

**Recenzja pracy doktorskiej**

**mgr. Kamila Kostyna**

**pt. „ Indukcja alternatywnej drogi metabolizmu tyrozyny w ziemniaku przez wprowadzenie genu hydroksylazy tyrozyny ze szczura laboratoryjnego (*Rattus norvegicus*)”**

Przedstawiona do oceny praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biochemii Genetycznej na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Szopy - Skórkowskiego. Dysertacja ma 145 stron tekstu w tym spis treści, listę skrótów użytych w pracy, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów użytych w tekście, wykaz 63 rycin (wykresów lub zdjęć), 4 tabele oraz materiały uzupełniające z trzema rycinami. W układzie pracy można wyróżnić wstęp spełniający funkcję przeglądu piśmiennictwa przedmiotu, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję oraz podsumowanie. W spisie cytowanej literatury zestawiono 218 pozycji. Praca ma przejrzysty układ i dobry poziom edytorski.

Tyrozyna jest substratem do produkcji katecholamin, które są istotnymi związkami w organizmach zwierząt, w których pełnią funkcje regulatorowe jako hormony lub funkcjonują jako neuroprzekaźniki. U zwierząt szlak przemian tyrozyny jest dobrze rozpoznany i rozpoczyna się od hydroksylacji tyrozyny do L-DOPY a następnie jej dekarboksylacji do dopaminy. W roślinach katecholaminy występują w mniejszych ilościach i mają słabiej zdefiniowane funkcje – są traktowane jako fitohormony oraz związki reagujące na wystąpienie stresu. Szlak przemian tyrozyny w roślinach nie jest do końca poznany, ale zakłada się że nie związany z jej hydroksylacją, gdyż genu hydrolazy tyrozyny w roślinach nie wykryto. W roślinach tyrozyna ulega dekarboksylacji do tyraminy a ta ulega hydroksylacji do dopaminy.

Celem ocenianej pracy było zbadanie na ile wprowadzenie do genomu ziemniaka genu hydrolazy tyrozyny pochodzącego od szczura może zmodyfikować szlak przemian tyrozyny do katecholamin i jakie to ma oddziaływanie na procesy metaboliczne w ziemniaku. Doktoranta interesowało również na ile zmiany w biosyntezie katecholamin mogą oddziaływać na syntezę związków fenolowych i odporność form transgenicznych na infekcje wybranymi patogenami.

Wstęp do pracy

We wstępie Doktorant omówił ziemniak jako przedmiot badań uwzględniając jego budowę morfologiczną oraz jego znaczenie jako rośliny uprawnej, ważniejsze choroby ziemniaka, w tym zarazę ziemniaka oraz mokrą zgniliznę bulw. Wydaje się, że bardziej przydatne do planowanych badań byłoby omówienie mechanizmów odporności w ziemniaku wraz ze sposobami oceny odporności na te choroby, niż omawianie innych chorób, które nie były przedmiotem badań.

Klarownie i ze znawstwem literatury przedmiotu Doktorant w kolejnych podrozdziałach wstępu omówił klasę katecholamin, ich właściwości, biosyntezę oraz rolę w tym procesie

hydroksylazy jak i dekarboksylazy tyrozyny. Zostały jasno przedstawione drogi metabolizmu katecholamin w roślinach i zwierzętach i funkcje jakie w nich spełniają. Doktorant przedstawił dotychczasowe prace z roślinami transgenicznymi, które obejmowały m.in. badania prowadzone w jego macierzystym zespole kierowanym przez profesora Jana Szopę - Skórkowskiego nad roślinami ze zmienionym poziomem katecholamin. Opisał szczegółowo grupy związków fenolowych występujące w roślinach, regulacje ekspresji genów związanych z ich biosyntezą, aranżację enzymów szlaku fenylopropanoidowego w kompleksy i ich wzajemne powiązania. Omawiając funkcje tych drugorzędowych metabolitów Doktorant podkreślił rolę jaką spełniają w odpowiedzi rośliny na stres.

#### Materiał i metody

**Widoczna jest bogata różnorodność metod wykorzystanych przez Doktoranta do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania badawcze. Swobodnie posługuje się technikami transformacji roślin i identyfikacji uzyskanych transformantów o wysokiej ekspresji transgenu i białka HT (RT-PCR, Northern, Western Blotting). Do charakterystyki profili metabolicznych linii transgenicznych stosuje technikę GC-MS, a zawartości poszczególnych grup metabolitów frakcji rozpuszczalnych i związanych w ścianie komórkowej analizuje techniką LC-MS. Dobiera i z powodzeniem stosuje metody do oznaczania zawartości flawonoidów, antocyjanin, chlorofilu, skrobi i cukrów rozpuszczalnych, celulozy, lignin, nadtlenu wodoru oraz potencjału antyoksydacyjnego i badania ekspresji genów.**

Wątpliwości wywołuje zastosowana metoda oceny odporności roślin na zarazę ziemniaka dotycząca sposobu zastosowania inokulum, długości trwania testu (14 dni zamiast 6-7 stosowanych) oraz oceny porażenia. Nie jest podane źródło wykorzystane do doboru metody. Brak należytych powtórzeń testu, aby ocenić odporność roślin.

