

**Załącznik 2**

**AUTOREFERAT**

**Dr Walentyna Banaś**

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Wydział Przyrodniczy

Instytut Biologii

Katedra Fizjologii Roślin i Genetyki

Ul. Prusa 12

08-110 Siedlce

**1. Imię i nazwisko:**

Walentyna Banaś

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

**2000** – doktor nauk rolniczych, tytuł uzyskany na Wydziale Rolniczym Akademii Podlaskiej w Siedlcach na podstawie rozprawy doktorskiej: „Wpływ graminicydów na wybrane procesy fizjologiczno-biochemiczne traw”. Promotor: prof. dr hab. Bogumił Leszczyński; recenzenci: prof. dr hab. Janina Skrzyczyńska i prof. dr hab. Andrzej Podstolski.

**1978** – magister biologii (specjalizacja: biologia nie-nauczycielska), Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Gdański. Promotor: prof. dr hab. Hanna Piotrowska

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

**2000 - do chwili obecnej** – adiunkt w Katedra Fizjologii Roślin i Genetyki; Instytut Biologii, Wydział Przyrodniczy, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

**1993–2000** – asystent w Katedrze Fizjologii Roślin; Instytutu Biologii, Wydział Rolniczy, Akademia Podlaska w Siedlcach

**1979–1982** – pracownik inżynierijno-techniczny, asystent stażysta i kolejno asystent w Zakładzie Botaniki; Instytut Biologii, Wydział Rolniczy, Wyższa Szkoła Rolniczo-Pedagogiczna w Siedlcach

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):****a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

„Biochemiczne podstawy ulepszania roślin oleistych; enzymy ostatniego etapu biosyntezy tłuszczów zapasowych”

**b) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:**

1) Ståhl, U., Carlsson, A. S., Lenman, M., Dahlqvist, A., Huang, B., **Banaś, W.**, Banaś, A., Stymne, S. 2004. Cloning and Functional Characterization of Phospholipid: Diacylglycerol Acyltransferase from Arabidopsis. **Plant Physiol.** 135: 1324-1335. [IF<sub>2004</sub> = **5,881**; IF<sub>2012</sub> = **6,555**; MNiSW<sub>2013</sub> = **45pkt.**, mój udział procentowy szacuję na **25%**]

2) Banaś, A., Carlsson, A. S., Huang, B., Lenman, M., **Banaś, W.**, Lee, M., Noiriel, A., Benveniste, P., Schaller, H., Bouvier-Navé, P., Stymne, S. 2005. Cellular sterol ester synthesis in plants is performed by an enzyme (phospholipid:sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian Acyl-CoA:sterol acyltransferases. **The Journal of Biological Chemistry (JBC)**, 280 (41): 34626-34634. [IF<sub>2005</sub> = **5,854**; IF<sub>2012</sub>, = **4,651**, MNiSW<sub>2013</sub> = **35pkt.**, mój udział procentowy szacuję na **25%**]

3) Neal, A., Banaś, A., **Banaś, W.**, Ståhl, U., Carlsson, A. S., Stymne, S. 2006. Microsomal preparations from plant and yeast acylate free fatty acids without prior activation to acyl-thioesters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, 1761: 757-764. [IF<sub>2006</sub> = **3,117**; IF<sub>2012</sub>, = **4,134**, MNiSW<sub>2013</sub> = **35pkt.**, mój udział procentowy szacuję na **25%**]

4) **\*Banaś, W.**, Sanchez Garcia, A., Banaś, A., Stymne, S. 2013. Activities of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) in microsomal preparations of developing sunflower and safflower seeds. **Planta**, 273: 1627-1636. [IF<sub>2012</sub>, = **3,347**, MNiSW<sub>2013</sub> = **40pkt.**, mój udział procentowy szacuję na **75%**]

5) Furmanek, T., Demski, K., **\*Banaś, W.**, Haslam, R., Napier, J., Stymne, S., Banaś, A. 2014. The utilization of acyl-CoA and the involvement of PDAT and DGAT in the biosynthesis of erucic acid rich triacylglycerols in crambe seed oil. **Lipids**, 49:327-333. [IF<sub>2012</sub> = **2,557**; MNiSW<sub>2013</sub> = **25pkt.**, mój udział procentowy szacuję na **25%**]

6) **\*Banaś, W.**, Carlsson A., Banaś A. 2014. Effect of overexpression of PDAT gene on Arabidopsis growth rate and seed oil content. **Journal of Agricultural Science**, 6 (5): 65-75. [IF = **0**, MNiSW<sub>2013</sub> = **0 pkt.**, mój udział procentowy szacuję na **80%**]

\* - publikacje, w których jestem autorem korespondencyjnym

Sumaryczny IF z roku wydania = **20,756** (sumaryczny IF z 2012 roku = **21,247**)

Łączna liczba punktów MNiSW = **180**

**c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

Osiągnięcie naukowe stanowi cykl sześciu oryginalnych publikacji naukowych opublikowanych w latach 2004-2014, z których pięć opublikowane jest w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports. Sumaryczny impact factor zgodny z rokiem wydania wynosi 20,756 (sumaryczny IF z 2012 roku = 21,247), a liczba punktów MNiSW wynosi 180. W pierwszych trzech publikacjach jestem jednym z współautorów, a w kolejnych trzech pierwszym autorem (lub równoważnym z pierwszym – publikacja nr.5) oraz autorem korespondencyjnym.

