

Prof. dr hab. Agnieszka Sirko  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
ul. Pawińskiego 5A  
02-106 Warszawa

Warszawa, 2015-06-14

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Siwińskiej pt.: „Zmienność naturalna *Arabidopsis thaliana* jako narzędzie w badaniach molekularnych podstaw biosyntezy kumaryn”**

Praca została wykonana w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem ocenianej rozprawy jest prof. dr hab. Ewa Łojkowska, promotorem pomocniczym - dr Anna Ilnatowicz. Badania opisywane w rozprawie doktorskiej mgr Siwińskiej miały na celu lepsze poznanie szlaku biosyntezy kumaryn poprzez: (1) oznaczenie zmienności naturalnej w zakresie akumulacji kumaryn (skopoletyny i skopoliny) w korzeniach 28 ekotypów *Arabidopsis thaliana*, (2) wybranie na tej podstawie odpowiedniej populacji mapującej i przeprowadzenie mapowania QTL, (3) wytypowanie, na podstawie mapowania QTL, regionów w genomie a następnie genów kandydujących, odpowiadających za zmienność poziomu badanych kumaryn oraz (4) scharakteryzowania wybranych genów kandydujących i ich produktów.

Układ rozprawy jest dość typowy - zawiera następujące części: Wstęp, Cel Pracy, Materiał i Metody, Wyniki połączone z Dyskusją, Podsumowanie, Wnioski, Referencje oraz Aneks z siedmioma załącznikami. Napisana w języku polskim rozprawa poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim. Rozprawa zawiera także spis treści, wykaz skrótów w układzie alfabetycznym oraz spis tabel i rycin, przy których niestety nie podano numerów stron.

We wstępie autorka omawia najpierw budowę i funkcję biologiczną kumaryn, właściwości i rodzaje związków kumarynowych w różnych roślinach, schemat biosyntezy oraz enzymy biorące udział w biosyntezie kumaryn u *A. thaliana*. W kolejnych częściach wstępu mgr Siwińska koncentruje się na zjawisku zmienności naturalnej u *A. thaliana* oraz metodach

badania tej zmienności prowadzących do poznania genetycznego podłoża cech ilościowych (charakteryzujących się zmiennością ciągłą). Autorka w przystępny i zwięzły sposób omawia metody mapowania QTL (loci cech ilościowych; ang. Quantitative Trait Loci), wyjaśnia podstawowe pojęcia związane z mapowaniem genetycznym, nazwy różnych rodzajów populacji mapujących, opisuje metody mapowania QTL, w tym metody CIM i MQM, którymi posługiwała się w pracy oraz wykorzystywane do detekcji regionów QTL programy komputerowe. „Wstęp” dobrze przygotowuje czytelnika do zrozumienia dalszej części rozprawy doktorskiej. Jednocześnie chciałam podkreślić, że ta część rozprawy potwierdza dobre opanowanie przez doktorantkę omawianych zagadnień oraz umiejętność ich logicznego przedstawienia.

W rozdziale „Materiały i Metody” doktorantka najpierw opisuje materiał roślinny oraz procedury związane z przygotowaniem materiału roślinnego. Docenić należy przede wszystkim dokładny i szczegółowy opis warunków hodowli roślin oraz podanie wielu istotnych, (ale często pomijanych przez badaczy) informacji związanych z przygotowaniem materiału roślinnego. Informacje te umożliwiają powtórzenie eksperymentu z zachowaniem tych samych warunków, co może mieć istotne znaczenie przy oznaczaniu poziomu metabolitów wtórnych. Następnie opisywane są metody identyfikacji kumaryn, od dość prostej metody chromatografii cienkowarstwowej (TLC), wykonywanej osobiście przez doktorantkę do metod znacznie bardziej skomplikowanych, takich jak chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas [GC-MS], wysokosprawna chromatografia cieczowa [HPLC] i ultrasprawną chromatografią cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas [UPLC-MS]) wykonywanych w dedykowanych laboratoriach. Metoda QTL opisana jest w dwóch częściach, (1) QTL do mapowania danych uzyskanych przy użyciu TLC oraz (2) QTL do mapowania danych uzyskanych z analiz HPLC. W dalszej części następuje opis stosowanych metod biologii molekularnej i metod biochemicznych. Rozdział „Materiały i Metody” został przygotowany bardzo rzetelnie.

