

dr hab. Grażyna B. Dąbrowska, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Genetyki
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 6114576; e-mail: browsk@umk.pl

DZIEKANAT WYDZIAŁU
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA

Wpłynęło dnia 21.08.2020

520-22.6/2020



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

RECENZJA

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Emilii Morańskiej, pt. **„Biosynteza galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* śnieżycy letniej (*Leucojum aestivum* L.)”** wykonanej w Katedrze Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, pod kierunkiem dr hab. Agaty Ptak, prof. UR i dr inż. Magdaleny Simlat.

Praca doktorska ma układ konwencjonalny, rozpoczyna ją *Spis treści*, za którym umieszczono *Indeks skrótów*. Pierwszy rozdział *Wstęp* zajmuje 43 strony, co stanowi niemal 1/3 części rozprawy doktorskiej. We *Wstępie* opisano i scharakteryzowano rodzinę *Amaryllidaceae* (amarylkowatych), ze szczególnym uwzględnieniem śnieżycy letniej (*Leucojum aestivum* L.), której przedstawiciele stanowili materiał w badaniach. W tej części pracy zawarto opisy dotyczące charakteru chemicznego i biosyntezy specyficznej grupy związków należnych do alkaloidów, nazywanych „alkaloidami *Amaryllidaceae*”, należących do pochodnych izocholiny, których z kolei wspólnym prekursorem jest norbelladyna. Omówiła też szlaki biosyntezy norbelladyny, uwzględniając najnowsze doniesienia literaturowe dotyczące identyfikacji i regulacji ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę alkaloidów u narcyza trąbkowego (*Narcissus pseudonarcissus* L.) i *Rhodophiala bifida*. W czytelny sposób dokonano przeglądu alkaloidów *Amaryllidaceae* zestawiając dane w tabelach 3 i 4 (str. 22-23). Po zapoznaniu czytelnika z listą alkaloidów skupiono się na opisie fizjologicznego działania tej grupy związków, uwzględniając rys historyczny badań tychże, tak intensywnie do dziś badanych, z uwagi na ich terapeutyczne zastosowanie. Spośród wymienionych w pracy typów alkaloidów (likoryn, krynin, narcyklasyny, tazettyny i innych), szczegółowo opisano galantaminę, która przyczynia się do podwyższania stężenia acetylocholiny, niezbędnej dla



prawidłowego przebiegu procesu uwagi i zapamiętywania oraz stymulowania pre- i postsynaptycznych receptorów nikotynowych, umożliwiając tym samym uwolnienie neuroprzekaźników i poprawę funkcjonowania neuronów oraz bezpośredniego działania na centralny układ nerwowy, jako że alkaloid ten przenikania przez barierę krew-mózg. Stąd też zastosowanie galantaminy w terapii chorób neurodegeneracyjnych i schizofrenii czy paraliżu. Z opisu dowiadujemy się, że galantamina wspomaga także przewodnictwo nerwowo-mięśniowe poprzez regulację transportu błonowego jonów i posiada właściwości przeciwbólowe. W dalszej części pracy szczegółowo opisano likorynę, inny alkaloid szeroko rozpowszechniony w obrębie *Amaryllidaceae*, wykazujący aktywność antyproliferacyjną, antywirusową, antygrzybową, hamujący organogenezę i podziały komórkowe u glonów i roślin wyższych.

W kolejnej części *Wstępu* omówiono czynniki wpływające na biosyntezę alkaloidów w kulturach *in vitro*. W tej części dowiadujemy się również o sposobach pozyskiwania alkaloidów, które odbywa się poprzez syntezę chemiczną lub ekstrakcję z materiału roślinnego lub z wykorzystaniem metod biotechnologicznych. Te ostatnie metody, tak obecnie popularne, wiążą się jednak z koniecznością optymalizacji warunków procesu biosyntezy, gdzie istotny jest dobór materiału roślinnego i typ kultury. Z danych zawartych w literaturze i z badań opisanych w dysertacji wynika, że najwyższą zawartość alkaloidów obserwuje się w cebulach a znacznie niższą w korzeniach i kalusie. Proszę o komentarz: Jak wyjaśniłaby Pani zróżnicowanie zawartości alkaloidów w poszczególnych organach roślin? Jak mają się wyniki badań własnych do tych opisywanych w literaturze?