Tłuszczami zapasowymi najczęściej występującymi w świecie roślin są triacyloglicerole (TAG). Występują one zazwyczaj w nasionach roślin, ale spotykamy je również w innych organach roślinnych między innymi w ziarnach pyłku, niektórych owocach czy bulwach. Do tłuszczów zapasowych zaliczamy również estry steroli (SE). Uważa się, że stanowią one formę rezerwową steroli. Magazynowane są w czasie, gdy następuje nadprodukcja wolnych steroli w stosunku do aktualnych potrzeb komórki, a mogą być uwalniane z formy estrowej, gdy zapotrzebowanie komórek na wolne sterole jest większe niż aktualna ich synteza *de novo*. Do tłuszczów zapasowych zaliczamy również woski (WE). Są to estry kwasów tłuszczowych i alkoholi pierwszorzędowych. Spośród roślin oleistych jedynie jojoba magazynuje je, jako główne tłuszcze zapasowe nasion. Wydaje się jednak, że mogą one być formą magazynowania nadmiaru wolnych kwasów tłuszczowych uruchamianych poprzez lipazy w wyniku zaistnienia stresu (wyniki zawarte w publikacji nr.3 osiągnięcia naukowego) również w innych tkankach roślinnych. Wspólną cechą wszystkich lipidów zapasowych/ magazynowych jest to, że nie stanowią one komponentu strukturalnego membran biologicznych. W prezentowanym osiągnięciu naukowym badane były enzymy zaangażowane w ostatni etap biosyntezy omówionych form lipidów zapasowych.

Do stosunkowo niedawna uważano, że w ostatni etap biosyntezy triacylogliceroli zaangażowane są jedynie enzymy typu DGAT (acylo-CoA:diacyloglicerol acylotransferazy). W 2000 roku grupa profesora Stena Stymie z Szwedzkiego Uniwersytetu Rolniczego opublikowała jednak dane, że w proces ten może być zaangażowana również inna grupa enzymów wykorzystujących, jako donory kwasów tłuszczowych fosfolipidy

[Dahlqvist i in., PNAS (2000), 97 (12), 6497-6492]. Enzymom tym nadano nazwę PDAT (fosfolipid:diacyloglicerol acylotransferazy). W wymienionej publikacji przedstawiono jednak tylko dane odnośnie genu kodującego PDAT u drożdży oraz dane z badań biochemicznych sugerujących istnienie tego typu genów/enzymów u roślin. Wykorzystując homologię w stosunku do genu kodującego PDAT u drożdży, grupa ta sklonowała szereg genów homologicznych do drożdżowego genu kodującego PDAT z genomu Arabidopsis. Największą homologię do drożdżowego genu kodującego PDAT wykazywał gen At5g13640 (28% identyczności w składzie aminokwasów). Genem tym zostały transformowane rośliny Arabidopsis (badania opisane w **publikacji nr.1** osiągnięcia naukowego). Z pośród uzyskanych transformantów, wyselekcjonowano trzy o różnym poziomie ekspresji wprowadzonego genu (technika Northern). Wykazano również, że aktywność PDAT we frakcjach mikrosomalnych uzyskanych z korzeni i liści wyselekcjonowanych linii transgenicznych dobrze korelowała z ekspresją wprowadzonego genu. Stosując różne kombinacje radioaktywnych i nieradioaktywnych substratów (występujących oraz niewystępujących naturalnie w testowanym materiale biologicznym) wykazano bezspornie, że testowany gen odpowiada za syntezę enzymu typu PDAT. W kolejnych testach ustalono jego specyficzność substratową oraz organy roślinne, w których występowała jego ekspresja. Ustalono, że preferowanymi donorami kwasów tłuszczowych są fosfatydyloetanolamina i fosfatydylocholina. Badany enzym wykorzystywał kwasy tłuszczowe zlokalizowane w obu pozycjach (sn-1 i sn-2) szkieletu glicerolowego testowanych fosfolipidów, jednakże kwasy tłuszczowe zlokalizowane w pozycji sn-2 były wykorzystywane kilkakrotnie lepiej niż te zlokalizowane w pozycji sn-1. Enzym był zdolny do transferu z pozycji sn-2-fosfolipidu do diacyloglicerolu (akceptor kwasów tłuszczowych) szerokiego spektrum kwasów tłuszczowych jednakże preferowane były wielonienasycone kwasy tłuszczowe oraz kwasy tłuszczowe z grupami zawierającymi tlen (kwas rycynolowy, kwas wernolowy). Badania prezentowane w omawianej publikacji zmieniły poglądy dotyczące biosyntezy roślinnych triacylogliceroli. Udowodniły, że oprócz enzymów typu DGAT w proces ten włączone są enzymy typu PDAT. Późniejsze badania prowadzone w innych laboratoriach potwierdziły istnienie enzymów typu PDAT również w innych roślinach. Badania prezentowane w omawianej publikacji cytowane były do chwili obecnej około 100rotnie.

Względny udział enzymów typu DGAT i typu PDAT w biosyntezie triacylogliceroli nie został jak dotąd dokładnie określony. Próba wyłączenia jednego z genów odpowiedzialnych za biosyntezę bądź enzymów typu DGAT bądź typu PDAT nie była w stanie odpowiedzieć na to pytanie. Wyłączenie genu odpowiedzialnego za biosyntezę DGAT wywoływało, bowiem zwiększenie ekspresji genu odpowiedzialnego za biosyntezę PDAT i odwrotnie (przynajmniej u *Arabidopsis*). Jediną możliwością rozwiązania tego problemu stały się, więc badania biochemiczne. Badania te wymagają jednak dużego doświadczenia eksperymentatorów i odpowiedniego wyposażenia laboratoriów. Jak do tej pory ukazały się jedynie dwie publikacje dotyczące tego zagadnienia i obie (**publikacja nr 4** i **publikacja nr 5**) wchodzą w skład omawianego osiągnięcia naukowego. W **publikacji nr 4** badano akumulację triacylogliceroli w nasionach słonecznika i krokosza barwierskiego. Z rozwijających się nasion (w różnych stadiach rozwoju) przygotowywano również frakcje mikrosomalne i przeznaczano do badań aktywności enzymów typu DGAT i enzymów typu PDAT. Otrzymane w badaniach *in vitro* aktywności badanych enzymów korelowano z intensywnością biosyntezy triacylogliceroli w rozwijających się nasionach badanych roślin. Wykonane badania wykazały, że względny udział enzymów typu DGAT i typu PDAT w biosyntezie triacylogliceroli u różnych roślin może różnić się znacznie. U słonecznika np. dominujący udział w tym procesie wydają się mieć enzymy typu DGAT, a u krokosza udział PDAT jest już bardzo zbliżony do udziału DGAT albo nawet wyższy (w niektórych stadiach rozwojowych nasion). W badaniach wchodzących w skład **publikacji nr 4** osiągnięcia naukowego, testowano również specyficzność substratową enzymów typu DGAT i PDAT badanych roślin. Wykazano, że specyficzność ta nie zawsze jest zgodna z składem kwasów tłuszczowych występującym w triacyloglicerolach magazynowanych w nasionach badanych roślin. W pracy podjęto dyskusję tego problemu.