Niektóre metody analityczne są skąpo opisane i brakuje podania źródeł wg których je Doktorant zastosował. Brakuje informacji źródłowej o genie HZ wykorzystanym do transformacji.

Zbyt lakoniczna jest informacja o prowadzeniu uprawy polowej transformantów. Niejasna jest przyczyna niewykorzystania bulw badanych linii do rozmnożeń polowych w drugim i trzecim roku uprawy. Nie są również znane warunki prowadzenia roślin w polu, a trzyletnia wszechstronna analiza metabolitów wskazuje, że wyniki analiz były obarczone znacznym błędem, którego można się domyślać przy analizie uzyskanych istotności różnic wykazywanych na wykresach. Wykonanie powtórzeń i dwuczynnikowa analiza wariancji uwzględniająca wpływ lat zapewne pozwoliłaby na zmniejszenie błędu doświadczeń.

#### Wyniki. Przebieg realizacji badań:

Do ziemniaka odm. Desireé drogą transgenezy Doktorant wprowadził gen hydrolazy tyrozyny z laboratoryjnej formy szczura wędrownego *Rattus norvegicus*. Z uzyskanych transformantów o potwierdzonej ekspresji genu i obecności jego produktu wybrał do dalszych prac 5 linii transgenicznych (HTZ). Do badań porównawczych obok kontroli typu dzikiego, czyli odmiany Desireé, Doktorant użył również transgenicznej linii ziemniaka TD33 z nadekspresją genu dekarboksylazy tyrozyny z pietruszki. W wybranych liniach badał profile metaboliczne (techniką GC-MS) wykazując analizą składowych głównych istotne różnice profili między badanymi liniami transgenicznymi HTZ oraz kontrolą. Analizując związki z grupy katecholamin Doktorant uzyskał istotnie niższy od kontroli poziom tyrozyny we wszystkich liniach



HTZ, oraz w poszczególnych liniach istotne spadki dopaminy, kwasu homowanilinowego, metanefryny i adrenaliny. Doktorant stwierdził w liniach HTZ brak istotnego wzrostu w poziomie tyraminy i podniesiony poziom L-DOPY, który był istotnie wyższy od kontroli w linii HTZ12. Doktorant wykazał relatywny spadek zawartości 11 związków z grupy cukrów rozpuszczalnych i ich pochodnych we wszystkich liniach HTZ, przy czym spadki te były istotne dla poszczególnych linii HTZ. Analizując poziom kwasów organicznych związanych ze szlakiem oddechowym Doktorant wykazał w liniach HTZ w relacji do kontroli istotnie niższą zawartość kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego oraz kwasu jabłkowego. Stwierdził również zmiany w zawartości poszczególnych aminokwasów pomiędzy badanymi liniami. Na ogół następował ich spadek (np. prolina, izoleucyna, tyrozyna – uwaga dla ta ostatnia nie jest zaznaczona w tabeli 3 na czerwono). Linia HTZ12 wykazała istotny, trzykrotny wzrost zawartości lizyny i ośmiokrotny wzrost zawartości ornityny. Doktorant zbadał w liniach transgenicznych zawartość pochodnych fenolowych szlaku fenylopropanoidowego w ekstraktach metanolowych i hydrolizatach ścian komórkowych stosując technikę UPLC-MS. Uzyskał w pojedynczych liniach istotnie, bo dwukrotnie zwiększony poziom waniliny, kwasu ferulowego, ferulo-tyraminy czy aldehydu 4-hydroksybenzoesowego we frakcji związanej. Analiza sumaryczna poziomu związków fenolowych oznaczonych zarówno w metanolowych ekstraktach oraz hydrolizatach ścian komórkowych linii HTZ wykazywała ich relatywnie wyższy poziom, ale nie wykazała istotności tych różnic w stosunku do kontroli. Doktorant stwierdził brak zmian poziomu związków fenolowych w linii TD33.

Zaobserwowane zjawisko zwiększonej zawartości pochodnych fenolowych Doktorant potwierdził znajdując podniesiony potencjał antyoksydacyjny linii transgenicznych mierzony poziomem związania rodnika DPPH, który w ekstraktach metanolowych był istotnie wyższy do kontroli.

