



Uniwersytet
ŁÓDZKI

Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin

Łódź, 16.05.2015 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner
pt. „*Len transgeniczny, jako źródło udoskonalonego włókna. Manipulacja metabolizmem polimerów ściany komórkowej włókna lnianego*”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr inż. Marty Preisner została wykonana w Zakładzie Biochemii Genetycznej Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego.

Praca liczy 185 stron, 36 wykresów, 6 tabel, 24 rysunki (?) i 1 zdjęcie, bardzo dobrze dokumentujące zagadnienia omawiane w rozprawie (zdecydowanie byłbym za tym by doktorantka uprościła/ujednoliła oznaczenia dokumentacji; wystarczyłby podział na tabele i np. ryciny) oraz 282 pozycje w spisie piśmiennictwa (właściwie dobrane prace doświadczalne i inne artykuły literatury światowej, w zdecydowanej większości opublikowanych w latach 2000-2014, w tym wiele pozycji pochodzących z ostatnich 5 lat). Chciałbym podkreślić, że w spisie piśmiennictwa znalazłem większość prac, które sam zaliczam do tych ważnych dla tematyki poruszanej w rozprawie doktorskiej. Z drugiej strony, rozprawa stała się dla mnie ważnym źródłem piśmiennictwa, które z różnych względów przeoczyłem.

Rozprawa została napisana w języku polskim, w klasycznym układzie i oprócz spisu treści, ilustracji i tabel oraz wykazu stosowanych skrótów zawiera obszerny i bardzo interesujący *Wstęp* teoretyczny, *Cele pracy*, wykorzystywany w pracy *Sprzęt* (?), *Materiał i Metody*, bardzo obszerne *Wyniki*, *Dyskusję*, *Podsumowanie*, *Wnioski*, *Literaturę*, *Załącznik i Curriculum vitae*. Oczywiście nie przeoczyłem umieszczonych na początku pracy streszczeń w języku polskim i angielskim. Układ pracy i jej opracowanie, sposób prezentacji i analizy wyników zrealizowane zostały przez Doktorantkę w sposób wzorowy. Poważnym uchybieniem z mojej strony byłoby nie zwrócenie uwagi na niezwykle bogaty dorobek naukowy Doktorantki (patrz rozdział *Curriculum Vitae*). **Stąd, sprzedając szczegółowe uzasadnienie, chciałbym już teraz wyrazić pogląd, że praca ta w mojej ocenie spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marty Preisner do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

www.uni.lodz.pl

ul. Banacha 12/16, PL - 90-237 Łódź, tel. (48) 042-635-44-23
fax. (48) 042-635-4423, www.biol.uni.lodz.pl, e-mail: ewatom@biol.uni.lodz.pl

Kierownik Katedry: Prof. dr hab. Andrzej K. Kononowicz,
tel. (48) 042-635-44-25, e-mail akononow@biol.uni.lodz.pl

Tematyka i cele pracy

Tematyka i cele pracy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner mieszczą się w jednym z niezwykle ważnych, bardzo aktualnych kierunków współczesnej biologii roślin, do których bez wątpienia należy zaliczyć doskonalenie na drodze genetycznej modyfikacji właściwości najważniejszych roślin uprawnych, w tym tych o znaczeniu przemysłowym. U podstaw nieustającego i stale rosnącego zainteresowania tą tematyką leży z jednej strony ogromny, niespotykany wcześniej rozwój warsztatu badawczego, technik, narzędzi pozostających do dyspozycji naukowców, z drugiej zaś, będące tego konsekwencją, osiągnięcia poznawcze w dziedzinie biochemii, genetyki i biologii molekularnej związane z poznaniem strukturalnej i funkcjonalnej organizacji genomu zarówno roślin wyższych jak i drobnoustrojów. Oczywiście, nadrzędną podstawą zainteresowań naukowców i praktyków tą tematyką jest potrzeba najpierw zidentyfikowania, scharakteryzowania i powiązania w logiczną, współgrającą całość mechanizmów odpowiedzialnych za biosyntezę wybranych metabolitów, a w dalszej perspektywie, docelowo – zaprojektowanie bezpiecznego i efektywnego systemu ich produkcji.