W **publikacji nr 5** osiągnięcia naukowego rośliną wykorzystywaną do badań był katrań abisyński. Jest to przemysłowa roślina oleista budząca duże zainteresowanie biotechnologów, jako że jest „bezpieczna” dla manipulacji genetycznych. Nie krzyżuje się z innymi roślinami uprawnymi, a jej olej wykorzystywany jest jedynie dla celów przemysłowych, ponieważ zawiera duże ilości kwasu erukowego, mającego niekorzystne działanie na organizm ludzki. Jednym z obecnych celów biotechnologii roślin oleistych jest podwyższenie zawartości kwasu erukowego w triacyloglicerolach tej rośliny. W badaniach prezentowanych w omawianej publikacji badano sposób akumulacji olejów w nasionach

katranu. Akumulację tłuszczów zapasowych korelowano z aktywnością enzymów typu DGAT i typu PDAT oraz z zawartością i składem frakcji acylo-CoA występującej w rozwijających się nasionach. Wykazano między innymi, że dominującą formą enzymów włączonych w biosyntezę triacylogliceroli u tej rośliny są enzymy typu DGAT. Badania z użyciem różnych substratów wykazały, że występują one w postaci dwu izoform (lub dwu różnych enzymów) o różnej specyficzności substratowej w stosunku do acylo-CoA. W początkowych etapach rozwojowych nasion dominowała izoforma wykazująca stosunkowo małe powinowactwo do erukoilo-CoA, a wyższe powinowactwo do pozostałych acylo-CoA. W czasie rozwoju nasion zwiększała swoją aktywność druga izoforma DGAT charakteryzująca się podwyższoną aktywnością w stosunku do erukoilo-CoA. Zwiększona aktywność tej izoformy zbiegała się z czasem podwyższonej akumulacji kwasu erukowego w nasionach. Badania te wykazały również, że czynnikiem limitującym ilość kwasu erukowego w syntetyzowanych triacyloglicerolach nie jest jego biosynteza. W frakcji acylo-CoA jego procentowa zawartość była zawsze wysoka; wyższa od jego zawartości w syntetyzowanych triacyloglicerolach. Badania wskazują więc, że jednym z czynników, który może limitować zawartość kwasu erukowego w triacyloglicerolach jest stosunkowo niska aktywność izoformy DGAT specyficznej w stosunku do erukoilo-CoA. Co się tyczy enzymów typu PDAT to wykazano, że ich aktywność znacznie wzrasta w późniejszych etapach rozwoju nasion (w tym czasie wzrasta również zawartość kwasu erukowego w fosfolipidach nasion katranu). Znaczenie fizjologiczne tego zjawiska będzie można określić po przeprowadzeniu dodatkowych badań dotyczących dokładnej specyficzności substratowej enzymów typu PDAT występujących w nasionach katranu abisyńskiego, oraz po określeniu lokalizacji (pozycja sn-1 czy sn-2) kwasu erukowego w fosfolipidach nasion katranu. Badania tego typu są planowane do wykonania.

Po odkryciu enzymów typu PDAT naukowcy zajmujący się biotechnologią roślin oleistych zaczęli wiązać nadzieje, że jego nadekspresja spowoduje zwiększoną akumulację triacylogliceroli w transformowanych roślinach. Na te oczekiwania duży wpływ miały badania z użyciem drożdży. U szczepów z nadekspresją genu kodującego PDAT zaobserwowano, bowiem zwiększoną akumulację tłuszczów zapasowych. Drożdże te akumulowały do 50% więcej triacylogliceroli niż odpowiadające im szczepy kontrolne [Dahlgvist i in., PNAS (2000), 97 (12), 6497-6492]. W badaniach prezentowanych w **publikacji nr 6** osiągnięcia naukowego podjęto, więc próbę oszacowania wpływu

nadekspresji genu kodującego PDAT w stosunku do roślin *Arabidopsis*. Badania przeprowadzono na dużej liczbie roślin tak, aby wykluczyć przypadkowość uzyskanych wyników. Wykazano, że zawartość lipidów (głównie to lipidy zapasowe) w przeliczeniu na miligram masy nasion, zarówno roślin transformowanych jak i kontrolnych była podobna. W doświadczeniach szklarniowych, gdzie oprócz zawartości lipidów w jednostce masy nasion badano również całkowitą ilość produkowanych nasion, wykazano, że całkowita ilość olei produkowanych przez rośliny transgeniczne była wyższa od całkowitej ilości olei produkowanych przez rośliny kontrolne średnio o około 20%. Wzrost produkcji olejów przez rośliny transformowane genem kodującym PDAT przypisany został jednak pośredniemu wpływowi PDAT objawiającemu się stymulującym wpływem na wzrost roślin *Arabidopsis*. Rośliny transformowane były, bowiem większe; sucha masa roślin oraz masa produkowanych przez nie nasion była większa od masy roślin kontrolnych oraz od masy produkowanych przez nie nasion odpowiednio, nawet o ponad 20%. W pracy wykazany został również stymulujący wpływ nadekspresji genu kodującego PDAT (wykazano korelację jego nadekspresji z aktywnością enzymu PDAT) na wzrost siewek *Arabidopsis* w kulturach sterylnych oraz na kiełkowanie nasion. Stymulujący wpływ nadekspresji genu kodującego PDAT na wzrost roślin był efektem niespodziewanym. W pracy podjęto próbę wyjaśnienia przyczyn tego zjawiska. W badaniach wykonywanych równoległe w innych laboratoriach wykazano, że nadekspresja genu kodującego PDAT może zwiększać akumulację triacylogliceroli w liściach *Arabidopsis* [Fan i in. (2013), *Plant J.*, 76 (6), 930-942; Fan i in. (2013), *Plant Cell*, 25 (9), 3506-3518]. Tak, więc, gen/enzym ten może być przydatny do uzyskiwania roślin akumulujących lipidy zapasowe w częściach wegetatywnych (najnowsze trendy w biotechnologii olejów roślinnych). Nie można też wykluczyć, że nadekspresja genu kodującego PDAT w innych roślinach oleistych może powodować wzrost zawartości olejów w przeliczeniu na jednostkę masy nasion (nie jest, bowiem wiadomo czy nadekspresja genu kodującego PDAT powodować będzie obniżenie ekspresji genu kodującego DGAT, tak jak zauważono to u *Arabidopsis*).