Odnotowując zmiany w poziomie katecholamin w liniach HTZ, Doktorant zbadał reakcję odpornościową linii HTZ na infekcję *Phytophthora infestans*. W teście przeprowadzonym na 5 roślinach *in vitro* na genotyp stwierdził słabsze porażenie zarazą ziemniaka trzech linii HTZ w stosunku do typu dzikiego. Test w mojej ocenie jest obciążony metodycznymi błędami.

Przez trzy sezony (2012-2014) badane linie HTZ i linia TD33 były oceniane w uprawie polowej. W ocenie fenotypów linii HTZ Doktorant odnotował wcześniejsze zakwitanie poszczególnych linii oraz istotnie wyższą liczbę bulw/krzak wytwarzanych przez linie HTZ w stosunku do odmiany Desireé. Jednocześnie wykazał, że masa jednej bulwy linii HTZ była istotnie mniejsza w poszczególnych latach w stosunku do kontroli. Do tej oceny ustosunkowałam się w częściach recenzji dotyczących metod oraz dyskusji pracy.

**Trzyletnia, wszechstronna charakterystyka procesów metabolicznych w liniach zmodyfikowanych wykonana przez Doktoranta obejmowała analizę tkanek naci, mięszu i skórki bulw w porównaniu do niezmodyfikowanej odmiany Desireé.**

Doktorant nie stwierdził różnic istotnych od kontroli w zawartości chlorofilu, jak i suchej masy bulw linii HTZ. Doktorant wykazał, metodą Folina-Ciocalteu'a, podniesiony w stosunku do kontroli, ogólny poziom związków fenolowych w naci linii HTZ. Zawartość flawonoidów była istotnie wyższa we wszystkich liniach HTZ oraz linii TD33, przy czym poziom antocyjanów nie uległ zmianie w tych liniach. Doktorant odnotował pewien wzrost zawartości proantocyjanidyny w liniach HTZ, istotny statystycznie dla poszczególnych linii w poszczególnych latach badań.



Doktorant analizował metodą LC-MS zawartość poszczególnych związków fenolowych w obu frakcjach tkanek zielonych z roślin rosnących w polu. W badanych ekstraktach wyodrębnił grupy kwasów fenolowych, pochodnych katecholaminowych oraz flawonoidów. Porównując do poziomu niezmodyfikowanej kontroli Doktorant wykazał w liniach HTZ istotnie wyższą zawartość kwasu kumarowego, O-glukozydu kwasu kawowego, kwasu di-ferulowego oraz kwasu chlorogenowego 3. Jednocześnie odnotował istotnie niższą zawartość kwasu chlorogenowego 2 oraz kwasu kawowego. Wśród badanych pochodnych katecholaminowych wykazał istotny wzrost zawartości ferulo-tyraminy, ferulo-metoksytyraminy oraz kumarylo-tyraminy we wszystkich liniach HTZ, zaś nieistotne zmiany tych związków w linii TD33. Natomiast obraz zawartości tyrozolu był odwrotny. Jedynie linia TD33 wykazała 45-krotny wzrost tego związku przy braku istotnej zmiany w liniach HTZ. Doktorant wykazał podniesiony poziom flawonoidów: kwercetyny i jej pochodnych oraz epigallokatechin we wszystkich liniach zmodyfikowanych. Zawartość epigallokatechin w linii TD33 była aż ponad 28-krotnie wyższa niż w kontroli. Również w analizie hydrolizatów ścian komórkowych tkanek zielonych Doktorant wyróżnił podniesiony poziom kwasów fenolowych w liniach HTZ, w których również wystąpił istotnie podniesiony poziom pochodnych benzoesowych, przy jednoczesnym braku istotnych zmian zawartości tych związków w linii TD33.

Potencjał antyoksydacyjny w ekstraktach metanolowych zielonych tkanek był lekko podniesiony w stosunku do kontroli w trzech latach badań osiągając statystyczną istotność w 2013 roku dla dwóch linii HTZ12 i HTZ53. Podobną tendencję Doktorant znalazł we frakcji związanej tkanek zielonych linii HTZ.

Doktorant, ponieważ uzyskał w liniach HTZ istotne zmiany w zawartości związków różnych grup fenolowych, zbadał poziom ekspresji 16 genów ze szlaku fenylopropanoidowego i 2 genów związanych z przemianami skrobi. Analizę prowadził z użyciem metody RT-PCR na matrycy cDNA wykazując względną ilość produktu w odniesieniu do genu referencyjnego w porównaniu do kontroli. I tak dla genów syntezy katecholaminy wykazał w liniach HTZ brak istotnych zmian w poziomie ekspresji *dt*, oraz istotny wzrost ekspresji genów *ppo* i *tht* przy braku zmian w aktywności tych genów w linii TD33. Badając ekspresję genów biosyntezy kwasów fenolowych Doktorant uzyskał podniesiony poziom ekspresji genu *pal* we wszystkich liniach HTZ i linii TD33. Natomiast geny *c4h* i *c3h* miały podniesioną ekspresję w liniach HTZ, a nie miały w linii TD33.

