczne wykorzystane w pracy. Brak „bloków tematycznych”, grupujących użyte w pracy metody i narzędzia badawcze utrudnia sprawne poruszanie się w tej części pracy. **W rozdziale tym brakuje 1) metodyki procedury roszczenia słomy dla pozyskiwania włókna lnianego, 2) metodyki prowadzenia badań z wykorzystaniem rentgenografii strukturalnej, 3) informacji o zastosowanych analizach statystycznych, wielkości prób i liczbie powtórzeń. Proszę o ich przedstawienie.**

W badaniach Doktorantka wykorzystwała len włóknisty odmiany Nike, który modyfikowała za pomocą agrottransformacji lub techniki OLIGO w kierunku uzyskania roślin z nadprodukcją beta-hydroksymaślanu. Linie roślin uzyskane drogą agrottransformacji są dwójakiego pochodzenia: 1) rośliny pokolenia T3 (**niepoprawnie F3**) oznaczone symbolem C (otrzymane do badań) oraz 2) linie T0 (**niepoprawnie F0**) transformowane samodzielnie przez Doktorantkę oznaczone symbolem H. Obiektem badań była zielona tkanka (łodygi i liście) 5-tygodniowych roślin pochodzących z kultury *in vitro* lub uprawy polowej, oraz nasiona, słoma i włókno lniane. W zielonej tkance roślin z kultur określano ekspresję genów, oceniano zawartość związków fenylopropanoidowych i metabolitów pierwszorzędowych, zaś w roślinach polowych oceniano zawartość związków fenylopropanoidowych.

W rozdziale Wyniki, w pierwszej kolejności zidentyfikowano sekwencje kodujące lniane beta-ketotiolazy, a otrzymane transkrypty zdefiniowano jako acetylo-CoA acylotransferazy 1. Następnie przeprowadzono serię analiz pokazujących, że traktowanie egzogennym beta-hydroksymaślanem podnosi w roślinach kontrolnych ekspresję genu kodującego lnianą beta-ketotiolazę, zmienia profile ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w modyfikacje epigenetyczne i związki szlaku fenylopropanoidowego, oraz istotnie modyfikuje zawartość 6 spośród 7-miu badanych związków fenylopropanoidowych. Odpowiedź zależała od stężenia zastosowanego standardu beta-hydroksymaślanu i czasu traktowania.

W dalszych badaniach poddano analizie rośliny modyfikowane drogą agrottransformacji, w których potwierdzono obecność transgeny i jego ekspresję. Wykazano, że poziom ekspresji wprowadzonego genu kodującego bakteryjną beta-ketotiolazę oraz lnianą beta-ketotiolazę (*Lu_bKAT*) ulega istotnemu podniesieniu w 4 z 6-ciu badanych linii transgenicznych. Nadprodukcja beta-hydroksymaślanu (który jak wykazano jest naturalnie obecny w lnieniu) nie była jednak bezpośrednio skorelowana z nadekspresją genu *Lu_bKAT*. Jego zawartość podniesiono istotnie dzięki transformacji, ale tylko w roślinach polowych, i tylko w tej grupie roślin wzrost zawartości tego monomeru był skorelowany z obniżeniem zawartości acetylo-CoA. Zawartość beta-hydroksymaślanu w roślinach linii C i H oraz kontrolnych utrzymywanych *in vitro* była porównywalna, podobnie jak i zawartość acetylo-CoA będącego substratem reakcji katalizowanej przez beta-ketotiolazę. Następnie Doktorantka prześledziła profile ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w modyfikacje epigenetyczne pokazując często odmienną reakcję w poszczególnych liniach. Wykazała nadekspresję wielu genów związanych z metabolizmem związków fenylopropanoidowych, jednak i w tym przypadku reakcja była silnie zależna od badanej linii. Zmiany w ekspresji genów śledziła wyłącznie w roślinach uzyskanych w kulturze *in vitro*, podczas gdy zawartość związków fenylopropanoidowych określała zarówno w roślinach polowych, jak i otrzymanych *in vitro*. Porównując zawartość kwasu chlorogenowego, *p*-kumarowego oraz ferulowego można zauważyć, że wielokrotnie więcej tych związków występuje w roślinach polowych niż pochodzących z kultury *in vitro*. Ten trend utrzymuje się niezależnie od tego czy rośliny były

poddane modyfikacji genetycznej czy nie. **Interesuje mnie opinia Doktorantki na temat potencjalnych przyczyn wielokrotnie większej zawartości związków fenylopropanoidowych w liniach lnu uprawianego w polu niż *in vitro*. Czy Doktorantka uważa, że ekspresja genów związanych ze szlakiem fenylopropanoidowym w roślinach polowych nie byłaby odmienna od profili obserwowanych w liniach roślin rosnących *in vitro*?** Badania nad zawartością 10 różnych aminokwasów i 3 metabolitów pierwszorzędowych dodatkowo pokazały, że linie T0 charakteryzują się wielokrotnie większym wzrostem zawartości większości tych związków niż rośliny pokolenia T3.