Jednym z genów *Arabidopsis* wykazujących stosunkowo dużą homologię do genu kodującego drożdżowy PDAT był gen At1g04010. Początkowo przypuszczano, że koduje on białko o aktywności PDAT (acylotransferaza fosfolipid:diacyloglicerol). W badaniach z frakcją mikrosomalną z roślin *Arabidopsis* z nadekspresją tego genu nie udało się jednak wykazać podwyższonej aktywności PDAT w tych frakcjach. Wykonując zaś testy z różnymi



akceptorami kwasów tłuszczowych wykazano, że frakcje te wykazują wysoką aktywność w transferze kwasów tłuszczowych z fosfolipidów do wolnych steroli syntetyzując ich estry (**publikacja nr 2** osiągnięcia naukowego). W dalszych badaniach wyselekcjonowano linie transgeniczne charakteryzujące się różną ekspresją badanego genu (technika Northern) oraz wykazano korelację pomiędzy jego ekspresją, a aktywnością enzymatyczną badanych frakcji mikrosomalnych. Wykazano też, że wyciszenie genu At1g04010 powoduje znaczne obniżenie aktywności enzymatycznej (syntezy estrów steroli z dostarczonych substratów) frakcji mikrosomalnych uzyskanych z tego typu transgenicznych roślin Arabidopsis. Wszystkie te badania doprowadziły do wniosku, że gen At1g04010 koduje enzym odpowiedzialny za syntezę estrów steroli. Enzym ten nazwano PSAT (acylotransferaza fosfolipid:sterol). W dalszych badaniach określono specyficzność substratową badanego enzymu zarówno w stosunku do donora kwasów tłuszczowych (fosfolipidy) jak i do akceptora tych kwasów (sterole, związki pośrednie w syntezie steroli). Wykazano również, że u Arabidopsis jest to główny enzym włączony w syntezę estrów steroli. Enzym ten był aktywowany przez sterole i w aktywnej formie zwiększał swoją specyficzność w stosunku do związków pośrednich w syntezie steroli. Uznano więc, że jest włączony w regulację zawartości steroli w membranach biologicznych (duża ilość wolnych steroli powoduje zwiększoną aktywność enzymu w stosunku do intermediatów syntezy steroli; estryfikując je eliminuje z dalszych przekształceń – estry steroli eliminowane są z błon komórkowych – tym samym zmniejsza ilość syntetyzowanego produktu końcowego). Badania nad funkcją fizjologiczną PSAT były kontynuowane przez zespół, w którego skład wchodziłam podczas badań, które doprowadziły do powstania **publikacji nr 2** osiągnięcia naukowego, ale osobiście nie brałam już w nich udziału. Badania te zostały opublikowane w 2010 roku (Buwier-Nave i in., Plant Physiol. 152: 107-119).

Do czasu opublikowania danych zawartych w **publikacji nr 3** (osiągnięcia naukowego) uważano, że w reakcjach powstawania wiązań estrowych pomiędzy grupą COOH kwasów tłuszczowych a grupą hydroksylową odpowiedniego akceptora, kwasy tłuszczowe muszą ulec najpierw aktywacji (poprzez powstanie ich tioestrów z ACP lub CoA). W badaniach z frakcjami mikrosomalnymi z liści Arabidopsis wykazaliśmy jednak, że wolne kwasy tłuszczowe mogą być efektywnie wykorzystane do acylacji długołańcuchowych alkoholi. U Arabidopsis i u drożdży wykryliśmy również enzymy, które mogą efektywnie wykorzystywać wolne kwasy tłuszczowe (bez uprzedniej ich aktywacji)

do reakcji z etanolem tworząc odpowiednie estry etylowe kwasów tłuszczowych. Geny odpowiedzialne za syntezę tego typu enzymów nie zostały jak dotychczas sklonowane. Wykazaliśmy jednak, że aktywność tych enzymów wzrasta pod wpływem stresu np. traktowania graminicydami. Znaczenie fizjologiczne omawianych enzymów nie jest jak dotychczas wyjaśnione. Jednakże dane wykazujące wzrost ich aktywności w warunkach stresu mogą sugerować, że są to jedne z enzymów (których udział nie był do tej pory dyskutowany), które uczestniczą w odpowiedzi obronnej roślin na tzw. stres oksydacyjny. Wolne kwasy tłuszczowe uwalniane są często w warunkach stresowych i mogą być łatwo atakowane przez odpowiednie lipooksygenazy generując odpowiednie hydroksynadtlenki będące źródłem wolnych rodników. Identyfikacja genów kodujących omawiane enzymy jak również wyjaśnienie ich roli fizjologicznej wymagają dalszych badań.