Z sześciu genów związanych z syntezą flawonoidów, większość wykazywała podniesioną aktywność, ale nieistotną statystycznie. Z 6 genów związanych z biosyntezą lignin istotnie podniesioną ekspresję genu *ccr* odnotowano w liniach HTZ8 i HTZ43, a istotnie obniżoną ekspresję genu *cad1* wykazano w liniach HTZ8 i HTZ28. W analizie ekspresji dwóch genów związanych z przemianami skrobi wykazano tendencje do wzrostu ekspresji genu *sus* w liniach HTZ, a genu *sps* w linii TD33.

W trzyletniej ocenie zawartości ligniny i celulozy w częściach zielonych linii transgenicznych z uprawy polowej Doktorant wykazał brak istotnych odchyleń od kontroli typu dzikiego.

Doktorant przeprowadził trzyletnią ocenę bulw linii zmodyfikowanych, analizując osobno miąższ oraz skórkę bulw pod kątem zawartości skrobi i cukrów rozpuszczalnych, białka, glikoalkaloidów (w miąższu i skórcie bulw) związków fenolowych (we frakcji rozpuszczalnej i związanej) oraz flawonoidów i proantycjanidyny. W tych analizach istotne różnice w stosunku do kontrolnej odmiany Desireé Autor odnotował w spadku zawartości skrobi w linii TD33



przy jednoczesnym istotnie podniesionym poziomie cukrów rozpuszczalnych w tej linii. Ponadto we wszystkich liniach zmodyfikowanych wystąpił istotnie niższy od kontroli poziom zawartości solanidyny w skórce. Autor stwierdzał również istotny spadek zawartości  $\alpha$ -solaniny i  $\alpha$ -chakoniny w skórce - w wybranych latach i w niektórych liniach HTZ. Analizując ogólny poziom związków fenolowych w mięszu bulw Autor wykazał pewną tendencję wzrostową ich zawartości we frakcjach rozpuszczalnych linii zmodyfikowanych, natomiast spadek w stosunku do kontroli we frakcjach związanych. Poziom ogólny flawonoidów w mięszu bulw był zróżnicowany między badanymi liniami a kontrolą, ale sporadycznie w sposób istotny.

Autor analizował techniką LC-MS zawartość poszczególnych związków fenolowych we frakcjach rozpuszczalnej i związanej mięszu bulw i stwierdził we frakcji rozpuszczalnej istotne obniżenie poziomu kwasu kawowego w liniach zmodyfikowanych, przy podniesieniu zawartości rutyny i jej glukozydu, istotnym dla niektórych linii HTZ. We frakcji związanej mięszu bulw w liniach HTZ wśród pochodnych benzoesowych wystąpił podwyższony poziom kwasu 4-hydroksybenzoesowego, który był istotnie obniżony w linii TD33. W zawartości kwasów fenolowych frakcji związanej wystąpił w liniach HTZ istotnie zmienny poziom kwasu kumarowego, przy istotnym spadku jego zawartości w linii TD33. Poziom kwasu kawowego był nieznacznie podwyższony w liniach HTZ, zaś istotnie obniżony w linii TD33. Podwyższone zawartości kwasu ferulowego nie były istotnie różne od kontroli.

Doktorant stwierdził, że potencjał antyoksydacyjny, mierzony procentem związanego DPPH, we frakcji rozpuszczalnej mięszu bulw miał względnie podniesiony poziom w liniach HTZ8, HTZ28 i HTZ43 a obniżony w liniach HTZ53 i TD33.

Skórka jest naturalną barierą chroniącą bulwę przed infekcjami i stresami środowiskowymi. Doktorant odnotował w skórce bulw tendencję do podwyższonej ogólnej zawartości związków fenolowych oraz istotnie wyższy poziom flawonoidów w liniach HTZ i TD33. Poziom tych związków był zdecydowanie wyższy w skórce niż w mięszu bulw. Ponadto, we wszystkich liniach w skórce bulw wystąpił istotnie wyższy poziom zawartości antocyjanów, co jest związane z fenotypem typu dzikiego. Podwyższony, w stosunku do kontroli, poziom proantycyjanidyny wystąpił w liniach HTZ, natomiast w linii TD33 odnotowano spadek jej poziomu.