Doktorantka podjęła się bardzo ambitnego zadania. Zgodnie z moją wiedzą, a potwierdziły to także doniesienia medialne, Promotor, Doktorantka i inni członkowie Zespołu szereg lat temu podjęli się po raz pierwszy w Polsce, pomimo wyjątkowo niesprzyjającej, a tworzonej przez przeciwników GMO, atmosfery, zakończonej pełnym sukcesem, konstrukcji genetycznie zmodyfikowanych roślin lnu o udoskonalonych włóknach.

Temat i cel ocenianej pracy doktorskiej mieszczą się, w moim przekonaniu, w bardzo aktualnym i niezwykle ważnym kierunku badawczym w dziedzinie współczesnej biotechnologii molekularnej, dotyczącym modyfikowania metabolizmu roślin oraz uzyskania prototypowych roślin (w tym przypadku lnu) o udoskonalonych pod względem użytkowym i zastosowań włóknach. Mogę, zatem stwierdzić, że temat pracy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner i jednoznacznie sformułowany, kierunkowy cel, spełniają wymagania stawiane obecnie przed autorami ambitnych projektów badawczych w dziedzinie współczesnej biotechnologii molekularnej roślin, w tym projektów dotyczących agrobiotechnologii.

Problematyka badawcza, a w szczególności omawiane w tej rozprawie zagadnienia są doskonałą ilustracją złożoności, wieloaspektowości prac badawczych niezbędnych do precyzyjnego ustalenia istotnych dla całości zagadnienia struktur, ich chemicznej kompozycji, wzajemnych oddziaływań i powiązań. Wiem, że oceniana praca doktorska mgr Marty Preisner stanowi tylko pewien wycinek znacznie szerszych, poważnie zaawansowanych badań prowadzonych pod kierunkiem Prof. dr hab. Jana Szopy-Skórkowskiego – badań unikalnych na skalę krajową pod względem koncepcji metodycznych i rozwiązań technicznych. Wyniki badań zreferowanych w rozprawie stanowią, jak sądzę, uzupełnienie wiedzy zdobytej przez Zespół Profesora Szopy-Skórkowskiego w latach ubiegłych (czego wymiernym efektem są publikacje w renomowanych czasopismach naukowych) oraz kolejny etap poszerzania i pogłębiania wiedzy dotyczącej mechanizmów rządzących metabolizmem roślin.

Wstęp

Wstęp stanowi interesujące kompendium wiedzy dotyczącej zagadnień ściśle związanych z tematyką pracy doktorskiej. W pierwszej części *Wstępu* Autorka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące lnu, jego przetwórstwa a wreszcie głównych patogenów tej rośliny. W kolejnych rozdziałach pracy mgr Preisner szeroko, szczegółowo i fachowo omówiła strukturę, skład i biochemię włókna lnianego, jego składników: celulozy, hemiceluloz, pektyn i lignin. Przy okazji każdego z tych składników Doktorantka omówiła ich budowę, funkcję i metabolizm. Kolejne dwa rozdziały mgr Preisner poświęciła charakterystyce włókien lnianych oraz ich modyfikacjom genetycznym. Szczególnie interesujące wydają mi się właśnie te podrozdziały.

W końcowej części *Wstępu* zabrakło mi, choćby krótkiego, jednego akapitu ogólnie podsumowującego zagadnienia omówione we *Wstępie* a wskazującego na aktualność i znaczenie badań składających się na rozprawę doktorską.

Tym niemniej sądzę, że *Wstęp* mógłby stanowić kanwę dla bardzo interesującego artykułu przeglądowego.

Cel pracy

Nie będę ukrywał, że z mieszanymi uczuciami czytałem rozdział zatytułowany *Cel pracy*. W moim rozumieniu, w tej części rozprawy podane powinny być w formie najbardziej zwięzłej, lakonicznej główne i ewentualnie poboczne cele przeprowadzonych badań. Powtarzam, krótko i zwięźle, bez szczegółowego ich uzasadniania i omawiania. Uzasadnienie dlaczego takie a nie inne są cele pracy powinno wypływać „samo z siebie” we *Wstępie* lub być w tymże *Wstępie*, pod koniec, wyartykułowane. W ujęciu przedstawionym przez Doktorantkę cel pracy okazał się być jej streszczeniem. A wystarczyło w tym rozdziale pozostawić jedynie zdanie (cytuję):

Zamierzonym celem wszystkich modyfikacji była poprawa jakości włókna lnianego i dywersyfikacja jego zastosowania poprzez manipulację ilością/kompozycją polimerów ściany komórkowej (pektyn i lignin).