Podsumowując można stwierdzić, że wszystkie badania prezentowane w omawianym osiągnięciu naukowym to badania z tzw. „frontu nauki”. Poszerzają one znacznie wiedzę na temat skomplikowanych mechanizmów metabolizmu lipidów roślinnych. W **publikacji nr 1** wykazano istnienie u roślin nowego szlaku biosyntezy triacylogliceroli oraz sklonowano i scharakteryzowano enzym odpowiedzialny za tą syntezę (PDAT). W **publikacji nr 2** sklonowano gen odpowiedzialny za biosyntezę enzymu odpowiedzialnego za syntezę estrów steroli (PSAT) oraz scharakteryzowano pod względem specyficzności substratowej kodowany przez niego enzym. Poddano również dyskusji funkcję fizjologiczną omawianego enzymu. W **publikacji nr 3** wykazano istnienie u roślin i drożdży enzymów wykorzystujących wolne kwasy tłuszczowe do syntezy wosków i estrów etylowych kwasów tłuszczowych (do tej pory uważano, że wolne kwasy tłuszczowe nie mogą brać udziału w takich reakcjach). W **publikacjach nr 4 i 5** pokazano zróżnicowany udział szlaku Kenediego (DGAT) i reakcji katalizowanej przez PDAT w biosyntezie triacylogliceroli u różnych roślin oleistych (do tej pory są to jedyne dane na ten temat). W **publikacji nr 6** wykazano zaś biotechnologiczne możliwości wykorzystania genów kodujących enzymy typu PDAT - inne niż początkowo zakładano. Wykazano, bowiem stymulujący wpływ nadekspresji tych genów, a co za tym idzie zwiększonej aktywności kodowanych przez nie enzymów, na kiełkowanie i wzrost roślin. Omawiane wyniki badań (publikacje od 1 do 6) oprócz poszerzenia wiedzy na temat metabolizmu lipidów roślinnym, służyć również mogą biotechnologom do planowania odpowiednich strategii ulepszania roślin, (szczególnie zaś roślin oleistych).

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Oprócz 6 publikacji składających się na „osiągnięcie naukowe” opisanych w punkcie 4 Autoreferatu, w dotychczasowym dorobku posiadam **15** dodatkowych oryginalnych publikacji naukowych i **jedną** przeglądowną (rozdział podręcznika akademickiego – obecnie w druku). **Trzy** z tych publikacji znajdują się w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, **sześć** w czasopismach naukowych innych niż znajdujących się w tej bazie oraz **siedem** w wydawnictwach książkowych (rozdziały monografii). Omawiane publikacje to publikacje kilku-autorskie lub dwu-autorskie.

Główny nurt badań prezentowanych w publikacjach nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego to badania dotyczące wpływu graminydów na wybrane procesy fizjologiczno biochemiczne roślin (ogółem 11 publikacji). Badania te wpisywały się/wpisują się w nurt badań nad mechanizmem działania tych herbicydów. Graminicydy wprowadzone zostały do praktyki rolniczej pod koniec lat 80-tych ubiegłego stulecia, ale do chwili obecnej trwa dyskusja nad sposobem w jaki niszczą one gatunki trawiaste. Istnieją obecnie dwie główne hipotezy sposobu ich działania. Pierwsza (bardziej rozpowszechniona) zakłada, że hamują one aktywność plastydowej karboksylazy acetylo-CoA (kluczowego enzymu biosyntezy kwasów tłuszczowych) traw, zaś nie wpływają na aktywność tego enzymu u roślin dwuliściennych. Hipoteza alternatywna zakłada zaś, że graminydy stymulują u roślin wrażliwych nadprodukcję wolnych rodników które to wywołują szereg uszkodzeń w reakcjach nazywanych ogólną nazwą „stressem oksydacyjnym”.

W dyskusjach nad mechanizmem działania graminydów wyklucza się obecnie różnice w absorpcji, translokacji czy metabolizmie tych herbicydów pomiędzy roślinami wrażliwymi i tolerancyjnymi jako przyczyny wrażliwości czy tolerancji na graminydy. Różnice te mogą wpływać jednak na zróżnicowane odpowiedzi gatunków wrażliwych na traktowanie. Badania nad absorpcją, translokacją i metabolizmem haloxyfopu-etylu w siewkach kukurydzy (rośliny wrażliwej na ten herbicyd) przedstawione zostały w **publikacji nr 9 punktu II D załącznika 4 (Banaś, W., Grzesiuk, A., Banaś, A. 2002. Absorption, translocation and metabolism of haloxyfop ethoxyethyl in maize seedlings. In "Proceedings of 5<sup>th</sup> International Conference: Ecophysiology of Plant Stress" (ed. M. Zima, K. Černa), pp.: 49- 50. Nitra, Slovakia).**

Do wysunięcia hipotezy sugerującej udział reakcji z udziałem wolnych rodników w mechanizmie działania graminicydów przyczyniły się między innymi badania z udziałem tzw. substancji antagonistycznych w stosunku do graminicydów. Substancje te podane razem z graminicydami hamowały lub opóźniały toksyczne działanie badanych herbicydów na rośliny wrażliwe. Charakteryzowały się albo właściwościami wyłapywania wolnych rodników albo hamowania, stymulowanego przez graminicydy, wzrostu stopnia nienasylenia kwasów tłuszczowych lipidów membranowych (uznawano, że wolne rodniki powstają właśnie na bazie wielo-nienasyconych kwasów tłuszczowych). W **publikacji nr 1 punktu II D załącznika 4** (Banaś, A., Stenlid, G., **Banaś, W.**, Stymne, S. 1995. Different response in sensitive grass species to treatment with haloxyfop. In „Proceedings of International Symposium on Weed and Crop Resistance to Herbicides” (ed. R. De Prado, J. Jorriin, L. Garcia Torres and G. Marshall), pp.: 50-52. University of Cordoba) oraz **publikacji nr 11 punktu II D załącznika 4** (**Banaś, W.**, Furmanek, T., Banaś, A. 2011. Effect of haloxyfop and alloxydim applied separately and in combination with salicylic acid, diphenylamine, or norflurazon on the root growth and fatty acid composition of the selected species of grasses and dicotyledonous plants. Acta Sci. Pol., Agricultura 10(3): 3-13) przedstawione zostały wyniki badań dotyczące tego zagadnienia. Testowano wpływ kwasu salicylowego (hamuje między innymi desaturazę  $\Delta 12$  – przekształcanie 18:1 do 18:2), difenyloaminy (wiąże wolne rodniki), kwasu dihydro-guaiaretic (wiąże wolne rodniki) oraz norflurazonu (hamuje desaturazę  $\Delta 15$  – przekształcanie 18:2 do 18:3) na aktywność alloksydymu i haloxyfopu (dwu przedstawicieli graminicydów). Badania potwierdziły wcześniejsze doniesienia odnośnie antagonistycznego oddziaływania tych substancji w stosunku do graminicydów - wykonane głównie na wrażliwej pszenicy – w stosunku do innych gatunków wrażliwych; szczególnie tych, u których graminicydy stymulowały wzrost zawartości wielo-nienasyconych kwasów tłuszczowych. Badania generalnie potwierdziły więc udział reakcji wolnorodnikowych w mechanizmie działania graminicydów.