Podobnie jak mięsz bulw tak i w skórce bulw linii transgenicznnych Autor przeanalizował techniką LC-MS zawartości różnych grup związków wśród pochodnych fenolowych jak kwasów fenolowych, pochodnych katecholaminowych, pochodnych benzoesowych dodając do techniki LC-MS analizę widm (absorbancji i masowego). Wykazał, że poziom badanych pochodnych fenolowych był istotnie wyższy w skórce niż w mięszu bulw. Podniesiony względem kontroli poziom kwasów fenolowych oraz pochodnych benzoesowych wystąpił w większości linii HTZ we frakcji rozpuszczalnej, a linia TD33 wyróżniała się istotnie wyższym poziomem kwasu kawowego i kwasu ferulowego oraz spadkiem zawartości waniliny. Doktorant stwierdził podniesiony, relatywnie do kontroli, poziom pochodnych katecholaminowych w liniach HTZ. Zawartość tyrozolu była istotnie wyższa w trzech liniach HTZ i linii TD33. Wykonana przez Doktoranta analiza widm pozwoliła zidentyfikować we frakcji rozpuszczalnej szereg związków fenolowych pochodnych kwasów kawowego i ferulowego oraz glikozydów pelargonidyny, których poziom był istotnie wyższy do kontroli typu dzikiego w liniach HTZ. W tej analizie linia TD33 reagowała niską zawartością glikozydów pelargonidyny oraz pochodnej kwasu kawowego.



W analizie techniką LC-MS frakcji związanej skórki bulw linii transgenicznych Doktorant stwierdził istotny spadek zawartości kwasu kumarowego w linii TD33, przy podniesionym poziomie tego związku w liniach HTZ. Linia TD33 posiadała relatywnie najwyższą zawartość wśród linii transgenicznych kwasów fenolowych: kawowego oraz ferulowego oraz ferulo-putrescyny. Pochodne katecholaminowe w hydrolizatach ścian komórkowych miały podniesiony poziom w liniach transgenicznych, ale jedynie dwie linie HTZ28 i HTZ53 wykazały istotnie wyższy od kontroli poziom ferulo-tyraminy. Również grupa pochodnych benzoesowych wykazała podniesiony, w stosunku do typu dzikiego, poziom szeregu związków, z których zawartości kwasów syringowego i protokatechowego oraz aldehydu 4-hydroksybenzoesowego były istotnie wyższe w badanych liniach zmodyfikowanych.

Potencjał antyoksydacyjny frakcji rozpuszczalnej i związanej skórki bulw większości linii transgenicznych HTZ był istotnie wyższy niż w kontrolnej odmianie Desireé.

Doktorant nie wykazał istotnych różnic w lekko podniesionej zawartości ligniny w skórcie linii transgenicznych HTZ w stosunku do kontroli. Natomiast histochemiczne barwienie ligniny w skórcie bulw wykazał, że najszerza warstwa lignin wystąpiła w linii HTZ53.

Doktorant zbadał porażenie bulw linii transgenicznych bakteriami pektynolitycznymi *Pectobacterium carotovorum* i *Dickeya* sp. zakażając po 5 bulw na genotyp. Oceniana masa zgniłej tkanki bulw była miarą stopnia porażenia. Test z udziałem *P. carotovorum* nie zróżnicował badanych linii HTZ i kontroli wykazując minimalną masę tkanki zgniłej i należy go ocenić jako nieudany. Natomiast bulwy linii HTZ 53 zakażane *Dickeya* sp. wykazały silniejsze porażenie (na poziomie kontroli), niż pozostałych linii HTZ. I ten test również należy zaliczyć do słabych oceniając, że w podatnej odmianie Desireé masa tkanki porażonej wynosiła około 1 g. Doktorant nie stwierdził istotności uzyskanych różnic w porażeniu linii.

Na zakończenie części doświadczalnej Doktorant przedstawił badania poziomu utleniania w ocenianych liniach zmodyfikowanych.

Doktorant zbadał w roślinach *in vitro* poziom nadtlenu wodoru wykazując, że linie HTZ mają podniesiony jego poziom w stosunku do kontroli. A linia HTZ43 ma ten poziom istotnie wyższy. Następnie w liniach HTZ zmierzył poziom transkryptów pięciu genów związanych z neutralizacją wolnych rodników. Stwierdził, porównując do kontroli, spadek transkryptu genu kodującego katalazę w badanych liniach HTZ oraz istotnie podniesiony poziom ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej (Cu-Zn). Zastosowany przez Doktoranta oprysk roztworem L-DOPY roślin zmodyfikowanych spowodował istotne podniesienie zawartości nadtlenu wodoru w liniach HTZ w 3 i 6 godzin od momentu oprysku w porównaniu do kontroli oraz istotną aktywację genu dysmutazy ponadtlenkowej (Cu-Zn). Ponadto w traktowanych L-DOPĄ liniach istotnie wzrósł po 6 i 12 godzinach poziom transkryptu oksydazy polifenolowej.