Badania z wykorzystaniem lnu modyfikowanego z użyciem nowoczesnej techniki OLIGO stanowią ciekawe uzupełnienie tej pracy. Rośliny zostały potraktowane 4 roztworami sekwencji oligonukleotydowych, homologicznych do genu kodującego beta-ketotiolazę, zaprojektowanymi przy użyciu specjalnego programu i zsyntetyzowanymi przez zewnętrzną firmę. Wyboru najlepszej sekwencji (OLIGO2) dokonano w oparciu o analizę profili ekspresji genu kodującego lnianą beta-ketotiolazę (odnotowany wzrost ekspresji wynosił 68%). W roślinach traktowanych roztworem OLIGO2, po 24h wykazano nadekspresję 6 z 10-ciu badanych genów metabolizmu szlaku fenylopropanoidowego, zaś po 48h trzech. Mimo istotnych zmian w ekspresji genów nie zaobserwowano różnic w zawartości metabolitów szlaku fenylopropanoidowego.

Elementem, który kończy rozdział Wyniki jest analiza surowców uzyskanych z roślin transgenicznych pokolenia T3. Badania wykazały, że w wyniku wprowadzonej modyfikacji, w słomie i włóknie lnianym zaszły zmiany w zawartości związków fenylopropanoidowych, kwasów tłuszczowych, terpenoidów, lignin, hemiceluloz i cukrów w nich zawartych oraz pektyn. Jednakże, podobnie jak w przypadku wyżej omawianych wyników, trudno jednoznacznie wskazać kierunek zmian w zawartości poszczególnych związków, gdyż wydają się one zależeć od badanej linii. Modyfikacje te doprowadziły do zmian w strukturalnym uporządkowaniu włókien linii transgenicznych oraz do słabszego wiązania łańcuchów celulozowych włókien wiązaniami elektrostatycznymi i siłami van der Waalsa. Warto tu podkreślić, że do udokumentowania zmian w tym zakresie Doktorantka zaangażowała nietypowe metody tj. spektroskopię w podczerwieni (FT-IR) oraz rentgenografię strukturalną. Ostatecznie słoma dwóch z trzech analizowanych linii efektywniej i wydajniej przechodziła proces roszczenia. Sporządzone ekstrakty ze słomy lnianej roślin transgenicznych nie oddziaływały toksycznie na proliferację fibroblastów, a w przypadku jednej z linii wykazano jej antyoksydacyjne i antybakteryjne właściwości.

Każdy podrozdział wyników zawiera krótkie wprowadzenie na początku i podsumowanie na końcu. Całość jest opatrzona 6 krótkimi, trafnymi wnioskami o charakterze ogólnym.

Dyskusja w dużej mierze polega na analizie otrzymanych wyników, w niewielkim stopniu wspartej rezultatami innych autorów. Wynika to z faktu, że badania nad beta-hydroksymaślanem w świecie roślin nie były jak dotąd przedmiotem rozważań. W dyskusji Doktorantka dotyka najważniejszych aspektów badanych w pracy. Podejmuje między innymi próbę wytłumaczenia różnic w zawartości beta-hydroksymaślanu pomiędzy roślinami transgenicznymi pochodzącymi z pola i kultur *in vitro*. **Różnicę tłumaczy ograniczeniem aktywności promotora 14-3-3 w wyniku starzenia się tkanek. Jednakże, biorąc pod uwagę, że analizie poddano rośliny w tym samym wieku (5-tygodniowe) jest to mało prawdopodobne. Czy Doktorantka widzi jakąś inną przyczynę tego stanu? W rozważaniach warto wziąć pod uwagę zróżnicowaną zawartość beta-hydroksymaślanu w roślinach kontrolnych:** te z uprawy polowej zawierają go więcej niż z kultur, zaś w słomie jest go ponad 20 razy więcej.

Ambitnym wyzwaniem jest próba nakreślenia mechanizmu regulacji aktywności biologicznej komórki roślinnej przez beta-hydroksymaślan. Doktorantka sugeruje, że profil ekspresji genów kodujących deacetylazy histonowe jest odmienny od opisanego

w komórkach zwierzęcych oraz, że szlak syntezy tego związku podlega samokontroli. Myślę, że wnioskowanie byłoby bardziej precyzyjne gdyby do tych badań została włączona analiza profili ekspresji genów w zielonej tkance roślin polowych, a badania byłyby skupione na liniach wykazujących zarówno nadekspresję beta-ketotiolazy jak i nadprodukcję beta-hydroksymaślanu.