W reakcję powstawania wolnych rodników na bazie kwasów tłuszczowych zaangażowane są lipooksygenazy (katalizują one powstawanie hydroksynadtlenków kwasów tłuszczowych). Enzymy te nie atakują jednak (lub wykazują bardzo słabe powinowactwo) kwasów tłuszczowych występujących w cząsteczkach lipidów. Aby stać się substratem lipooksygenaz kwasy tłuszczowe muszą zostać odłączone od cząsteczek lipidów. Wzrost aktywności acylohydrolaz/lipaz w roślinach traktowanych graminicydami został wykazany w **publikacji nr 7 punktu II D załącznika 4** (**Banaś, W.**, Klocek, J., Banaś, A. 1999.

Wpływ haloxyfopu na aktywność fosfolipaz w wierzchołkach korzeni kukurydzy i ryżu. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, z.469: 347-353), w **publikacji nr 1 punktu II A załącznika 4** (Banaś, A., Banaś, W., Stenlid, G., Stymne, S. 2000. Selective increase in acyl hydrolase activity by graminicides in wheat. *Biochemical Society Transaction*, 28 (6): 777-779), oraz w **publikacji nr 10 punktu II D załącznika 4** (Banaś, W., Olsson, P., Stymne, S., Banaś, A. 2007. Activities of phospholipid acyl hydrolase, wax ester synthetase and ethanol esters synthetase differ between young and mature parts of wheat roots and they are strongly activated by grass herbicides. In "Current Advances in the Biochemistry and Cell Biology of Plant Lipids" (ed. Ch. Benning, J. Ohlrogge), pp.: 142-146. Aardvark Global Publishing Company, LLC, Salt Lake City, UT [ISBN 978-1-4276-1965-5]).

Oprócz badań nad antagonistami graminicydów, podwyższonej aktywności lipaz i lipoksygenaz, również wzrost aktywności enzymów zaangażowanych w usuwanie wolnych rodników może świadczyć o wystąpieniu „stresu oksydacyjnego” w roślinach wrażliwych traktowanych graminicydami. Badania tego typu przedstawiono w **publikacji nr 3 punktu II D załącznika 4** (Mioduszevska, H., Wiloch, U., Banaś, W., Klocek, J., Banaś, A. 1997. The effect of haloxyfop on peroxidase activity in roots of wheat. *Proceedings of International Scientific Meeting „Ecophysiological aspects of plants responses to stress factors”*, pp.: 273-275, Kraków, Poland) i w **publikacji nr 5 punktu II D załącznika 4** (Kielak, E., Banaś, W., Mioduszevska, H., Dębski, H., Banaś, A. 1997. The effect of haloxyfop on growth and metabolic processes of duckweed (*Lemna minor*). *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej im. H. Kołłątaja w Krakowie* nr 318: 371-374 ) Wykazano w nich wzrost aktywności peroksydaz w wierzchołkowych częściach korzeni pszenicy (gdzie efekty działania graminicydów są najbardziej widoczne) oraz w roślinach rzęsy, pod wpływem działania haloxyfopu (przedstawiciel graminicydów). Wzrost aktywności syntaz wosków i syntaz estrów etanolowych kwasów tłuszczowych (enzymów wykorzystujących wolne kwasy tłuszczowe) pod wpływem traktowania graminicydami został przedstawiony w **publikacji nr 10 punktu II D załącznika 4** (Banaś, W., Olsson, P., Stymne, S., Banaś, A. 2007. Activities of phospholipid acyl hydrolase, wax ester synthetase and ethanol esters synthetase differ between young and mature parts of wheat roots and they are strongly activated by grass herbicides. In "Current Advances in the Biochemistry and Cell Biology of Plant Lipids" (ed. Ch. Benning, J. Ohlrogge), pp.: 142-146. Aardvark Global Publishing Company, LLC, Salt Lake City, UT [ISBN 978-1-4276-1965-5]). Wzrost aktywności tych enzymów można traktować również jako odpowiedź na wystąpienie/przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu jako, że eliminują wolne kwasy tłuszczowe (dyskusję dotyczącą tych enzymów przedstawiono przy omawianiu publikacji nr 3 osiągnięcia naukowego).