## Dyskusja

Doktorant przedstawił stosunkowo krótką dyskusję napisaną z pewną swadą i w sposób przemyślany, wykazując dobrą znajomość prac powiązanych z Jego badaniami. Nie miał łatwego zadania, gdyż szereg uzyskanych przez niego wyników szczegółowych było kontradiktoryjnych względem siebie

W dyskusji Doktorant wskazuje na korzyści wynikające z dogłębnego poznania oraz możliwości modyfikowania konkretnych szlaków metabolicznych roślin przy zastosowaniu



transformacji genetycznej. Dzięki obecnie dostępnym technikom i wiedzy molekularnej można modyfikować szlaki metaboliczne i ich wzajemne oddziaływanie w roślinach w celu uzyskania podniesionej zawartości poszukiwanych związków, lub obniżania zawartości tych, które są niepożądane. Obecny aspekt pracy doktorskiej był skierowany na poznanie szlaku biosyntezy i zrozumienie procesów metabolicznych w szerokiej grupie fenylopropanoidów, do której należą katecholaminy. Doktorant omówił dwie drogi biosyntezy katecholamin, różne dla świata zwierząt i roślin, w sposób komplementarny do informacji zawartych we wstępie pracy.

Doktorant prześledził alternatywny przebieg szlaku biosyntezy katecholamin i zmian zachodzących w ich procesach metabolicznych w transformowanych liniach ziemniaka HTZ ze zwierzęcym genem hydrolazy tyrozyny w roślinach z *in vitro*, oraz z uprawy w polu. W swoich analizach uzyskane linie HTZ porównał do odmiany Desiree oraz do linii TD33 z nadekspresją genu dekarboksylazy tyrozyny.

**Doktorant stwierdził, że biosynteza katecholamin przez hydroksylację tyrozyny nie jest funkcjonalna w ziemniaku, a zachodzące procesy biosyntezy w liniach HTZ są przekierowane na produkcję innych związków.** Wniosek ten oparł na uzyskaniu zakładanego wzrostu zawartości L-DOPY, produktu działania hydroksylazy tyrozyny, ale i jednoczesnym odnotowaniu spadku poziomu tyrozyny i fenyloalaniny w badanych liniach HTZ. Nie stwierdził również spodziewanego wzrostu zawartości katecholamin (dopaminy, adrenaliny). **Wg Doktoranta autoutlenianie L-DOPY do melanin lub działanie PPO może powodować stres oksydacyjny w roślinie, co objawiło się podniesionym poziomem nadtlenu wodoru w liniach HTZ oraz podniesioną aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej i obniżoną aktywnością katalazy.** Jednocześnie Doktorant założył, że L-DOPA może ulegać konwersji do tyrozyny i fenyloalaniny, substratów szlaku fenylopropanoidowego, co może doprowadzić do zwiększenia poziomu związków fenolowych w roślinie. I ten podniesiony poziom związków fenolowych w tkanka zielonych linii HTZ został przez Doktoranta znaleziony. Tendencja ta była stabilnie powtarzalna w Jego badaniach. Analiza UPLC-MS zawartości poszczególnych związków fenolowych wykazała zróżnicowanie pomiędzy badanymi liniami HTZ a Doktorant podkreślił obserwowane zmiany w poziomie pochodnych kwasów kawowego i ferulowego. **Doktorant przedyskutował wystąpienie podniesionego poziomu ferulo-tyraminy w liniach HTZ i linii TD33, który był wytłumaczalny w linii TD33 z nadekspresją genu dekarboksylazy tyrozyny.** Wg. Niego w liniach HTZ po wprowadzeniu hydrolazy tyrozyny mogła nastąpić bądź rearanżacja w kompleksie enzymatycznym związanym z biosyntezą katecholamin (co może być hipotezą do kolejnych badań), bądź nastąpiła odpowiedź rośliny na stres oksydacyjny wywołany podniesionym poziomem RFT. Odnotowane zmiany w różnych grupach związków fenolowych skłoniły Doktoranta do zbadania poziomu ekspresji 16 genów związanych z biosyntezą katecholamin, kwasów fenolowych, flawonoidów i lignin. Większość z badanych genów wykazała podniesiony w stosunku do kontroli poziom ekspresji poza izoformami CAD1 i CAD2. Doktorant zwrócił uwagę na zwiększony poziom amoniakolazy fenyloalaniny (PAL) w liniach HTZ i TD33. Podkreślił pewien spadek zawartości kwasów chlorogenowych i kwasu kawowego a wzrost zawartości kwasu ferulowego i kumarowego w liniach HTZ. Kwasy te są istotne dla biosyntezy lignin w roślinie. **Autor stwierdził, że zwiększona aktywność ekspresji genów związanych z biosyntezą fenoli i lignin nie oddziaływała**



na zawartość samych lignin, gdyż ta nie uległa istotnym zmianom w liniach transgenicznym.

