

Recenzja rozprawy doktorskiej pt.

**„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” - monografia,
Autorką rozprawy jest Pani mgr Małgorzata Marszałek ubiegająca się o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie **biotechnologia****

Recenzja wykonana na zlecenie Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje wyniki badań realizowanych w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Zakładzie Biotechnologii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Daniel Lipiński, a promotorem pomocniczym: dr Karolina Wielgus. Autorka rozprawy wskazuje, że przedstawione badania wykonano m.in. dzięki wsparciu z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu Badań Stosowanych (umowa PBS1/A8/9/2012) pt. „Opracowanie innowacyjnej technologii produkcji bioetanolu II generacji z biomasy sorgo (*Sorghum* sp.) i miskanta (*Miscanthus* sp.)”. Akronim: „SORMISOL”. Rozprawa doktorska została przedstawiona jako monografia. Wyniki jak się wydaje nie zostały opublikowane.

Rozprawa obejmuje przegląd literatury, cel badań, materiał i metody, omówienie wyników, podsumowanie i wnioski i zajmuje łącznie 116 stron. Ponadto, rozprawę uzupełniają streszczenia w j. polskim i angielskim, spis treści, wykaz skrótów, spis tabel i spis 190 pozycji cytowanej w rozprawie literatury naukowej.

Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest bardzo ciekawa i wpisuje się w główne nurty badawcze Zespołów pracujących nad modyfikacją genetyczną w celu zwiększenia zawartości sacharozy jako surowca do produkcji etanolu. Praca dotyczy tytoniu jako modelu badawczego i sorga, które w wielu regionach Afryki jest podstawową rośliną uprawną i jedynym źródłem mąki, a w Europie zyskuje na znaczeniu. Ziarno sorgo cechuje wysoka wartość odżywcza co powoduje, że jest wykorzystywane w celach konsumpcyjnych oraz jako pasza, a także jako biomasa.

Problematyka, którą zajmuje się Kandydatka ma niewątpliwie duże znaczenie dla rozwoju nie tylko jak można by sądzić, nauk podstawowych, lecz także zastosowań osiągnięć

współczesnej biologii molekularnej w doskonaleniu odmian roślin uprawnych poprzez hodowlę roślin. Hodowla roślin liczy sobie wiele tysięcy lat, ale dopiero pod koniec XIX wieku opisano na czym polega zapłodnienie u roślin. Stanowiło to podstawę do wprowadzenia nowoczesnych i skutecznych metod hodowli.

W Europie środkowej i północnej niezbędne jest wyhodowanie odmian sorgo charakteryzujących się odpowiednią wczesnością dla warunków Polski, plenne i przystosowane do zmechanizowanej uprawy. Polepszające się warunki klimatyczne, dobre wyniki plonowania u rolników, rozwój rolnictwa ekologicznego spowodują zapewne wzrost zainteresowania tym gatunkiem zarówno ze strony hodowców jak rolników. We wstępie Autorka wymienia „odmiany” guinea i durra i caudatum, które to nazwy podawane są w literaturze jako synonimy nazwy gatunkowej *S. bicolor*, ale na pewno nie są to odmiany, bo odmiana ma swoje znaczenie i definicję w hodowli roślin.

W rejestrze w COBORU brak jest jakichkolwiek odmian sorgo natomiast we wspólnotowym katalogu odmian roślin rolniczych znajduje się ok. 200 odmian *Sorghum bicolor*, 18 odmian *Sorghum sudanense* oraz ok 50 odmian pochodzących ze skrzyżowania poprzednio wymienionych dwóch gatunków. Odmiany te pochodzą z hodowli włoskich, francuskich, węgierskich, rumuńskich, hiszpańskich. Niskie zainteresowanie tym gatunkiem ze strony rolników polskich podyktowane jest zapewne faktem, że sorgo nie może konkurować w naszych warunkach z kukurydzą. Ze względu na swoje walory, a głównie odporność na niedobory wody nadaje się do uprawy w warunkach marginalnych, na lekkich glebach i dotąd nieuprawianych polach.