Główna hipoteza fitotoksycznego oddziaływania graminicydów na rośliny wrażliwe zakłada, że pierwotną przyczyną tej fitotoksyczności jest hamowanie aktywności karboksylazy acetylo-CoA, powodujące zahamowanie biosyntezy kwasów tłuszczowych. Efekt hamowania aktywności tego enzymu przez graminicydy w warunkach *in vitro* został bezspornie udokumentowany. W warunkach *in vivo* nie było to jednak już tak oczywiste. Badania prezentowane w **publikacji nr 6 punktu II D załącznika 4** (Banaś, A., Banaś, W., Stenlid, G., Klocek, J., Szymne, S. 1998. The inhibitory effect of graminicide-haloxyfop on *de novo* synthesis of fatty acids is only temporary. In "Advances in Plant Lipid Research" (ed. J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo, E. Martínez-Force), pp. 546-549. Secretariado de Publicaciones, Universidad de Sevilla, Sevilla) oraz w **publikacji nr 3 punktu II A załącznika 4** (Banaś, W., Furmanek, T., Banaś, A. 2012. Effect of haloxyfop and cerulenin on *de novo* biosynthesis of lipids in roots of wheat and maize. Acta Biochimica Polonica, 59 (4): 567-573) dotyczyły próby wyjaśnienia obserwowanych w badaniach wcześniejszych kontrowersji dotyczących tego zagadnienia. Udało się ustalić, że oba typy wyników uzyskiwanych w badaniach *in vivo* – silne hamowanie przez graminicydy biosyntezy *de novo* kwasów tłuszczowych i brak tego hamowania – da się wytłumaczyć na bazie otrzymanych wyników. Wykazano bowiem, że hamowanie przez haloxyfop (przedstawiciel graminicydów) biosyntezy *de novo* kwasów tłuszczowych bardzo wyraźne w pierwszych godzinach traktowania zanikało z czasem trwania doświadczenia i po 24 godzinach od rozpoczęcia doświadczenia obserwowano nawet zwiększoną biosyntezę *de novo* kwasów tłuszczowych w porównaniu do roślin kontrolnych. W omawianych publikacjach przedstawiono również wpływ badanego herbicydu na metabolizm lipidów korzeni testowanych gatunków wrażliwych. Wysłano wniosek, że hamowanie biosyntezy kwasów tłuszczowych może być jedną, ale nie jedyną przyczyną fitotoksyczności graminicydów. W publikacji **nr 3 punktu II A** testowano również wpływ ceruleniny (antybiotyku; znany inhibitor biosyntezy kwasów tłuszczowych) na metabolizm lipidów w korzeniach testowanych roślin. Pierwotnym założeniem miało być porównanie wpływu obu inhibitorów na metabolizm lipidów w korzeniach badanych gatunków. Wydaje się jednak, że uzyskane wyniki wniosły nowe informacje na temat mechanizmu działania tego antybiotyku. Wykazano bowiem, że hamuje on niezwykle silnie syntezę lipidu zidentyfikowany wstępnie jako kardiolipina – jednego z głównych lipidów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie membran mitochondrialnych. Wyniki tych badań powiązано z ostatnimi doniesieniami na temat mechanizmu działania

ceruleniny, w który to zaangażowana może być hexokinaza II – enzym powiązany z membranami mitochondrialnymi.

Badania dotyczące wpływu graminicydów na rośliny wrażliwe dotyczyły również ich wpływu na morfologię roślin traktowanych. Badania takie prezentowane są również w omawianym wykazie publikacji. Ich wyniki prezentowane są w **publikacji nr 2 punktu II D załącznika 4** (Grzesiuk, A., **Banaś, W.**, Klocek, J., Banaś, A. 1997. The effect of graminicides on cell division in root meristem of sensitive plant. Proceedings of International Scientific Meeting „Ecophysiological aspects of plants responses to stress factors”, pp.: 175-177, Kraków, Poland). Dotyczyły wpływu graminicydów na podziały komórkowe roślin wrażliwych. Wykazano w nich zróżnicowany wpływ tych herbicydów na podziały komórkowe u różnych roślin wrażliwych.

Z pośród pozostałych publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego jedna (**publikacja nr 2 punktu 2 A załącznika 4**) dotyczy akumulacji materiałów zapasowych - ze szczególnym uwzględnieniem lipidów - w ziarniakach owsa (Banaś, A., Dębski, H., **Banaś, W.**, Heenen, W., Dahlqvist, A., Bafor, M., Gummesson, P-O., Marttila, S., Ekman, Å., Carlsson, A., Stymne, S. 2007. Lipids in grain tissues of oat (*Avena sativa*): differences in content, time of deposition, and fatty acid composition. *J. Exp. Bot.*, 58: 2463-2470). Badania w niej zawarte wpisują się w nurt badań nad owsem jako potencjalną rośliną oleistą. Owies różni się od pozostałych zbóż tym, że akumuluje lipidy nie tylko w zarodku i tarczce zarodkowej, ale również w warstwie aleuronowej i endospermie. Już obecnie istnieją odmiany akumulujące duże ilości olei - do 18% suchej masy ziarniaka. Wydaje się, że jest możliwe podniesienie ich zawartości powyżej 20%, a wtedy owies stałby się rośliną oleista skutecznie konkurująca np. z rzepakiem. Zanim jednak owies będzie mógł skutecznie być poddany manipulacjom genetycznym, konieczne jest dokładne poznanie biochemicznych podstaw akumulacji materiałów zapasowych w jego ziarniakach, co było celem omawianej publikacji.

Kolejna publikacja - **publikacja nr 4 punktu II D załącznika 4** – (Banaś, A., Klocek, J., **Banaś, W.**, Stymne, S. 1997. The effect of overexpressing endogenous FAS 1 and FAS 2 genes in *Sacharomyces cerevisiae* on lipid and fatty acid content. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej im. H. Kołłątaja w Krakowie nr 318: 533-536) dotyczyła wpływu nadekspresji genu kodującego FAS1 i/lub FAS2 na zawartość i skład lipidów drożdży (syntaza kwasów tłuszczowych - FAS – u drożdży składa się z dwu polipeptydów FAS1 i FAS2). W badaniach wykazano, że zwiększenie ekspresji genów kodujących te polipeptydy nie wpływało jednak na zawartość i skład kwasów

tłuszczowych komórek drożdży. Zanotowano jedynie pewne zmiany w składzie kwasów tłuszczowych lipidów drożdżowych. Badania nie były dalej kontynuowane.