Doktorant odnotował zwiększony poziom amidów tyraminy oraz kwasów hydroksycynamonowych w liniach HTZ z wprowadzonym genem hydroksylazy tyrozyny, czego nie stwierdził w linii TD33 z nadekspresją genu dekarboksylazy tyrozyny. **Doktorant postulował, że tyramina nadprodukowana przy nadekspresji dekarboksylazy tyrozyny jest skierowana na produkcję tyrozolu a nie na syntezę amidów z kwasami hydroksycynamonowymi, gdyż w linii TD 33 wystąpił zdecydowanie wysoki poziom tyrozolu, przy nieznacznym jego wzroście w liniach HTZ.**

W analizowanych liniach HTZ i TD33 wystąpiła akumulacja flawonoidów: kwercetyny i jej pochodnych oraz epigallokatechiny, prekursora tanin, która wykazała ponad 28-krotnie wyższy wzrost od poziomu kontroli - odm Desireé. **Autor postuluje, że gwałtowny wzrost tyrozolu oraz epigallokatechiny w linii TD33 oraz kierunki przemian tyraminy w liniach HTZ i TD powinny być przedmiotem dalszych badań.**

Analiza poziomu ekspresji genów związanych z biosyntezą katecholamin wykazała wysoką aktywności oksydazy polifenolowej (PPO) w liniach HTZ przy niezmiennym jej poziomie w linii TD33. Wzmocniona aktywności PPO jest łączona z silniejszą reakcją obronną rośliny na stres. **Doktorant tłumaczy podniesioną odporność na patogeny linii HTZ wyższym poziomem transkryptu PPO.** W linii TD33 poziom PPO nie był różny od kontroli, jednak linia ta nie była badana w testach odpornościowych. Podniesiony poziom potencjału antyoksydacyjnego oraz pochodnych fenolowych, które mają właściwości antyoksydantów w liniach HTZ skłoniły Doktoranta do przeprowadzenia testów oceniających porażenie patogenami: *Phytophthora infestans* roślin *in vitro* oraz bakteriami pektynolitycznymi bulw z uprawy polowej. Oba rodzaje oceny budzą moje poważne wątpliwości metodyczne i uzyskane wyniki uznaję za mało wiarygodne, aczkolwiek również oczekiwałam uzyskania efektu podniesionego poziomu reakcji odpornościowej na patogeny w badanych liniach. Doktorant na podstawie jednorazowo przeprowadzonych testów na 5 roślinach *in vitro* i 5 bulwach z każdej linii wyciągnął wnioski o podniesionej odporności linii HTZ na zarazę ziemniaka oraz mokrą zgniliznę bulw.

Oksydaza polifenolowa to enzym, który w roślinach jest odpowiedzialny za utlenianie takich związków fenolowych jak L-tyrozyna, kwas chlorogenowy, kwas kawowy w procesie melanogenezy. Proces utleniania tyrozyny do L-DOPY i następnie do DOPA –chinonów również jest kontrolowany przez PPO. Ciemnienie enzymatyczne miąższu bulw jest jedną z najważniejszych cech jakościowych ziemniaka jadalnego. Z tyrozyny w wyniku jej utleniania powstają barwne związki melaninowe, które w sposób istotny obniżają jakość bulw ziemniaka. Ciemnienie enzymatyczne miąższu bulw jest silnie skorelowane z ciemną plamistością poudzerzeniową bulw ziemniaka. Poziom ekspresji obu tych, niekorzystnych cech jest związany z podniesioną aktywnością PPO w ziemniakach. Warto więc zasugerować, aby w posiadanych przez Zespół liniach HTZ zbadać w przyszłości poziom tych jakościowych cech ziemniaka.

Badane linie transgeniczne były oceniane w uprawie polowej przez trzy kolejne sezony, ale nie były prowadzone z bulw. Ziemniak jest rozmnażany wegetatywnie przez bulwy. Doktorant stracił okazję do, co najmniej dwuletniej, oceny zmodyfikowanych linii w warunkach polowych prowadzonych z sadzeniaka, co byłoby naturalnym sposobem uprawiania ziemniaków. Jest szereg cech fenotypowych i agronomicznych ziemniaka, które nie da się



ocenić w pierwszym sezonie po wyprowadzeniu roślin z kultur *in vitro*. Stąd, wyniki dotyczące wiązania większej liczby bulw w liniach HTZ niż w odmianie Desireé, czy różnic w terminach kwitnienia nie traktuję jako wiążącego wyniku. Mogę nadmienić, że odm. Desireé, która w doświadczeniu Doktoranta wytwarzała ok 5-7 bulw /krzak, bulwę o średniej masie 20g-40g i plon na poziomie do 100 do 300g/krzak - w normalnych warunkach polowych wiąże ok 12-15 bulw/ krzak, wytwarza raczej duże bulwy o wadze 100-120 g i ma plon na poziomie 1,0-1,2 kg/krzak.

