

Poznań 29.10.2024

Prof.dr hab. Anna Goździcka-Józefiak
senior profesor
Instytutu Biologii Eksperymentalnej
UAM w Poznaniu

O C E N A

rozprawy doktorskiej „Przygotowanie i zastosowanie ekspresyjnych konstrukcji genowych do modyfikacji tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i sorgo (*Sorghum sp.*) w celu zwiększenia zawartości sacharozy na potrzeby produkcji bioetanolu II generacji „ p. mgr inż Małgorzaty Marszałek.

Pani mgr inż. Małgorzata Marszałek prace doktorską wykonała w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Zakładzie Biotechnologii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Promotorem rozprawy był p.prof.dr hab. Daniel Lipiński, natomiast promotorem pomocniczym p.dr Karolina Wielgus.

Kończące się zasoby kopalnianych źródeł energii, skłaniają nas do poszukiwania, innych odnawialnych sposobów jej pozyskiwania, które jednocześnie nie szkodziłyby środowisku. Z tego względu duże zainteresowanie wzbudzają biopaliwa wytwarzane z biomasy roślinnej. Szczególną uwagę zwracają rośliny wysoko energetyczne, łatwo adaptujące się do warunków środowiska, odporne na czynniki środowiskowe, tanie w uprawie i wysokiego plonu biomasy. Alternatywnym źródłem biomasy mogą być także rośliny genetycznie modyfikowane, które wytwarzałyby substraty umożliwiające zwiększenie wydajności produkcji biopaliw z biomasy roślinnej. Z tego względu duże zainteresowanie jest transgenizacją tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i sorgo (*Sorghum bicolor*). Tytoń jako biomasa gwarantuje wysoki plon z hektara, co w przypadku upraw energetycznych jest szczególnie istotne. Zaletą tytoniu jest także niska zawartość ligniny przy jednocześnie wysokiej ilości cukrów, co ułatwia proces fermentacji w celu uzyskania biopaliw.

Z kolei sorgo jest jednym z najbardziej wydajnych w uprawie zbóż, a przy tym tanie, bardzo odporne na suszę, grzyby i pleśnie, a także łatwo adaptujące się do warunków środowiska.

W procesie fermentacji alkoholowej głównym substratem jest sacharoza. W syntezie sacharozy kluczową rolę pełnią enzymy tj. syntaza sacharozy (SuSy), fosfataza sacharozofosforanowa (SPP) oraz pirofosforylaza UDP glukozy-(UDPaza). Modyfikacje genetyczne roślin prowadzące do wzrostu

ekspresji genów je kodujących mogą prowadzić do wzrostu produkcji cukrów w roślinie, zwiększenia biomasy roślinnej i wzrostu wydajności produkcji bioetanolu.

Dlatego cel badań podjętych przez Doktorantkę zmierzający do uzyskaniu linii transgenicznego tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i sorgo z ekspresją genów zaangażowanych w syntezę sacharozy (fosfatazy sacharozofosforanu (SPP), pirofosforylasy UDP- glukozy (UGPaza) oraz syntazy sacharozy (SuSy) uważam za słuszny i uzasadniony. Realizację celów badawczych Doktorantka rozpoczęła od przygotowania trzech konstruktów genowych zawierających sekwencje kodujące 3 geny: fosfataze sacharozofosforanową (SPP), pirofosforylase UDP-glukozy (UGPaza) oraz syntazę sacharozy (SuSy) wyizolowane z sorgo i

-wprowadzenie takich konstruktów do genomu tytoniu,

-uzyskanie linii transgenicznych tytoni,

- potwierdzenie ich ekspresji w komórkach transgenicznych roślin pokolenia Fo i F1 ,

-przeprowadzenie transformacji sorgo oraz opracowanie metody regeneracji *in vitro* roślin sorgo z trzech typów eksplantatów wierzchołków pędów, pierwszego węzła pędu oraz izolowanych osi zarodkowych.