Istotnymi czynnikami wpływającym na wydajność pozyskiwania alkaloidów, zwłaszcza w bioreaktorach są czynniki fizyczne, modyfikacje składników pożywki i elicytacja (poprzez dodanie elicytorów abiotycznych czy biotycznych). Odnosnie podziału czynników przedstawionych na rycinie 11. wśród elicytorów biotycznych wymienione są alginian sodu, oligosacharydy, pektyny i chitozan. Czy Pani zdaniem to jest właściwe podejście? Proszę o komentarz.

Podsumowując, zawarte we *Wstępie* informacje są ułożone w logicznej kolejności i jasno wskazują na wagę podjętych badań i ich możliwość zastosowania w praktyce.



Rozprawa zawiera poprawnie i jasno sformułowany cel pracy, dotyczący opracowania optymalnej biosyntezy galantaminy i likoryny w kulturach *in vitro* *Leucojum aestivum* L., który realizowano kilkietapowo: i. poprzez ocenę wpływu wybranych elicytorów abiotycznych i biotycznych na biosyntezę alkaloidów, ii. ocenę działania elicytorów na indukcję stresu w kulturach śnieżycy *in vitro*, iii. identyfikację molekularną bakterii endofitycznej pochodzącej z kultur *in vitro* i sprawdzenie jej pod kątem zdolności do wytwarzania alkaloidów, iv. identyfikację sekwencji genu *N4OMT1* *Narcissus pseudonarcissus* L. uczestniczącego w szlaku biosyntezy alkaloidów i sprawdzenie obecności jego transkryptów w roślinach.

Kolejny rozdział *Materialy i metody* zawarto na 31 stronach (str. 45-75), obejmuje szczegółowe opisy szeregu metod zastosowanych w badaniach. Opisano tu materiał badawczy, wykorzystany w badaniach, który stanowiły w doświadczeniach *in vitro*, zarodki śnieżycy białej a w badań molekularnych, liście roślin z rodziny *Amarylidaceae* i liście roślin uzyskanych w warunkach *in vitro*. Przedstawione w pracy metody pokazują, że Doktorantka wykazała się znajomością wielu technik, zaczynając od zakładania i prowadzenia kultur w warunkach *in vitro*, w których to przygotowała materiał roślinny uzyskany w różnych warunkach temperaturowych, świetlnych, różniący się zawartością jonów metali ciężkich, ekstraktu drożdżowego, elicytorów grzybowych, dekstranu, alginianu sodu lub obecnością żywych lub ekstraktu z zabitych bakterii endofitycznych *Paenibacillus lautus*. Poznała także metody pozwalające na wykonanie analiz biochemicznych, które wykorzystwała do oznaczenia zawartości barwników fotosyntetycznych, cukrów, związków fenolowych, białek rozpuszczalnych oraz analiz aktywności peroksydazy askorbinianowej, dysmutazy ponadtlenkowej i katalaz. Do zrealizowania celów zawartych w dysertacji Doktorantka opanowała także metody pozwalająca na wykonanie analiz fitochemicznych i cytologicznych oraz analiz chromatograficznych.

Wyróżniająca się część rozdziału *Materialy i metody* stanowią techniki stosowane w biologii molekularnej, które Autorka pracy zastosowała do identyfikacji molekularnej bakterii endofitycznej oraz ustalenia obecności transkryptów genu 4'-*O*-metylotrnsferazę



norbelladyny *N4OMT1* w badanym materiale. Wydaje się, że w punkcie 3.3.4.6. pracy, dotyczącym półilościowej oceny ekspresji *N4OMT1* w opisie zabrakło informacji na temat metody zastosowanej do izolacji RNA i ilości tego kwasu nukleinowego użytej do wykonania odwrotnej transkrypcji oraz danych odnośnie genu/ów referencyjnych koniecznych do ustalenia względnej ilości mRNA genu *N4OMT1*. Proszę o ustne uzupełnienie tych informacji.