W podsumowaniu Doktorant wyszczególnił 11 uzyskanych wyników, z których na podkreślenie zasługują wnioski analizujące zmiany w szlakach biosyntezy katecholamin wywołane wprowadzeniem do ziemniaka genu szczurzej hydrolazy tyrozyny.

**Interesuje mnie opinia Doktoranta o tym jakie są przesłanki, że w testach oceniających porażenie patogenami linia TD33 może wykazywać mniejsze od wzorca porażenie naci przez *P. infestans* oraz bulw przez bakterie pektynolityczne w warunkach tlenowych? W przeprowadzonych przez Doktoranta testach linia ta nie była porównawczo oceniana.**

#### Uwagi redakcyjne

1. W tekście wystąpiło szereg nieścisłości nomenklaturowych:
  - a. W tytule dysertacji: *Rattus norvegicus* to gatunek szczur wędrowny a nie laboratoryjny, gen hydrolazy tyrozyny pochodził z linii laboratoryjnej tego gatunku
  - b. Str 20 stolony ziemniaka to nie kłącza
  - c. Str 23 co znaczy ...rozpadanie się całej partii przechowywanego materiału?
  - d. Str 25 ...nie ma szczepów ogólnych PVY są szczepy zwykłe, podobnie jak PVY<sup>NTN</sup> nie jest wirusem hybrydowym tylko szczepem zrekombinowanym.
  - e. Str 25 PLRV to *potato leafroll virus*, a po polsku wirus liściozwoju
  - f. Str 27 co to są poduszeczki liści?
  - g. Str 31 gatunek jęczmień to *Hordeum vulgare*
  - h. Str 33, 76 *Phytophthora infestans* to zaraza ziemniaka a nie zaraza ziemniaczana
  - i. Str 52 ma być: odmiana ziemniaka *Solanum tuberosum* L. Desireé (cv. to angielski skrót cultivar)
  - j. Str 53 do transformacji nie użyto siewek a trzytygodniowe rośliny z *in vitro*
  - k. Str 58 niedokończony podtytuł 3.2.25.
  - l. Str 62 podtytuł 3.2.37.2. test odporności „roślin z *in vitro*” a nie „siewek ziemniaczanych” – siewka ziemniaka jest otrzymywana po wysianiu nasion ziemniaka
  - m. Str 78 „średnia świeża masa bulw na roślinę” to plon bulw na krzak, a „średnia świeża masa jednej bulwy” to ciężar jednej bulwy
  - n. Str 79 liczba bulw na krzak a nie na krzew
  - o. Str 133-142 w spisie literatury Autor nie stosuje polskich skrótów przy nazwiskach autorów i niewłaściwie skraca numerację stron
2. Uwagi merytoryczne
  - a. Str 76 ..nie zaobserwowano prostej korelacji między stopniem porażenia roślin po infekcji patogenem a potencjałem antyoksydacyjnym, ani zawartością związków fenolowych... a dalej na str 126 „ stwierdzono ujemną korelację między poziomem antyoksydantów a stopniem porażenia”
  - b. Str 77 Ryc. 20A . brak opisu dla ramki i wąsów i brak testu istotności różnic na wykresie




- c. Str 86 – to w linii HTZ43 a nie w linii HTZ8 wystąpił 70% spadek poziomu kw. kawowego
- d. Str 126 ... linia HTZ43 cechowała się najniższym poziomem związków fenolowych (zwłaszcza rozpuszczalnych) – tak, na ryc. 17. – ale już nie na ryc. 18 i 24.

### Podsumowanie

Generalnie, część eksperymentalna pracy, mimo złożoności zastosowanych metod badawczych, została przedstawiona przez Doktoranta w sposób bardzo przejrzysty. Schematy oraz wykresy, które przedstawił dobrze ilustrują prowadzone badania i uzyskane wyniki i pozwalają czytelnikowi pracy samodzielnie wnioskować o występujących prawidłowościach. Jednocześnie należy podkreślić, że Doktorant potrafił w zwięzły, logiczny sposób podsumować uzyskane wyniki, które w wielu przypadkach były oryginalne. Doktorant wykazał się umiejętnością dyskusowania wyników własnych z danymi literaturowymi. Wyrażam pewien niedosyt związany z oceną fenotypową materiału badawczego, która była zbyt pobieżna w porównaniu do wrażliwych metod molekularnych i biochemicznych opisujących ten materiał. Zakres badań, które wykonał Doktorant jest bardzo szeroki i pogłębia wiedzę o drogach przemian flawinopropanoidów w roślinach, które od lat są w sferze zainteresowań zespołu, w którym pracuje.

**Rozprawę doktorską mgr Kamila Kostyna oceniam pozytywnie i stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa w pełni spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie mgr Kamila Kostyna do publicznej obrony pracy przed Radą Naukową Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego.**



Ewa Zimnoch-Guzowska