W świecie uprawa sorgo rozciąga się na ponad 70 krajów i zajmuje ok. 40 mln hektarów, a atrakcyjność waha się chociaż gatunek ten cechuje duża odporność na wysokie temperatury i susze, co może być istotnie w warunkach ocieplającego się klimatu Europy. Wartość odżywcza sorgo jest porównywalna z kukurydzą. W ostatnich latach powierzchnia uprawy w Polsce wzrosła, ale tylko do poziomu 4,2 tys. hektarów w tym roku, co w porównaniu z uprawą kukurydzy na powierzchni 1mln 200 tys. ha jest powierzchnią znikomą. Może się to zmienić zważywszy na oszczędną gospodarkę wodną oraz małe zapotrzebowanie na składniki pokarmowe w glebie. W Europie spodziewany jest dalszy postęp w hodowli odmian wcześniej dojrzewających w warunkach klimatu umiarkowanego.

Rozdział pracy pt. „Wprowadzenie literaturowe” miał za zadanie wskazanie na rolę sorgo we współczesnej gospodarce rolnej i żywnościowej, a przez to na wagę badań podjętych przez Panią Małgorzatę Marszałek. Możliwych aspektów badawczych dotyczących uprawy sorgo w nowych dla niego szerokościach geograficznych jest niezwykle wiele, ale Autorka skupia się na możliwościach wykorzystania sorgo jako surowca do produkcji bioetanolu. Rozdział obejmuje pięć podrozdziałów. Doktorantka omawia problematykę fotosyntezy, metabolizmu sacharozy, biopaliw, roślin energetycznych i sorgo jako źródła bioetanolu i uprawy sorgo na świecie i w Europie. Opisana problematyka tylko częściowo dotyczy meritum pracy jakim jest uzyskanie transgenicznych roślin wykazujących działanie wprowadzonych genów. Dlatego moim zdaniem należało wprowadzić czytelnika w problematykę roli genów użytych w części eksperymentalnej, ale nie w tak szerokim zakresie. W przeglądzie literatury brak jest natomiast wprowadzenia dotyczącego samych transformacji, może też transformacji tytoniu, która ma swoją 40 letnią historię. Brak też przeglądu literatury na temat kultur *in vitro* sorgo i jego transformacji, a w efekcie doświadczenia tak nad regeneracją roślin z sorgo jak i

transformacją przeprowadzono nie stosując najbardziej w tych celach nadających się eksplantatów jakimi są niedojrzałe zarodki z ich liścieniem – tarczką. (Flinn et al. 2020 Plants, Ahmed et al. 2022, Asian J Agric & Biol.). Zastosowano kalus z osi zarodkowych (4.14.4) zamiast tarczki zarodka, która jak rozumiem była odrzucana.

Brak tu też informacji o tym, że w pracy chodzi o przeniesienie genów kodujących enzymy szlaku syntezy sacharozy z sorgo do tytoniu. Dopiero w wynikach na str. 64 powiedziane jest, że materiał pobierany był z siewek sorgo.

W rozdziale „materiały” opisano szczepy bakteryjne, zastosowane odczynniki chemiczne i pożywki do hodowli bakterii i kultur *in vitro* eksplantatów roślinnych. Następnie w rozdziale „metody” szczegółowo opisano kolejne etapy przygotowania badań od izolacji DNA, poprzez klonowanie DNA po przygotowanie *Agrobacterium tumefaciens* z konstrukcjami genowymi po transformację, kultury *in vitro* i regenerację transformantów. W badaniach wykorzystano jeden genotyp tytoniu i 4 sorgo, ale nie wiadomo co kierowało Panią Doktorantką w tym wyborze?