W rozdziale czwartym dysertacji zatytułowanym *Wyniki*, obejmującym łącznie osiemdziesiąt jeden stron (str. 76-156), zaprezentowano etapy somatycznej embriogenezy *Leucojum aestivum* L. (ryc. 14, str. 76) oraz wyniki oceny wpływu testowanych czynników, elicytorów abiotycznych i biotycznych na biomasę materiału roślinnego, zawartość barwników fotosyntetycznych, fenoli i cukrów i aktywność enzymów stresu oksydacyjnego (CAT, POD, SOD) oraz biosyntezę galantaminy i likoryny.

Wykazano, że spośród analizowanych elicytorów, to zastosowanie światła niebieskiego podczas prowadzenia kultury *in vitro* *Leucojum aestivum* L. ma wpływ na najwydajniejszą biosyntezę galantaminy. Z kolei w temperaturze 20°C i przy zastosowaniu ekstraktu z zabitych komórek bakterii endofitycznej *Paenibacillus lautus* dochodzi do stymulacji biosyntezy obu alkaloidów, galantaminy i likoryny oraz, że inne czynniki, takie jak: obecność w podłożu ekstraktów z *Aspergillus niger* i *Botrytis cinerea* oraz dekstranu i alginianu sodu pozytywnie oddziałują powodując promowanie biosyntezy galantaminy. Ponadto, zaobserwowano, że licytacja ekstraktem drożdżowym (w stężeniu 2g/l) w porównaniu z innymi badanymi czynnikami powodowała najwyższy wzrost biomasy *Leucojum aestivum* L. a w stężeniu 3g/l najwyższy poziom chlorofilu a i karotenoidów. Pokazano także, że analizowane elicytory nie powodowały zmian zawartości cukrów oraz związków fenolowych, z wyjątkiem wariantu roślin rosnących w temperaturach 5, 15 i 30°C. Ważną informację stanowią wyniki dotyczące analizy zawartości enzymów stresu oksydacyjnego w roślinach poddanych działaniu różnych elicytorów. Wykazano, że dochodzi do reakcji stresowej w kulturach *in vitro* badanej rośliny w obecności elicytorów abiotycznych.



Bardzo proszę Doktorantkę o odpowiedź na pytanie: zawartość którego/ych z badanych enzymów ulegała najczęściej zmianom? Czy tylko w warunkach stresu aktywowane są enzymy antyoksydacyjne?

Ciekawą część *Wyników* stanowią efekty badań dotyczących identyfikacji i charakterystyki bakterii endofitycznej *Paenibacillus lautus*. Wykazano, że dodanie bakterii endofitycznej do kultur *in vitro* *Leucosium aestivum* L. powodowało wzrost lub spadek biomasy roślinnej, a uzależnione to było ilością zastosowanego inokulum bakteryjnego. Przeprowadzono ocenę aktywności metabolicznej bakterii endofitycznej i wykazano jej zdolność do biosyntezy alkaloidów *Amaryllidaceae* (aż dziesięciu, w tym galantaminy i likoryny). Eksperymenty te oczywiście wymagają powtórzenia, gdyż dane te oparte są na badaniach wstępnych. Uzyskane informacje rodzą olbrzymie nadzieje na możliwość rozwijania metod biotechnologicznych w celu wydajnego pozyskiwania alkaloidów. Jak Pani zdaniem wyglądać może kontynuacja badań w tym kierunku?