Otrzymane konstrukty genowe zawierające enzymy biorące udział w syntezie sacharozy Doktorantka wprowadzała do odpowiednich wektorów, a następnie do komórek *Agrobacterium tumefaciens* i wykorzystwała do transformacji 3-4 tygodniowych liści tytoniu. Po kilku tygodniach od transformacji z grudek tworzącego się kalusa odcinała młode pędy, które dalej hodowała na odpowiednich pożywkach. W wyhodowanych, potencjalnych transgenicznych roślinach tytoniu analizowała obecność integracji transgenów z genomowym DNA. Analiza genomowego DNA tytoniu izolowanego z młodych liści tytoniu uzyskanych z kultur *in vitro* (pokolenie Fo) za pomocą techniki PCR wykazała że, z 50 badanych roślin tytoniu transformowanych konstruktem zawierającym gen SPP, 22 miały wbudowany ten transgen dwie UGP i dwie z transgen SuSy. Rośliny takie były hodowane w szklarni aż do pozyskania z nich nasion (pokolenie F1). Przeprowadzone analizy wykazały że, wszystkie rośliny z pokolenia F1 miały wbudowane transgeny. Doktorantka we wszystkich transgenicznych roślinach wykazała ekspresję transgenów na poziomie mRNA za pomocą techniki RT-PCR. Co potwierdza stabilną integrację transgenów do genomu tytoniu w miejscu aktywnym transkrypcyjnie. Stosując technikę PCR w czasie rzeczywistym Doktorantka określiła także liczbę kopii transgenów wbudowanych do genomu tytoniu odpowiednio od 8-48 z wbudowanym genem SPP, dla UGPazy pomiędzy 2-5 i pomiędzy 1-2 dla SuSy. Wyniki tych badań wskazują że, cel badań Doktorantki zmierzający do transgenizacji roślin tytoniu przygotowanymi konstrukcjami, zawierającymi geny biorące udział w syntezie sacharozy został zrealizowany. Doktorantka osiągnęła wydajność metody transformacji tytoniu przygotowanymi konstrukcjami wyższą w porównaniu z wydajności opisywanej w literaturze. Interesujące byłoby zbadanie jak wprowadzone modyfikacje w otrzymanych liniach transgenicznego tytoniu wpływają na zmianę zawartości cukrów w roślinie, biomasę i wydajność agronomiczną w warunkach polowych.

W toku dalszych badań mgr inż. Małgorzata Marszałek przeprowadziła próby pozyskiwania transgenicznych roślin sorgo wprowadzając do komórek tej rośliny konstrukcje genowe przygotowane w ramach konsorcjum przez partnera projektu SORMISOL z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Konstrukcje genowe zawierały sekwencję genu pirofosforylasy UDP glukozy (pCah-UGPase) i sekwencję genu syntazy sacharozofosforanowej (pCah-SPS-AK) . Transformacji genetycznej poddano wierzchołki pędów sorgo (odmiany Rona 1), pierwszy węzeł pędu sorgo (odmiana SR1), Sucrosorgo 506, Herkules i Santos oraz izolowane zarodki sorgo odmian SR1 i SS przy pomocy *Agrobacterium tumefaciens* oraz metody mikrowstrzeliwania. Wierzchołki pędów po transgenezie hodowano na odpowiednich pożywkach. Obecność wprowadzonych transgenów do transformowanych roślin Doktorantka analizowała za pomocą techniki PCR. Wydajność transformacji sorgo przy pomocy *A.tumefaciens* była bardzo niska. Zidentyfikowano 1 roślinę transgeniczną wywodzącą się z wierzchołków pędów sorgo odmiany SR1 otrzymanych w wyniku transformacji konstrukcją genową pCah-SPS-AK zawierającą sekwencję genu syntazy sacharozofosforanowej.

Na uwagę zasługuje duża liczba doświadczeń wykonanych przez Doktorantkę. I tak np. modyfikacji genetycznej otrzymanymi konstruktami poddawano od 185 zarodków sorgo odmiany SR1 i 56 izolowanych zarodków odmiany sorgo SS.