Zasadniczym elementem przedstawionej pracy jest rozdział „wyniki”, nad którego omówieniem zatrzymam się na dłużej. Przygotowano trzy konstrukcje genowe (pBI121-SPP; pBI121-UGP; pBI121-SuSy) zawierające geny kodujące enzymy zaangażowane w szlak syntezy sacharozy: gen fosfatazy sacharozo-6-fosforanu (SPP), gen pirofosforylasy UDP-glukozy (UGPaza,) i syntazy sacharozy (SuSy,). Konstrukcje genowe uzyskano poprzez wprowadzenie cDNA wymienionych genów do wektora docelowego pBI-121. Wektor binarny pBI-121 zawiera promotor konstytutywny CaMV35S, umożliwiający ekspresję kontrolowanej sekwencji. Dodatkowo plazmid pBI-121 zawiera gen fosfotransferazy neomycyny (npt II) warunkujący oporność na antybiotyk kanamycynę umożliwiającą selekcję oraz gen reporterowy β -glukuronidazy (GUS). Ten fragment pracy zasługuje na wysoką ocenę ponieważ Autorce udało się uzyskać konstrukty, które w procesie transformacji okazały się skuteczne co często nie jest oczywiste. W tym wypadku potwierdzono przy pomocy PCR obecność wprowadzonych genów w genomie tytoniu. Badania nad transformacją sorgo nie powiodły się moim zdaniem dlatego, że system regeneracji roślin w kulturach *in vitro* był nieefektywny.

Dyskusja powinna dotyczyć tego co robiono w pracy, a nie potencjalnych możliwości wykorzystania roślin do produkcji etanolu o czym już była mowa we wstępie.

Problemem tej pracy jest dość nieporadne tłumaczenie informacji z literatury na język polski. Oto przykład: „Rośliny można zebrać przez koszenie, gdy osiągną wysokość 50 cm, pozostawiając pnie do odrośnięcia, które utworzą gęsty pęd i liście w ciągu kilku dni. Młode pędy zawierają najwięcej cukru i białka w cyklu wzrostu rośliny”. O pędach tytoniu trudno mówić, że to „pnie” no i tworzenie „gęstych pędów” też jest zagadkowe, tak jak „cukier i białko w cyklu wzrostu”. Kiedy już w końcu na stronie 117 zaczynamy czytać o dokonaniach tej pracy to okazuje się, że następuje powtórzenie wyników, a nie dyskusja z danymi literaturowymi. Jeśli efektem tej pracy jest opracowanie systemu regeneracji sorgo w kulturach *in vitro* to dlaczego wyniki tych prac są opisywane w „dyskusji” (6.2), a nie w rozdziale „wyniki”? i nie wiadomo czy to co jest krótko opisane na str 121 dotyczy rzeczywiście izolowanych zarodków czy tylko izolowanych osi zarodkowych?

Na koniec zobowiązany jestem wskazać, że w rozprawie znalazło się wiele błędów literowych i gramatycznych. Wszystkich nie wymienię, ale kilka przykładowo: str 9, „zbadanie ekspresji

transgenu na poziomie mRNA oraz określenie liczny kopii wbudowanego transgenu”, str. 13 „Wydajność wiązania CO₂ jest obniżania w wyniku reakcji fotooddychania”, str.16 „Najlepiej zaadoptowane do środowiska” str.17 ” Rośliny klimatu suchego egzystują w ekstremalnych warunkach dzięki przystosowaniu fizjologicznemu, rozdzieleniu reakcji zależnych od światła i wykorzystaniu CO₂ w cyklu Calvina w przestrzeni.” „CO₂ jest przyswajany do szczawiooctanu”. „dochodzi do uwolnieniu CO₂”.str.19 „przenoszonym do zrębu chloroplastowego”, str.29 „poszukiwanie alternatywnych źródeł energii, które dają obietnicę bezpieczeństwa energetycznego i zrównoważonego rozwoju”, str.31 „etanol celulozowy może przyczynić się do..... dostaw energii i jednocześnie przynieść obietnicę bezpieczeństwa energetycznego”, „biopaliwa mają przewagę w obszarach innowacyjności, technologii produkcji oraz działań promocyjnych i marketingowych” – nad czym mają przewagę?, str.37” identyfikacja procesów akumulacji sacharozy pomaga również udoskonalić cele w zakresie poprawy i stabilizacji plonów ziarna sorgo”.str.70 „Na rycinie 17 przedstawiono analizę regionu kodującego gen fosfatazy sacharozofosforanu *Sorgo bicolor* z bazy GenBank (nr referencyjny XM_021447000.1) oraz sekwencję klonu 72 (BLAST®)”... Itd. Nie wiadomo co ma oznaczać powtarzający się dwa razy tekst : „Optymistyczne wydaje się wykorzystanie całych roślin tytoniu i odpadów organicznych jakie generuje przemysł tytoniowy z przeznaczeniem do produkcji bioetanolu II generacji.” Bez wyjaśnienia co Autorka ma na myśli i jaki jest kontekst tej informacji? Jest ona podana także we wniosku nr 7, który nie dotyczy tytoniu, ale sorgo. Takich błędów jak przytoczone powyżej jest wiele i nie będę ich wszystkich przytaczał. Praca wymaga gruntownego przerehabilitowania.