Praktyczna realizacja tak sformułowanego celu pracy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner wymagała przeprowadzenia bardzo złożonych, trudnych, wieloetapowych, a także żmudnych i czasochłonnych doświadczeń z wykorzystaniem różnorodnych metod i technik biochemicznych i molekularnych.

Nie mam wątpliwości, że wskazane cele pracy doktorskiej należy uznać za ambitne a ich realizacja wymagała od Doktorantki obok opanowania i praktycznego zastosowania szerokiego zestawu metod, intensywnej pracy laboratoryjnej.

Materiały i metody

Ogólnie, nie wnoszę zasadniczych zastrzeżeń do treści tego rozdziału, bowiem większość zastosowanych metod, technik i procedur uważam za odpowiednie, nowoczesne i właściwie dobrane by zapewnić wynikom wiarygodność i umożliwić realizację bardzo ambitnych, dalece wykraczających poza wymagania formalne celów.

Jako materiał roślinny w badaniach wykorzystano genetycznie zmodyfikowane w Zakładzie Biochemii Genetycznej rośliny lnu (*Linum usitatissimum* L. cv. NIKE): rośliny z wyciszonym genem dehydrogenazy alkoholu cynamonowego (CAD) oraz rośliny z nadekspresją poligalakturonazy I lub ramnogalakturonazy A. Posłużyły one Autorce w badaniach molekularnych, biochemicznych, makroskopowych, mikroskopii elektronowej i z zakresu fitopatologii. Z ich hodowlą i właściwym przygotowaniem do eksperymentów wiązała się znajomość technik kultur *in vitro* i upraw polowych.

Jestem pełen uznania dla zakresu przeprowadzonych badań oraz różnorodności stosowanych technik/metod. Fakt ten stanowi o kompleksowości przeprowadzonych badań i wiarygodności uzyskanych wyników.

Wyniki i Dyskusja

Jestem świadom faktu, że w tego rodzaju projektach, mając zróżnicowany materiał badawczy, a jako narzędzia badawcze liczne i zróżnicowane pod względem złożoności techniki cytochemiczne, biochemiczne i molekularne (w tym także inżynieria genetyczna), osiągnięcie celu(ów) przedsięwzięcia uwarunkowane jest nie tylko wiedzą i posiadanym warsztatem badawczym, ale także takim cechemi charakteru jak pracowitość, dyscyplina i swoistego rodzaju pedantyczność, drobiazgowość. Stwierdzone przeze mnie tylko nieliczne błędy czy niedociągnięcia dają jak najlepsze świadectwo o Doktorantce (i Promotorze).

Wyniki pracy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner zostały opisane i udokumentowane na 46 stronach rozprawy. Dokumentację wyników stanowią liczne wykresy, diagramy,

barwne i czarno-białe makro- i mikrofotografie, sekwencje nukleotydów i aminokwasów – nie sposób wymienić wszystkie formy.

Tak obfita dokumentacja jest kolejnym potwierdzeniem ogromu wykonanej przez doktorantkę pracy eksperymentalnej.

W ocenie tego bardzo obszernego rozdziału ograniczę się z jednej strony, do tych rezultatów, które uważam za najważniejsze:

- zidentyfikowano w lnie gen kodujący białka SAD, przynależnego do klasy II rodziny białek o charakterze roślinnych dehydrogenaz alkoholowych;
- zidentyfikowano i wyodrębniono z genomu lnu geny: biosyntezy lignin (*HCT*, *C3H*, *C4H*), metabolizmu sacharozy (*SUS*, *SPS*, *SPP*) oraz regulatorów syntezy ściany komórkowej (*WAK*, *THE*, *FEI*, *PERK1*, *PERK2*, *COBRA1*, *COBRA2*);
- stwierdzono, że redukcja ekspresji genu *CAD* wpłynęła na zmianę ekspresji szeregu genów zaangażowanych w metabolizm polimerów ściany komórkowej;
- zaobserwowano zróżnicowane zmiany w ekspresji genów związanych z demetylacją pektyn;
- stwierdzono wzrost poziomu mRNA genów odpowiedzialnych za degradację pektyn i hemiceluloz (*PL*, *PtL*, *XYLa*, *GS*, *MS*, *GLS*), a dla genu β -1,3-gukanazy zaobserwowano obniżenie ekspresji;
- wykazano, że wprowadzenie do lnu egzogennej poligalakturonazy spowodowało wzrost ekspresji endogennej poligalakturonazy oraz liazy pektynowej a także wzrost ekspresji pektynometylsterazy 1 oraz β -1,3-gukanazy, wybranych genów biosyntezy lignin (*PAL*, *C4H*, *4CL*) oraz celulozy (*CesA3*, *CesA4*, *CesA5*), a także metabolizmu sacharozy (*SPP* i *SPS*) i degradacji hemiceluloz (*XYN*, *GS*);
- przeprowadzona analiza wykazała, że len *CAD27* charakteryzował się opóźnioną i/lub zmniejszoną lignifikacją komórek elementarnych włókna oraz zmianami w anatomicznej budowie łodygi, natomiast nie zanotowano różnic w parametrach fenotypowych (wzrost, masa nasion, ilość nasion w koszycku);
- wykazano, że rośliny linii *CAD27* były bardziej podatne na infekcję *F. oxysporum*, ale wykazały większą odpornością na atak *F. culmorum*;
- w przypadku słomy z roślin *CAD27* nie obserwowano wyraźnego skrócenia czasu rośnięcia podczas gdy dla obu linii ze zmniejszoną ilością pektyn (*PGI11* i *RHA7*) testy rośnięcia wykazały znaczne skrócenie czasu rośnięcia i jego większą efektywność;
- analiza składu i właściwości ściany komórkowej pozwoliła stwierdzić, że włókno z roślin z wyciszonym genem *CAD* charakteryzowało się zmniejszoną zawartością lignin, zwiększoną zawartością celulozy oraz hemiceluloz, przy niezmienionej zawartości pektyn;
- stwierdzono szereg niezwykle interesujących zmian w charakterystyce biochemicznej i metabolicznej włókien badanych genetycznie zmodyfikowanych linii lnu, których tutaj nie będę omawiał a zainteresowane osoby odsyłam do pracy doktorskiej;
- na podstawie analizy spektroskopowej włókien transgenicznych roślin w podczerwieni zaobserwowano zmiany charakteru wzajemnych oddziaływań i przestrzennej organizacji polimerów w ścianie komórkowej.

Jeśli chodzi o ocenę właściwości włókien genetycznie zmodyfikowanych linii lnu pozwolę sobie zacytować podsumowanie zaczerpnięte z rozprawy doktorskiej: *Podsumowując, w przypadku włókna CAD27, mimo redukcji ilości lignin nie uzyskano zwiększenia elastyczności, jednak poprawie uległa wytrzymałość na rozciąganie oraz pozostałe badane właściwości użytkowe włókna. Obniżenie ilości pektyn w lnie (linie *PGI11* oraz *RHA7*) przełożyło się na krótsze i wydajniejsze rośnięcie, oraz pozytywnie wpłynęło na skład i właściwości włókna lnianego. Porównując badane modyfikacje, najefektywniejsze okazało się wprowadzenie do roślin genu kodującego *RHA*. Rośliny i włókno z linii *RHA7* charakteryzowały się zwiększonym plonem nasion i odpornością na infekcje, a zmiany w*

ścianie komórkowej włókna lnianego przekładały się na znaczną poprawę właściwości użytkowych.

Wyniki pracy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner zostały podsumowane w postaci udokumentowanych doświadczalnie, w pełni uprawnionych wniosków końcowych. I znowu pozwolę sobie zacytować fragment rozprawy doktorskiej, w którym w zwięzły i bardzo trafny sposób Doktorantka podsumowała wyniki swoich badań:

W pracy tej potwierdzono, że ściana komórkowa jest strukturą dynamiczną i interaktywną, gdzie zmiany w ilości jednego składnika pociągają za sobą zmiany w ilości pozostałych składników, co przekłada się na sieć zależności genetycznych dotyczących ściany komórkowej. Ponadto, wykazano, że taka modyfikacja powoduje zmiany w składzie i właściwościach surowca lnu – włókna oraz wyraźnie wpływa na jego parametry użytkowe. Zmiany w strukturze ściany komórkowej (indukowane, związane z czynnikami środowiskowymi czy rozwojowymi), a przez to w jej właściwościach mechanicznych są odbierane przez błonę komórkową. Następnie sygnał jest przekazywany do genów, powodując mechanizm kompensacyjny na poziomie transkrypcyjnym i potranslacyjnym, żeby utrzymać prawidłowe parametry funkcjonalne ściany komórkowej. Prowadzi to do rearanżacji ściany komórkowej oraz zmian w ilości i proporcjach poszczególnych składników. Zmiany w zawartości lignin lub pektyn są kompensowane przez zwiększenie się zawartości celulozy, jako głównego składnika odpowiedzialnego za wytrzymałość ściany komórkowej. Ponadto, zmiany te wpływają na ekspresję genów związanych z patogenezą (w szczególności grupy 2 i 3), co koreluje się z podatnością roślin na infekcje patogenne.

