



UNIWERSYTET GDAŃSKI

DZIEKANAT WYDZIAŁU
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA

Wpłynęło dnia 31.08.2020
520-22.5/2020



80-807 Gdańsk, ul. Abrahama 58; tel.: +48 58 5236320; faks: +48 58 5236430
www.biotech.ug.edu.pl

Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii UG i GUMed

Gdańsk, 24.08.2020

dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Emilii Morańskiej,
pt.: „Biosynteza galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* śnieżycy
letniej (*Leucojum aestivum* L.)”**

Pani mgr inż. Emilia Morańska realizowała swoją pracę doktorską w Katedrze Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie pod kierunkiem dr hab. inż. Agaty Ptak, prof. UR i dr inż. Magdaleny Simlat. Od około 15 lat promotor pracy doktorskiej – dr hab. inż. Agata Ptak, prof. UR prowadzi intensywne badania nad rodziną amarylkowatych w kontekście kultur *in vitro* i zastosowań biotechnologicznych. Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Emilii Morańskiej dotycząca biosyntezy metabolitów wtórnych ze śnieżycy letniej również wpisuje się w powyższy nurt badawczy.

Przedmiotem pracy doktorskiej była optymalizacja biosyntezy biologicznie czynnych alkaloidów galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* *Leucojum aestivum* L. poprzez zastosowanie szeregu elicytorów abiotycznych i biotycznych. Dodatkowo dzięki izolacji i identyfikacji bakterii endofitycznej *Paenibacillus lautus* zasiedlającej cebule śnieżycy letniej zbadano jej wpływ na produkcję wyżej wymienionych alkaloidów w kulturach *L. aestivum* L., jak również wykazano zdolność tej bakterii do biosyntezy alkaloidów. Ponadto wykorzystując techniki molekularne oszacowano również poziom transkryptu genu 4'-O-metyltransferazy norbelladyny (*N4OMT1*) ściśle związanego ze szlakiem biosyntezy alkaloidów w śnieżycy letniej. Należy podkreślić, że rozprawa doktorska jest wielopłaszczyznowa, bo obejmuje roślinne kultury *in vitro*, fizjologię roślin, biotechnologiczne aspekty związane z podwyższaniem poziomu metabolitów wtórnych,

jak również elementy biologii molekularnej. Temat pracy doktorskiej uważam za istotny i ekonomicznie uzasadniony. Poszukiwanie wydajnych metod pozyskiwania cennych metabolitów wtórnych w kulturach *in vitro* o właściwościach biologicznie czynnych wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym jest wskazane ze względu na fakt, że bardzo często synteza chemiczna jest mało wydajna i nieopłacalna, a pozyskiwanie cennych substancji ze środowiska naturalnego powoduje ogromne szkody ekosystemach.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr inż. Emilii Morańskiej jest oryginalnym opracowaniem liczącym 218 stron maszynopisu, ma układ przyjęty dla tego typu opracowań i obejmuje spis treści, indeks skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, które moim zdaniem powinno być umieszczone przed wstępem oraz bibliografię.

Wstęp – w tym rozdziale Doktorantka na 37 stronach wprowadziła czytelnika do problematyki pracy. W przejrzysty sposób pokazała dotychczasowe działania związane z pracami dotyczącymi pozyskiwania alkaloidów ze śnieżycy letniej oraz wyjaśniła jakie znaczenie dla przemysłu farmaceutycznego ma szczególnie galantamina i likoryna, które były głównym tematem jej pracy doktorskiej. Szczególną uwagę Doktorantka zwróciła na charakter chemiczny i biosyntezę alkaloidów roślin z rodziny amarylkowatych. We wstępie pani mgr inż. Emilia Morańska omówiła również wpływ różnych czynników abiotycznych i biotycznych oraz warunków hodowli wpływających na biosyntezę tych dwóch cennych alkaloidów w kulturach *in vitro* (modyfikacje pożywek, elicytacja, biotransformacja, transformacja genetyczna).