W ostatniej części *Wyników*, poświęconej biosyntezie alkaloidów u wybranych gatunków i odmian *Amaryllidaceae* zawarto informacje dotyczące obecności transkryptów zidentyfikowanego genu śnieżycy letniej oraz zawartości galantaminy i likoryny u siedmiu przedstawicieli tych roślin. Pokazano różnice w zawartości tych alkaloidów u porównywanych roślin z rodziny *Amaryllidaceae*. Kontrowersje budzą obrazy produktów reakcji RT-PCR (Ryc. 101, 102 i 108, 109), na których nie są pokazane produkty PCR dla genu referencyjnego. W takiej sytuacji niepoprawnie podpisano wykresy (ryciny 103, 104 i 110 i 111) jako akumulacja transkryptów. W takiej sytuacji możemy mówić jedynie o obecności transkryptu badanego genu, pod warunkiem, że produkty PCR uzyskane dla różnych odmian i gatunków zostały także zsekwencjonowane (co dopiero potwierdza poprawność wykonanego eksperymentu), gdyż jak wiadomo nie można jedynie na wielkości produktu PCR. Aby mówić o akumulacji mRNA konieczne jest również przeprowadzenie reakcji RT-PCR dla genów referencyjnych. O względnym poziomie ekspresji genów możemy mówić w momencie odniesienia wyniku uzyskanego dla badanego genu do genu/ów referencyjnego/ych. Dlatego też w świetle przedstawionych



danych nie jestem w stanie stwierdzić poprawności uzyskanych wyników. Proszę o doprecyzowanie. Czy takie reakcje były przeprowadzone? Zakładam że tak.

W rozdziale *Dyskusja* stanowiącym łącznie 33 strony (str. 157-189) szczegółowo omówiono wyniki uzyskanych badań, co wskazuje na dogłębne zapoznanie się Doktorantki z omawianymi zagadnieniami. Tak szeroko zakrojone badania zaprezentowane w rozprawie doktorskiej wymagały zapoznania się z literaturą z różnych zakresów tematycznych, o czym świadczą licznie cytowane pozycje piśmiennicze, których w dysertacji zawarto 240. Z uwagi na nieprecyzyjne opisanie metody analizy ekspresji analizowanego genu/ów należy z ostrożnością podejść do fragmentu dyskusji, w którym omówiono wyniki dotyczące obecności transkryptów genu śnieżycy letniej homologicznego do genu *N4OMT1* narcyza.

Jednym z ostatnich rozdziałów dysertacji stanowią *Wnioski*, które zredagowano poprawnie, choć część zawartych tu informacji stanowi podsumowanie wyników. W rozprawie doktorskiej zawarto także streszczenia pracy napisane w języku polskim i angielskim.

Uwagi szczegółowe

Na str. 5 (Indeks skrótów) i str. 127 niewłaściwie rozszerzono nazwę NCBI jako National Center of Biotechnology Information, poprawne rozwinięcie skrótu to: The National Center for Biotechnology Information.

Na stronach 6, 32, 37 zacytowano publikację Codina i in. 2002, której nie zawarto w rozdziale *Bibliografia*.

Na str. 6, 32 w tekście zacytowano publikację Berkov i in. 2009c, której nie ma w spisie literatury; natomiast w *Bibliografii* prawdopodobnie niewłaściwie oznaczono kolejne publikacje autorów Berkov i in. 2009, 2009a, 2009b; powinno być 2009a, 2009b i 2009c – zgodnie z innymi wcześniej cytowanymi publikacjami innych autorów. W *Bibliografii* prace np. El Tahchy i in. 2011a, El Tahchy i in. 2011b są opatrzone kolejnymi literami alfabetu.



Na stronach 15, 45 z kolei wymieniono publikację, Ptak i in. 2013, chociaż zgodnie z wcześniej przyjętą zasadą cytowania; powinno być Ptak i in. 2013a; podobnie na stronach 32 i 33 podana jest publikacja autorów El Tahchy i in. 2011 a powinna być wymieniona jako El Tahchy i in. 2011a.

Na str. 6 w tekście dwukrotnie niewłaściwie zacytowano Garyali i in. 2013, w *Bibliografii* podana jest publikacja: Garyali 2013. Taxol production by an endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from Himalayan Yew. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1372-1380.

Podobna sytuacja ma miejsce na stronach 23 i 24, gdzie zacytowano publikację: Mucke i in. 2015, a powinna być podane cytowanie: Mucke 2015, zgodnie z informacją zawartą w *Bibliografii*).