Pani mgr inż. Małgorzata Marszałek przeprowadziła także próby transgenizacji roślin sorgo metodą mikrowstrzeliwania. W badaniach zastosowano wierzchołki pędów i tkanki kalusowej sorgo odmiany SR 1. Przed przystąpieniem do tych badań Doktorantka opracowała warunki mikrowstrzeliwania DNA do komórek roślinnych wykorzystując konstrukcję genową zawierającą gen markerowy beta -glukoronidazę. W opracowanych optymalnych warunkach mikrowstrzeliwania DNA przystąpiła do mikrostrzeliwania transgenów których, konstrukty otrzymała od partnera projektu SORMISOL. Transgenizacji poddała wierzchołków pędów sorgo oraz 3-4 tygodniowego kalusa. Przeprowadzone badania roślin transformowanych przy pomocy techniki mikrowstrzeliwania nie wykazały występowania roślin transgenicznych sorgo z wbudowanym genem UGPazy ani z genem SPS.

Analizując wyniki badań p.mgr inż Marszałek stwierdzam, że cel badań wytyczony na wstępie pracy został w pełni zrealizowany. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wnoszą szereg interesujących danych do badań nad transgenizacją roślin. Doktorantka opracowała także metody regeneracji *in vitro* różnych eksplantatów sorgo bazując na modyfikacji pożywki MS (Murashige i Skooga). Pożywka ta znacznie ogranicza wytwarzanie przez rośliny szkodliwych metabolitów wtórnych i korzystnie wpływa na regenerację roślin i ich aklimatyzację *ex vitro*. Opisane w recenzowanej pracy badania były starannie zaplanowane, bardzo pracochłonne i czasochłonne, wymagające od Doktorantki znajomości i umiejętności posługiwania się najnowszymi technikami z zakresu biologii molekularnej, mikrobiologii, hodowli i regeneracji roślin.

Wszystkie wyniki badań Doktorantki są starannie udokumentowane na załączonych rycinach i fotografiach oraz dyskutowane z najnowszymi danymi z literatury przedmiotu.

Badania Doktorantki były realizowane w ramach grantu z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, Programu Badań Stosowanych pt” Opracowanie innowacyjnej technologii produkcji bioetanolu II generacji z biomasy sorgo (*Sorghum* sp) i miskanta (*Miscanthus* sp) i mogą mieć ważne znaczenie praktyczne dla pozyskiwania nowych źródeł energii odnawialnej.

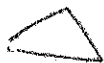
Przedstawioną do oceny pracę otrzymałam w formie 144 stronicowego wydruku komputerowego. Praca zredagowana jest bardzo starannie. Część doświadczalna rozprawy jest poprzedzona wprowadzeniem literaturowym (Rozdział 1) w badane zagadnienia. Doktorantka dokładnie także przedstawia cel pracy (Rozdział 2). Na uwagę zasługuje rozdział 3 i 4 pracy, w których p.mgr inż. Małgorzata Marszałek opisuje stosowane w badaniach materiały i szeroki wachlarz stosowanych metod badawczych. Wyniki badań Doktorantki są dokładnie opisane i starannie udokumentowane w rozdziale 5,

natomiast ich dyskusja z danymi literatury przedmiotu jest przedstawiona w rozdziale 6. Dyskusja.

Opracowanie kończą wnioski, Spis tabel, Spis rycin i literatura obejmująca 199 pozycji z literatury przedmiotu. W pracy jest także zamieszczone podsumowanie wyników, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów.

Wniosek końcowy

Analizując wyniki badań Doktorantki uważam że cel badań wytyczony na wstępie pracy został zrealizowany.



Praca doktorska p. mgr inż. Małgorzaty Marszałek spełnia wszelkie wymogi określone w art 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki(DzU z 2017r.poz.1789).Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Rolnictwa i Bioinżynierii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie p.mgr.inż Małgorzaty Marszałek do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, dyscyplina biotechnologia.

Prof.dr hab. Anna Goździcka-Józefiak