Uwagi do wstępu: Wydaje mi się, że wstęp mógłby być okrojony o szkodniki atakujące *L. aestivum* L. oraz grzyby. Ryc. 9 opisująca mechanizm działania galantaminy w synapsach jest niepotrzebna i nie wnosi nic istotnego do pracy. Nie znalazłam odnośników w bibliografii do publikacji: Berkow i in. 2009c, Codina i in. 2002, Pacific Bulb Society 2002, Kączkowski 1993, Tarakmeneh i in. 2019. Z kolei w kilku innych publikacjach jest podany inny rok w cytowaniu i w bibliografii np.: Laurain-Mattar i Ptak 2016/2018; Szczudlik 2014/2016, czy Georgieva i in. 2007/2009.

Cel pracy – został jasno i precyzyjnie sformułowany przez mgr inż. Emilię Morańską. Dwa cele dotyczyły zastosowania roślinnych kultur *in vitro* do podwyższenia poziomu alkaloidów w tkankach śnieżycy letniej oraz oceny reakcji stresowanej rośliny na zastosowane elicytory abiotyczne i biotyczne. Pozostałe dwa cele związane są z izolacją i

identyfikacja endofitycznej bakterii zasiedlającej cebule *L. aestivum* L. oraz jej zdolnością do biosyntezy alkaloidów, jak również oszacowanie na poziomie molekularnym poziomu transkrypcji homologicznego do genu *N4OMT1*, który ściśle związany jest ze szlakiem biosyntezy alkaloidów.

Materiały i Metody. W rozdziale tym Doktorantka szczegółowo opisała materiały i metody dotyczące hodowli *in vitro* i stosowanych elicytorów. Wyszczególniła analizy biochemiczne, fitochemiczne i cytologiczne. W kolejnej części tego rozdziału omówiła izolację i identyfikację bakterii endofitycznej oraz jej ocenę zdolności do biosyntezy alkaloidów. Ostatnia część poświęcona jest technikom biologii molekularnej od izolacji DNA, RNA, odwrotnej transkrypcji, amplifikacji fragmentów genu 4'-O-metyltransferazy norbelladyny, sekwencjonowanie i półilościową ocenę ekspresji genu *N4OMT1*.

Do tego rozdziału mam kilka pytań do Doktorantki:

1. Skąd dokładnie pochodził materiał roślinny do badań?
2. Doświadczenia dotyczące badania wpływu elicytorów na poziom metabolitów wtórnych i ogólna kondycję roślin opisane jako Doświadczenie od I do IX sugeruje, że były wykonane tylko raz. W związku z powyższym mam pytanie ile było powtórzeń biologicznych i technicznych tych doświadczeń?
3. Czy był badany wpływ różnych temperatur hodowli w bioreaktorze RITA®. Jeśli nie, to dlaczego zdecydowano się prowadzić hodowle w bioreaktorze RITA® w 25° C, skoro optymalna temperatura do wytwarzania alkaloidów była 20° C (Tabela 33)?
4. Skąd pochodziły cebule *L. aestivum* L. rosnące w kulturach *in vitro* (strona 62) na których zaobserwowano wzrost kolonii bakteryjnych? Czy były one uprzednio sterylizowane i wykładane na pożywki do hodowli roślin?
5. Dlaczego kolonie bakteryjne (zidentyfikowane w ramach pracy doktorskiej jako *Paenibacillus lautus*), które wyrosły na cebulach *L. aestivum* L. hodowano w 37° C, skoro rośliny hodowano w 20° C? Czy na cebulach wykazano tylko wzrost monokultury bakteryjnej w postaci *P. lautus*?
6. Ile cykli zastosowano w reakcji RT-PCR? Na jakiej podstawie wyznaczono że próbki cDNA należy rozcieńczyć 70 razy do przeprowadzenia reakcji RT-PCR (strona 70)?