Chciałbym prosić Doktorantkę o wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony następujących kwestii:

1. Dlaczego w analizie transformantów tytoniu nie wykorzystano obecności w konstrukcie genu glukuronidazy? Produkt tego genu daje spektakularny efekt w postaci niebieskiego zabarwienia tkanki i jest na ogół pierwszym choć nie ostatecznym sposobem selekcji transformantów.
2. Dlaczego nie udowodniono transformacji poprzez hybrydyzację DNA typu Southern?
3. Dlaczego nie zastosowano w badaniach nad regeneracją sorgo kultury niedojrzałych zarodków, o których zresztą pisze Pani na stronie 99 i potem na 121 w dyskusji, a tylko kallus z osi zarodkowych (4.14.4)?
4. Dlaczego nie sprawdzono w potomstwie transformantów czy wprowadzone geny wpływają na poziom sacharozy w roślinach tytoniu? Wstęp sugeruje, że o to właśnie chodziło w tej pracy.
5. Dlaczego zamieszczono trzy fotografie pokazujące tę samą analizę Ryc. 42
6. Proszę o wyjaśnienie dlaczego w pracy wielokrotnie pisze pani o zagospodarowaniu odpadów, a nie o prostym wykorzystaniu plonu roślin na cele energetyczne? Tym bardziej, że potem pisze Pani o plonie zielonej masy tytoniu z hektara, a nie o odpadach.

Komentarz

Mimo zgłoszonych uwag chcę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji praca doktorska zajmuje się niezwykle ważnym aspektem wykorzystania roślin rosnących w zmiennych warunkach środowiskowych do produkcji niskoemisyjnego bioetanolu. Dzięki wyposażeniu organizmów w mechanizmy przystosowawcze nie musimy dziś zrzucić winy za niepowodzenia upraw na zmiany klimatyczne. W minionych epokach zdarzało się jednak, że stresy środowiskowe przyczyniały się do kataklizmów o dużej skali. Oznacza to, że społeczność świata powinna czuć się zobowiązana do kontrolowania i korygowania zmian klimatycznych. Wydaje się, że stresy środowiskowe są w jakiejś mierze zależne od sposobów pozyskiwania energii, ale ta kwestia w różnych częściach globu jest różnie postrzegana.

Podsumowanie

Stwierdzam że Doktorantka wykazała się znajomością szeregu metod badawczych, głównie w obszarze biologii molekularnej, które skutecznie wykorzystywała aby osiągnąć cel swej pracy doktorskiej. Potrafiła skutecznie wykorzystać i połączyć metody roślinnych kultur *in vitro* z zaawansowanymi technikami biologii molekularnej i bioinformatyki. Realizując swą pracę doktorską pokazała, że potrafi prowadzić badania. Zrealizowała swoje zamierzenia poprzez skuteczne wprowadzenie konstruktów genowych do tkanek tytoniu i potwierdzenie ich obecności. Nie powiodło się to w przypadku sorgo, ale też w nauce nie wszystkie prace kończą się spodziewanym sukcesem. Uważam, że Doktorantka jest przygotowana do prowadzenia prac badawczych w obszarze współczesnej biotechnologii roślin. Sposób zredagowania pracy pozostawia wiele do życzenia.

Wniosek końcowy

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, w zakresie prób zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. Małgorzaty Marszałek pt. „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” spełnia kryteria określone w art. 13 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. — Przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669), z późniejszymi zmianami. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej dyscypliny Biotechnologia, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Małgorzaty Marszałek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Radzików 20.11. 2024r.

Recenzent
Janusz Zimny