Uważam, że podjęte przez Doktorantkę w niniejszej rozprawie pionierskie, szeroko zaplanowane i zrealizowane badania, są źródłem obszernej wiedzy, na bazie której można prowadzić dalsze pogłębione doświadczenia nad poznaniem i opisaniem mechanizmu funkcjonowania beta-hydroksymaślanu w komórkach roślinnych. Uzyskane wyniki pokazują złożoność mechanizmów regulujących aktywność komórek roślinnych, które pozwalają roślinom na dostosowanie się do panujących warunków otoczenia.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawianej pracy należy:

- 1) Wykazanie obecności endogennego beta-hydroksymaślanu w roślinach oraz wzmocnienie jego syntezy przez transformację.
- 2) Wykazanie, że zmiana ekspresji genu kodującego beta-ketotiolazę wywiera wielokierunkowy wpływ na metabolizm lnu.
- 3) Wykazanie, że zwiększenie produkcji beta-hydroksymaślanu w trakcie wzrostu roślin skutkuje obniżeniem akumulacji tego związku w słomie lnianej.

Proszę o wyjaśnienie co to są zręby plastydów, na których osadza się poli-hydroksymaślan.

Czy len modyfikowany techniką OLIGO wykazujący nadekspresję beta-ketotiolazy jest zdolny do nadprodukcji beta-hydroksymaślanu?

Ocena strony edytorskiej

W pracy zastosowano niewłaściwą numerację kolejnych podrozdziałów, której porządek uległ zaburzeniu począwszy od punktu 3.3.2. i obejmuje praktycznie cały punkt 3 i 4.

Spis skrótów, których w pracy użyto bardzo dużo, znacząco ułatwia czytanie tekstu. W przedstawionej liście zabrakło jednak wyjaśnienia skrótów: CTR (lub ctr – to powinno być ujednolicone w całej pracy) – skrót kontroli używany na wielu rysunkach i wykresach; CFU, (w tekście i Rysunku 11 użyto tylko skrótu); FNS – syntaza flawonowa; oraz wielu genów (np. *HB*, *SRT*, *GCN*).

W pracy znajdują się nieliczne błędy wynikające z użycia niewłaściwej terminologii:

1. W przypadku roślin nie stosuje się terminu „hodowla in vitro” lecz „kultura in vitro”. Termin „hodowla” jest związany z procesem doskonalenia roślin.
2. Zamiast „Media hodowlane” powinno używać się: „podłoża” lub „pożywki”.
3. Używane w pracy skróty F0 i F3 dla opisu pokolenia roślin otrzymanych w drodze transformacji są niepoprawne. Do oznaczania kolejnych pokoleń transformowanych roślin służy symbol T0, T3.

Poniżej przedstawiam szereg uchybień redakcyjnych, które nie wymagają odpowiedzi:

1. Wykres 42 – brak zgodności opisu z danymi przedstawionymi na wykresie. Do badań użyto 3 stężenia standardu beta-hydroksymaślanu, a nie jedno jak podano w opisie. Skrót beta-hydroksymaślanu użyty na wykresie (HB) i w tekście (bHB) jest inny.
2. Wyniki na wykresach rysunku 11 nie są poddane analizie statystycznej.
3. Str. 79. Opis do panelu A na wykresie 10 jest niekompletny. Dotyczy on badań prowadzonych z wykorzystaniem roślin C i H; oraz linii (wydaje się) C8, C10, i C47, a