W trzeciej publikacji (Klocek, J., **Banaś, W.**, Banaś, A. 1999. Wpływ kwasu jasmonowego na wzrost roślin ziemniaka w kulturach *in vitro*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, z.469: 327-332 ) nie wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego (i nie dotyczącej graminicydów) omówiono badania dotyczące wpływu kwasu jasmonowego na wzrost ziemniaka w kulturach *in vitro* (**publikacja nr 8 punktu II D załącznika 4**). W badaniach wykazano między innymi, że związek ten wykazywał różny wpływ na rozwój ziemniaka w zależności od sposobu podawania go roślinie. Gdy dodany był do pożywki stymulował np. tuberyzację, zaś gdy podawano go na liście, nie obserwowano przyspieszenia tego procesu.

Publikacja czwarta (Furmanek, T., **Banaś, W.** 2011. Embriogenic callus formation by cotyledon and leaf explants of *Crambe abyssinica* seedlings. *BioTechnologia*, 2011, vol. 92(2), 209-213 ) z omawianych obecnie publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego dotyczyła również jak poprzednia kultur *in vitro* (**publikacja nr 12 punktu II D załącznika 4**). Przedstawiono w niej badania nad formowaniem się embriogenicznego kalusa na eksplantatach liściowych i liścieniowych siewek katanu abisyńskiego. Badania te mogą być przydatne do opracowania nowej metody transformacji tej rośliny (obecne metody są opatentowane i nie mogą być wykorzystywane bez specjalnych zezwoleń). Katan abisyński jest zaś rośliną oleista, która ostatnio wzbudza duże zainteresowanie biotechnologów jako, że jest to roślina bezpieczna dla manipulacji genetycznej. Nie krzyżuje się ona z żadną inną rośliną uprawną, a na terenie Polski i Północno-Środkowej Europy nie ma też dzikich „krewniaków”, z którymi mogła by się krzyżować. Olej katanu nie jest również wykorzystywany do celów spożywczych jako, że zawiera duże ilości kwasu erukowego, szkodliwego dla zdrowia.

Piąta z omawianych obecnie publikacji (Banaś, A., **Banaś, W.** 2014. Modyfikowanie lipidów roślinnych – surowców przemysłu olejarskiego (rozdział 6-ty). W: *Biotechnologia Lipidów Żywności* (pod redakcją: M. Adamczyk, W. Bednarski) to rozdział przygotowywanego obecnie podręcznika akademickiego (**publikacja nr 13 punktu II D załącznika 4**). Dotyczy on modyfikowania lipidów roślinnych (rozdział 6 „Biotechnologii Lipidów Żywności”) i składa się z kilku podrozdziałów omawiających biosyntezę łańcucha węglowego kwasów tłuszczowych, modyfikację tego łańcuch, biosyntezę triacylogliceroli, modyfikowanie olejów roślinnych



metodami konwencjonalnymi i metodami inżynierii genetycznej oraz technologicznymi i żywieniowymi aspektami genetycznego doskonalenia olejów roślinnych.

Badania opisywane w publikacjach nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego realizowane były zarówno przed jak i po uzyskaniu stopnia doktora. Część z nich dotyczących badań nad graminicydami weszła w skład mojej rozprawy doktorskiej („Wpływ graminicydów na wybrane procesy fizjologiczno-biochemiczne traw”) obronionej w 2000 r. na Wydziale Rolniczym Akademii Podlaskiej w Siedlcach. Badania te wnoszą również istotny wkład do dyskusji na temat mechanizmu działania graminicydów. Ich wyniki zdecydowanie popierają hipotezę kataboliczną (stres oksydacyjny, degradacja lipidów) fitotoksyczności graminicydów popieraną obecnie przez mniejszościową frakcję badaczy zajmujących się tym zagadnieniem. Z pozostałych publikacji do istotnego poszerzenia wiedzy nad metabolizmem lipidów roślinnych przyczynia się publikacja dotycząca badań nad owsem. Istotne znaczenie może mieć również publikacja dotycząca tworzenia embriogenego kalusa przez eksplantanty z katrań abisyńskiego. Rozdział zaś w przygotowywanym podręczniku dotyczący lipidów roślinnych może być pomocny dla studentów/doktorantów w zrozumieniu wielu zagadnień związanych z lipidami roślinnymi (jak dotychczas w polskim piśmiennictwie brak jest tego typu opracowania podręcznikowego).

Oprócz omówionych publikacji wyniki moich badań prezentowane były na 11 krajowych (15 prezentacji) i 19 międzynarodowych (22 prezentacji) konferencjach naukowych. Abstrakty tych prezentacji zostały opublikowane w materiałach konferencyjnych i/lub suplementach czasopism naukowych (11 abstraktów). Prezentowane badania dotyczyły w większości przypadków zagadnień omówionych powyżej i w mniejszym stopniu innych zagadnień związanych z metabolizmem lipidów roślinnych.

Znaczna część prezentowanych badań wykonana została we współpracy międzynarodowej (Instytut Fizjologii Roślin i Instytut Hodowli Roślin Szwedzkiego Uniwersytetu Rolniczego – profesor Goran Stenlid; profesor Sten Stymne i jego Zespół; profesor Anders Carlson; „Biological Chemistry Department, Rothamsted Research, UK” – dr Richard Haslam i profesor Jonathan Napier ) i krajowej (Instytut Biologii i Ochrony Środowiska Akademii Pomorskiej w Słupsku – dr Tomasz Furmanek; Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed – profesor Antoni Banaś i jego Zespół).

Do czasu uzyskania stopnia doktora byłam współautorem 8 publikacji (4 w czasopiśmie nie posiadających IF i 4 w publikacjach książkowych) oraz 15 doniesień konferencyjnych. Dorobek ten został znacznie powiększony po uzyskaniu stopnia doktora. Z tego okresu jestem współautorem 14 publikacji (w tym jedna w druku) i 22 doniesień konferencyjnych. Mój wkład w powstanie poszczególnych publikacji omówiony jest w załączniku nr 4 („Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacji o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki”).

Łączny IF z roku wydania wszystkich moich publikacji wynosi 26,833 (z 2012 roku IF = 30,258). Łączna ilość punktów MNiSW = 312, a łączna liczba cytowań = 156.

*Banaś Walentyna*