Rozdział **Wyniki**, który zawiera 81 stron to dokładny opis rezultatów, które uzyskała mgr inż. Emilia Morańska w ramach realizacji pracy doktorskiej. W pierwszej części Doktorantka pokazała wyniki dotyczące wpływu elicytorów abiotycznych (temperatura, światło LED niebieskie, czerwone lub mieszane czerwone : białe w stosunku 1 : 1 i metale ciężkie: chlorek kobaltu, siarczan miedzi) na wytwarzanie galantaminy i likoryny

w kulturach *in vitro* *L. aestivum* L. W dalszej kolejności omówiła ona działanie elicytorów biotycznych (ekstrakt drożdżowy, ekstrakt grzybowy z *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* i *Botrytis cinerea*), dekstran oraz alginian sodu). W tej części pracy zabrakło ogólnego podsumowania działania w/w elicytorów na wytwarzanie alkaloidów w kulturze śnieżycy letniej. Pomocna jest tutaj tabela 33, która znajduje się w sekcji dyskusja. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki Doktorantka rekomenduje zastosowanie światła niebieskiego LED, które 3,5-krotnie zwiększa poziom galantaminy w tkankach *L. aestivum* L. i temperaturę 20° C, która w porównaniu do 25° C powodowała podwyższenie poziomu likoryny 3,23-krotnie. W tej części omawiania wyników mgr inż. Emilia Morańska opisała również wpływ elicytacji na ogólną kondycję roślin (morfologia, aparaty szparkowe, zawartość chlorofilu, akumulacja cukrów, zawartość związków fenolowych) oraz reakcje stresowe (aktywność katalazy, peroksydazy askorbinianowej i dysmutazy ponadtlenkowej). Są to bardzo ważne parametry, które Doktorantka powinna uwzględnić w opisie podrozdziałów.

Najbardziej interesująca część wyników dotyczy izolacji i identyfikacji bakterii endofitycznej, której wpływ zbadano również na poziom galantaminy i likoryny w tkankach *L. aestivum* L. Dzięki zastosowaniu genu podjednostki 16S rRNA oraz sekwencjonowaniu wykazano, że bakterie zasiedlające cebule śnieżycy letniej to *Paenibacillus lautus*, który może wywoływać oportunistyczne zakażenia u ludzi. Wzrost zawartości obu alkaloidów (galantaminy – 1,23-krotnie, likoryny – 1,54-krotnie w porównaniu do kontroli) pod wpływem tej bakterii wykazano tylko po zastosowaniu autoklawowanego lizatu przez 4 tygodnie kultury. W tym miejscu mam dwa pytania do Doktorantki:

1. Czy roczne cebule pochodzące z kultur *in vitro* na których obserwowano kolonie bakteryjne pochodziły z kultur *in vitro* (strona 124)?
2. Czy Doktorantka sprawdzała poziom obu alkaloidów również po 1 tygodniu, 2 i 3-ech tygodniach hodowli. Dane literaturowe wskazują bowiem, że ogromne znaczenie ma czas stosowania elicytorów. Poziom metabolitów wtórnych może na przykład po 7 dniach, bądź 14 być różny i niekoniecznie wyższy w porównaniu do kontroli.

Bardzo trafionym posunięciem było sprawdzenie przez mgr inż. Emilię Morańską czy *P. lautus* posiada zdolność do syntezy alkaloidów. Dzięki zastosowaniu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas z elektrojonizacją (GC-EI-MS) wykazała ona, że bakteria ta jest zdolna do biosyntezy 10 związków z grupy alkaloidów (w tym galantaminy i likoryny).