Na str. 10 wymieniono pozycję: Laurain-Mattar, Ptak 2018 a w *Bibliografii* błędnie padano: Laurain-Mattar, Ptak 2016.

Na str. 14 jako cytowanie wymieniono nazwę organizacji: Pacific Bulb Society 2002, jednak do tej informacji nie ma odniesienia w *Bibliografii*. Poprawne byłoby podanie odniesienia do strony internetowej (<https://www.pacificbulbsociety.org>).

Na str. 30 niewłaściwie zacytowano publikację Ramachandra Rao i Ravishankar 2002, a należało oddzielić nazwiska autorów przecinkiem (Ramachandra Rao, Ravishankar 2002).

Na str. 33 zacytowano publikację Tarakmeneh i in. 2019, której brak jest w rozdziale *Bibliografia*.

Na str. 37 wymieniono dwukrotnie cytowanie: (Codina 2002), którego brak w spisie literatury.

Na str. 46 w opisie podano jedynie skrót i rok: MS (1962), należałoby rozwinąć skrót MS: (Murashige, Skoog 1962) co uzupełniłoby informację.

Na str. 53 podano informację odnośnie gęstości optycznej (OD) bakterii, ale brakuje długości fali w nm, przy której mierzono OD.

Pomimo pewnych niejasności, które pojawiły się w rozprawie, to jednak z uwagi na znikomą ilość informacji na temat genów biosyntezy tych alkaloidów i olbrzymie znaczenie



galantaminy i likoryny w medycynie, wyniki te wnoszą nowe i cenne informacje a także stwarzają kolejne możliwości rozwoju tych ważnych badań z punktu widzenia zdrowia człowieka i moim zdaniem powinny być kontynuowane.

Uważam, że przedstawiona przez Panią mgr inż. Emilię Morańską badania zostały przeprowadzone w oparciu o nowoczesne metody badawcze i analityczne, w tym metodę hodowli *in vitro*, analizy biochemiczne aspektów stresu, zwłaszcza stresu oksydacyjnego oraz metod badań molekularnych. Godna podkreślenia jest szczegółowa analiza uzyskanych wyników, także prawidłowa i kompleksowa analiza statystyczna oraz szczegółowa i dogłębna dyskusja wyników. Wysoki poziom naukowy badań oraz ich aktualny charakter, dają szerokie możliwości publikacyjne w uznanych czasopismach międzynarodowych.

Bardzo wysoko oceniam wartość uzyskanych wyników. Za najważniejsze osiągnięcia uważam ustalenie czynników, które najskuteczniej zwiększających elicytację alkaloidów u *Leucojum aestivum* L., zidentyfikowanie bakterii endofitycznej tego gatunku oraz wykazanie jej potencjału do wytwarzania alkaloidów, identyfikację fragmentu genu homologicznego do genu 4'-*O*-metylotransferazy norbelladyny narcyza i wykazanie jego obecności w liściach tego gatunku. Nadal w literaturze niewiele można znaleźć informacji na temat genów zaangażowanych w szlak biosyntezy alkaloidów. Wartość przeprowadzonych badań podnosi fakt, że na chwilę obecną w banku genów NCBI (The National Center for Biotechnology Information) znajdują się jedynie 33 sekwencje nukleotydowe śnieżycy letniej.

Praca doktorska mgr inż. Emilii Morańskiej spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim (określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki; Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) a rozmiarem przedstawionych wyników i merytoryczną wagą większości z nich, plasują ją w szeregu najlepszych prac. Wysoko oceniam sposób porządzenia sobie i zapanowanie nad całością detalicznych wyników i wpasowanie ich w



konkretne podsumowanie i wnioski. Dlatego też, stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Biorąc pod uwagę wartość naukową recenzowanej pracy wnioskuję również o wyróżnienie powyższej rozprawy.

Toruń, 17 września 2020 r.

dr hab. Grażyna B. Dąbrowska, prof. UMK