- nie jak podano w opisie C10, C43 i C47. Podobne błędy wkradły się do wykresu 11. Dodatkowo w panelu B zamiast linii C8, C10 i C43 powinny być C10, C43 i C47.
4. Opis pod wykresem 14 i 4 jest taki sam.
 5. Niefortunne sformułowania: „wzrost genu” (wielokrotnie używany), „największy poziom wprowadzonego genu wykazała linia ...” (str. 76), czy „Największy wzrost ekspresji lnianej beta-ketotiolazy ...” (str. 77).
 6. Zawartość różnych związków maleje lub ulega obniżeniu, nie spada.
 7. Kiełkują nasiona, nie rośliny (str. 104).
 8. U roślin nie występuje tkanka rozrodcza (str. 21).
 9. W wykazie użytych skrótów dwa razy wymieniono polimerazę Phusion.
 10. W tekście znajdują się nieujednoliczone zapisy nazw np. beta-ketotiolaza i betaketotiolaza; *in-vitro* i *in vitro*; pojawiają się literówki w nazwie bakterii np. *P. sureginosa* (str. 49) *P. aureginosa* (str. 62, 133, 136).
 11. Str. 53. Cytowana praca: Wróbel i wsp. 2014, powinno być Wróbel i wsp. 2004.
 12. Pojawiły się rozbieżności w zapisie frakcji hemiceluloz: K1SF, K4SF (str. 58; i wykres 29) czy 1KSF i 4KSF (str. 113).
 13. Oznaczenia genów na wielu wykresach i w wielu miejscach w tekście nie są napisane kursywą.
 14. Na wykresie 3 i 13 oraz w tekście na str. 68 i 83 błędnie oznaczono nazwę genu (jest *HAC*, powinno być *HAT*)
 15. Na wykresie 25 przesunięciu uległo oznaczenie statystyczne poziomu istotności w zawartości kwasu oleinowego w słomie (linia C10).
 16. W opisie do wykresu 5 użyto dwa razy tego samego skrótu F3H (zamiast F3'H); na wykresie zaś błędnie oznaczono gen *o-metylotransferazy kawoilo-CoA*.
 17. Str. 75. W trzecim akapicie prezentowanych wyników zamieszczono fragment metodyki obecny na stronie 53.
 18. Str. 78. Zgodnie z metodyką ze strony 63 do oznaczenia zawartości beta-hydroksymaślanu wykorzystano 5-tygodniowe rośliny z upraw polowych i kultury *in vitro*. Na stronie 78 jest mowa o użyciu zielonej tkanki z 4-tygodniowych roślin uzyskanych *in vitro*.
 19. Na wykresie 12 użyto nieprawidłowych skrótów genów *HDA6*, *HDA19* i *HDA2*; powinno być *HDAC6*, *HDAC19* i *HD2*.
 20. Str. 84. Omyłkowo wpisano tu pokolenie F1 (zamiast F0) linii H5.
 21. Na niektórych wykresach (np. w obrębie Wykresów 16, 17, 23, 27, 28, 30, 32, 33; Rysunek 11) brakuje opisu osi Y.
 22. Str. 145. 3-HB czy bHB?
 23. W bibliografii sposób przedstawienia tytułów publikacji nie jest ujednolicony. większość małymi z nich pisana jest małymi literami, niektóre wielkimi (np. Shen i in. 2015; Szyjka i in. 2018; Sundaramoorthy i in. 2006; Toshio i Folke 1962; Ueda i in. 2017; itd.), dwa wersalikami (Gebarowski, Gebczak i in. 2017; Gebarowski, Moreira i in. 2017). We wszystkich pozycjach bibliografii nazwy łacińskie gatunków nie są napisane kursywą. Do tytułów publikacji: Bond i in. (2009), Kim i in. (2008), Tian i Chen (2001) wkradły się szeregi nieokreślonych znaków.
 24. W publikacji Houmiel i in. (1999) – nazwa gatunkowa *brassica napus* powinna być napisana wielką literą (*Brassica napus*).
 25. Cztery pozycje z listy bibliograficznej zostały zdublowane, tj. Liu i in. (2014), Luo i in. (2012), Morvan i in. (2003), Servet i in. (2010).

Przytoczone powyżej uwagi nie umniejszają rangi i znaczenia uzyskanych wyników, a ich wskazanie należy do obowiązków recenzenta. Liczba tych uchybień wskazuje, że doktorantka nie poświęciła dość uwagi, by praca od strony edytorskiej była starannie przygotowana.

Wniosek końcowy

Przedstawioną do recenzji pracę oceniam pozytywnie. Doktorantka w pełni zrealizowała założony cel pracy. Zidentyfikowała beta-hydroksymaślan w lninie wykazując przy okazji po raz pierwszy na świecie jego naturalną obecność w komórkach roślinnych. Dzięki transformacji roślin genem bakteryjnym beta-ketotiolazy wzmocniła produkcję tego związku otwierając tym samym nową przestrzeń do poznawania jego roli. Następnie, analizując ekspresję genów zaangażowanych w procesy modyfikacji aktywności chromatyny i regulację wtórnego metabolizmu, wykazała wpływ tego monomeru na zawartość wielu metabolitów i jakość końcową otrzymanego surowca lnianego oraz jego właściwości aplikacyjne. Uzyskane rezultaty wskazują, że beta-hydroksymaślan jest ważnym metabolitem i cząsteczką regulatorową dla komórek roślinnych. Doktorantka w swoich dociekaniach wykazała się szeroką znajomością literatury naukowej obejmującej problematykę badawczą wykraczającą daleko poza świat roślin. Z ogromną dozą dociekliwości naukowej i pracowitości sięgała po kolejne narzędzia badawcze umożliwiające Jej wszechstronne opisanie zmian w badanym materiale roślinnym. Uzyskane rezultaty wnoszą nową wartość poznawczą do biologii eksperymentalnej roślin i mają istotne znaczenie aplikacyjne.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa spełnia wymagane kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14.03.2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789). Wobec powyższego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Justyny Mierziak-Dereckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego prowadzących do nadania stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.



prof. dr hab. Anna Mikula