Rozdział 4.3. „Biosynteza alkaloidów u wybranych gatunków i odmian roślin z rodziny Amaryllidaceae” powinien być nieco inaczej sformułowany skoro dwa podrozdziały 4.3.1. i 4.3.2. związane są z identyfikacją i ekspresją genu *N4OMT1*. Do tego rozdziału mam też kilka pytań do Doktorantki:

1. Na jakiej podstawie stwierdzono, że produkty PCR ze starterami *N4OMT1-1F/R* mają 1850, 2080, 2500, 2220 i 4890 pz, skoro użyty marker wielkości jest tylko do 1000 pz (Rycina 96)? Analogiczne pytanie jest do Ryciny 99, gdzie z kolei z jeszcze większą dokładnością oszacowano produkty na 1210 1460 i 1770 pz. Na kilku rycinach z kolei w ogóle nie umieszczono markera wielkości (np.: Ryc. 100, 101, 102, 107).
2. Dlaczego pani mgr inż. Emilia Morańska zdecydowała się na pół-ilościowy (semi-quantitative) RT-PCR, a nie ilościowy (quantitative) RT-PCR?

Dyskusja. W rozdziale pracy „Dyskusja” na 32 stronach tekstu Doktorantka obszernie przedyskutowała wyniki swojej pracy w kontekście dostępnej literatury światowej. Pani mgr inż. Emilia Morańska przedyskutowała wszystkie wątki poruszane w pracy doktorskiej, a na uwagę zasługuje fakt, że na końcu dyskusji Doktorantka w oparciu o wyniki swojej pracy napisała jakie są dalsze perspektywy związane z wytwarzaniem galantaminy i likoryny w roślinnych kulturach *in vitro*, jak również z wykorzystaniem systemu bakteryjnego.

Wnioski, które pani mgr inż. Emilia Morańska ujęła w postaci 12 punktów podsumowują najważniejsze wyniki jej pracy, a **Streszczenie** w języku polskim i angielskim zawiera zwięzłe podsumowanie pracy.

Pani mgr inż. Emilia Morańska w swojej pracy doktorskiej umieściła 33 tabele i aż 111 rycin, co wskazuje na ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę w trakcie wykonywania szeregu doświadczeń. Bibliografia zawierająca 240 cytowań stanowi ogromną bazę prac dotyczących tematu związanego z wytwarzaniem alkaloidów w roślinnych kulturach *in vitro*. Praca napisana jest poprawnym językiem i co więcej, Doktorantka uniknęła żargonu laboratoryjnego, co jest obecnie rzadko spotykane.

Podsumowując, przedstawione przez panią mgr inż. Emilię Morańską wyniki badań stanowią ważny wkład w poszerzenie wiedzy dotyczącej wytwarzania dwóch cennych dla przemysłu farmaceutycznego alkaloidów: galantaminy i likoryny z wykorzystaniem potencjału *L. aestivum* L. Pierwszy z wymienionych alkaloidów ma ogromne znaczenie w terapii choroby Alzheimera, paraliżu i schizofrenii. Drugi z kolei jest badany jako

potencjalny lek w terapii antynowotworowej. Po zapoznaniu się z pracą doktorską stwierdzam, że pani mgr inż. Emilia Morańska wykazała się umiejętnym planowaniem eksperymentów i zdolnością wykorzystania technik z zakresu biotechnologii roślin, fizjologii roślin, fitochemii i biologii molekularnej. Za osiągnięcie jej pracy uważam:

1. Zidentyfikowanie *Paenibacillus lautus* zasiedlającego cebule śnieżyczki letniej i wykazanie że jest on zdolny do biosyntezy alkaloidów Amaryllidaceae – w tym galantaminy i likoryny.

2. Wykazanie, że w *Leucojum aestivum* L. znajduje się transkrypt homologiczny do genu 4'-O-metyltransferazy norbelladyny, który zaangażowany jest w biosyntezę alkaloidów.

3. Wskazanie optymalnych parametrów hodowli do uzyskania podwyższonego poziomu galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* śnieżyczki letniej.

Recenzowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim (określone w Art. 13 punkt 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595 i test jednolity Dz. U. 2016, pozycja 882, 1311), stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną i praktyczną Doktorantki w dyscyplinie naukowej, w związku z powyższym, zwracam się do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Emilii Morańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dziedzinie: nauki rolnicze, dyscyplinie: rolnictwo i ogrodnictwo.

Zakład Badania Związków
Biologicznie Czynnych

dr hab. inż. Aleksandra Królicka, prof. UG