Dodatkowo, w pracy tej wykazano, że:

- *redukcja ilości pektyn przez wprowadzenie do lnu genu kodującego liazę ramnogalakturonianu, jako jedyna modyfikacja miała pozytywny wpływ zarówno na fenotyp, w tym plonowanie, odporność na infekcje, jak i na właściwości użytkowe włókna (przede wszystkim mechaniczne, antyoksydacyjne i bakteriostatyczne);*
- *obniżenie całkowitej zawartości pektyn w ścianie komórkowej włókna może pozytywnie wpływać na właściwości mechaniczne tj. wytrzymałość na rozciąganie i poprawić jego parametry użytkowe;*
- *jest możliwe uzyskanie normalnego fenotypu roślin z obniżoną zawartością pektyn/lignin oraz ich efektywna uprawa polowa, która nie odróżnia się agrotechnicznie od uprawy kontrolnej. Umiarkowane obniżenie poziomu lignin bądź pektyn nie wpływa na parametry fenotypowe tj. anatomiczne i morfologiczne roślin w uprawie polowej, jednak prowadzi do zmian w plonowaniu.*

Bardzo interesującą i ważną częścią pracy doktorskiej mgr inż. Marty Preisner jest obszerna, świetnie napisana Dyskusja, zakończona podsumowaniem. Z dużą przyjemnością odnotowałem w tej części pracy odpowiedzialne komentarze na temat jej własnych wyników oraz ich uprawnioną interpretację. Bardzo dobra znajomość przedmiotu oraz biegłość warsztatowa doktorantki, a i, można chyba powiedzieć, erudycja – emanują z tej bardzo wartościowej części pracy.

Podsumowując tę część swojej opinii, pomimo pewnych krytycznych uwag, pozostaję pełen uznania dla ogromu wykonanej przez Panią mgr inż. Martę Preisner pracy, uzyskanych przez Nią wyników i w pełni uprawnionej ich interpretacji.

Końcowe uwagi ogólne

1. Bardzo wysoko pod względem merytorycznym i formalnym oceniam napisany przez mgr inż. Martę Preisner *Wstęp* rozprawy doktorskiej. Uważam, że byłby on, po przeformatowaniu, wartościowym artykułem przeglądowym. Wśród niezbędnych modyfikacji widziałbym krytyczną redukcję, posiadającego już wyłącznie wartość historyczną, piśmiennictwa.
2. Mogę z przyjemnością stwierdzić, że mgr inż. Marta Preisner w czasie realizacji celów pracy doktorskiej opanowała bardzo bogaty, nowoczesny warsztat badawczy,

który jak sądzę umożliwi Jej podjęcie pracy naukowej w wielu laboratoriach biologii molekularnej roślin.

3. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zasługują na najwyższą uwagę badaczy zajmujących się tą tematyką, ich interpretacja jest w pełni uprawniona, a cała rozprawa doktorska zasługuje na duże uznanie.

Na zakończenie chciałbym jeszcze raz powtórzyć: rozprawę doktorską mgr inż. Marty Preisner oceniam jako właściwą pod względem formalnym i bardzo wartościową pod względem merytorycznym, a wymienione przeze mnie w recenzji nieliczne uwagi krytyczne nie mają, z natury swojej, żadnego wpływu na moją ogólnie wysoką jej ocenę.

Wyrażając pogląd, że praca ta spełnia wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marty Preisner do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Chciałbym w tym miejscu wyrazić opinie, że biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy i więcej niż poprawność formalną, o ile spełnione są inne wymogi, praca ta zasługuje na stosowne, w ramach istniejących przepisów, wyróżnienie.



Andrzej K. Kononowicz