Następną częścią rozprawy jest rozdział „Wyniki i Dyskusja”. Jest to najbardziej obszerna część rozprawy obejmująca prawie 60 stron, 40 rycin i 11 tabel. Byłam nieco zaskoczona faktem połączenia przez mgr Siwińską Wyników i Dyskusji w jeden rozdział, ponieważ rozprawa stała się w ten sposób znacznie mniej przejrzysta. Rozdział „Wyniki i dyskusja” został podzielony na 5 części. W pierwszej części doktorantka opisuje mapowanie QTL na podstawie wyników oznaczenia poziomu kumaryn metodą TLC (zastosowana została tutaj

jedna metoda mapowania). W wyniku tego mapowania zidentyfikowano dwa regiony QTL zlokalizowane odpowiednio na chromosomie 1 i 3. W następnej części znajduje się opis identyfikacji skopoletyny i skopoliny za pomocą HPLC. Część trzecia zawiera opis mapowania QTL na podstawie wyników oznaczenia opisanego w części poprzedniej. W tym przypadku analiza QTL prowadzona była (niezależnie dla poziomu skopoletyny i poziomu skopoliny) za pomocą dwóch metod. Metoda CIM pozwoliła na zidentyfikowanie 5 regionów QTL warunkujących poziom skopoletyny (po jednym na każdym chromosomie) oraz dwóch regionów QTL warunkujących poziom skopoliny (na chromosomie 1 i 5). Metoda MQM pozwoliła na zidentyfikowanie 5 regionów QTL warunkujących poziom skopoletyny (po dwa na chromosomie 1 i 3 oraz jeden na chromosomie 5) oraz jednego dla skopoliny na chromosomie 5. W następnej części opisano analizę genów kandydujących w wytypowanych trzech zbiorach QTL: (1) metodą MQM na podstawie analizy TLC, (2) metodą CIM na podstawie analizy HPLC i (3) metodą MQM na podstawie analizy HPLC. W każdym przypadku wybrano szereg mutantów insercyjnych w genach kandydujących (kodujących zarówno czynniki transkrypcyjne jak i enzymy), w korzeniach tych mutantów oznaczono poziom skopoletyny a następnie przeanalizowano kilka najbardziej obiecujących genów kodujących enzymy. Ostatnia, piąta część tego rozdziału jest najbardziej obszerna i dotyczy charakterystyki biologicznej roli wybranych dioksygenaz. Wynika to z faktu, iż gen kodujący enzym należący do rodziny dioksygenaz został wytypowany w trakcie mapowania QTL oraz z faktu, że z danych literaturowych wynikało, że dwie inne dioksygenazy odpowiedzialne są za ostatni etap syntezy skopoletyny. Ponadto, opisane w tej części badania pozwoliły na scharakteryzowanie funkcji biologicznej jednego z enzymów należących do rodziny dioksygenaz, jako hydroksylazy 8-skopoletyny (SH8). Powstający produkt, fraksetyna, jest związkiem chelatującym  $Fe^{2+}$ . Wyniki opisane w rozprawie oraz dane literaturowe jednoznacznie wskazują na wiodącą rolę kumaryny w kontroli pobierania żelaza przez rośliny. Interesuje mnie czy i w jakim kierunku kontynuowane będą badania dotyczące tego zagadnienia.

Moje główne uwagi krytyczne związane z rozdziałem „Wyniki i Dyskusja” dotyczą użycia myląco niejednoznacznych nazw zidentyfikowanych regionów QTL (w trzech niezależnych zbiorach uzyskanych w wyniku trzech analiz QTL). Ten sposób oznakowania regionów QTL nie tylko utrudnia zrozumienie pracy, ale także komplikuje opis wyników, ponieważ niejednoznaczna numeracja zmusza autorkę do ich opisowej identyfikacji.

Pod względem edytorskim rozprawa została przygotowana starannie. Opisy rycin i tabel są jasne. Tekst zawiera bardzo niewiele literówek np. na str.100 słowo „kandydujący” powinno zostać zastąpione słowem „koduujący”, na str. 130 brakuje „n” w wyrazie „kumaryn”. Inne drobne uwagi wymieniane z obowiązku recenzenta to: wspomniany już wyżej brak odnośników do stron w spisie tabel i rycin oraz niejednorodność w sposobie cytowania literatury (zależnie od czasopisma autorka podaje numer zeszytu lub nie, po numerze tomu jest dwukropek, średnik lub nie ma żadnego znaku, czasem jest podany tylko rok publikacji a czasem pełna data itp.).

Wspomniane powyżej uwagi krytyczne nie umniejszają wartości rozprawy. Stwierdzam, że przedstawione w rozprawie wyniki są oryginalne i stanowią istotny wkład nie tylko w badanie molekularnych podstaw biosyntezy kumaryn, ale także w określenie roli tych metabolitów wtórnych w regulację pobierania żelaza przez rośliny. Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia ustawowe warunki dotyczące przyznania tytułu doktorskiego i z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o dopuszczenie pani mgr Joanny Siwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Agnieszka Sirko