

Ocena

Pracy doktorskiej mgr Karoliny Kułak pod tytułem „Metabolizm wtórny w odpowiedzi immunologicznej wybranych gatunków Brassicaceae” wykonanej w Zakładzie Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin, Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Wtórne metabolity roślinne przez długi okres czasu uważane były za odpadowe ogniwo metabolizmu podstawowego nie mające znaczenia dla wzrostu i rozwoju roślin. W odróżnieniu od metabolitów podstawowych, powszechnie występujących we wszystkich roślinach i pełniących funkcje budulcowe, energetyczne czy genetyczne, wtórne metabolity roślinne są charakterystyczne tylko dla określonych taksonów. Od pewnego czasu, dzięki licznym obserwacjom środowiskowym i postępowi w analityce tych związków, istnieje coraz więcej dowodów, że substancje te są tak samo ważne dla rośliny, jak związki metabolizmu podstawowego i są miarą dopasowania organizmu do warunków środowiska, a więc pełnią w roślinie funkcje przeżyciowe. Dlatego też wraz ze zmianą poglądu na ich funkcje zmieniało się podejście do nazewnictwa. Aktualnie w kręgach opiniotwórczych zbliżonych do takich czasopism fachowych jak *Phytochemistry*, *Phytochemistry Letters*, *Phytochemical Analysis* czy towarzystwa naukowego Phytochemical Society of Europe lansuje się pogląd, że nie powinno się mówić o „metabolitach wtórnych” lecz raczej o „roślinnych substancjach naturalnych”. Pogląd taki w nazewnictwie polskim pojawił się już dawno temu, choć nie wynikał z roli tych związków lecz z ich występowaniem w określonych taksonach. W książce Prof. Blaima, kierownika Zakładu Biochemii IUNG pojawiła się nazwa „Substancje swoiste roślin uprawnych”. Wydaje się że termin ten dość precyzyjnie oddaje charakter tych związków. Ale ponieważ oficjalnie w nomenklaturze naukowej termin „wtórny metabolizm” występuje, zawarcie tego terminu w tytule rozprawy doktorskiej należy uznać za poprawne.

Z uwagi na praktyczne znaczenie tych związków w żywieniu, większość z nich uznawano za substancje antyżywnościowe lub wręcz naturalne toksyny, a hodowla nowych odmian ukierunkowana była na ich eliminację z roślin uprawnych. Znakomitymi przykładami mogą być glukozynolany w roślinach krzyżowych, alkaloidy w łubinie, glikoalkaloidy ziemniaka czy taniny bobiku. Eliminacja tych związków z roślin spowodowała w wielu przypadkach obniżenie ich odporności na stresy środowiskowe, co miało swoje konsekwencje w ochronie roślin i konieczności stosowania syntetycznych środków ochrony. Jednocześnie liczne prace dokumentowały, że w niskich stężeniach substancje te wykazują prozdrowotne działanie w organizmie człowieka, co zaowocowało dynamicznie rozwijającym się rynkiem wzbogacania żywności w nutraceutyki oraz wykorzystaniem farmaceutycznym. Ponad 40% innowacji w przemyśle spożywczym polega aktualnie na wprowadzaniu różnych substancji naturalnych w celu podniesienia walorów smakowych i zdrowotnych produktów żywnościowych.

Udział substancji naturalnych w oddziaływaniach rośliny ze środowiskiem może być różnorodny i często przeciwstawny. Z jednej strony mogą one pełnić funkcje obronne przeciw patogenom, roślinożercom lub innym roślinom, z drugiej strony mogą pełnić funkcje atraktantów przywabiających barwą lub zapachem. Podobnie wytwarzanie substancji naturalnych może być efektem działania czynników abiotycznych. We wszystkich przypadkach zmian środowiskowych roślina reaguje zmianami w dynamice biosyntezy lub degradacji substancji naturalnych. Nie zawsze zmiany te daje się jednoznacznie skorelować i uzasadnić. Najtrudniej jest chyba w sytuacji reakcji z patogenami, gdyż produkty naturalne nie działają specyficznie, lecz wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, posiadają długą historię ewolucyjną i dzięki istnieniu w naturze odpowiednich enzymów są szybko degradowalne, a ponadto mutacje występujące w świecie patogenów powodują powstawanie ich odporności na obecność substancji naturalnych. Dlatego hodowla odpornościowa jest dość żmudnym procesem a jej efekty są krótkotrwałe. Niemniej poznanie

mechanizmów odporności roślin na poziomie metabolicznym jest dla nauki wciąż dużym wyzwaniem pomimo licznych opublikowanych na ten temat prac. Skorelowanie dynamiki nagromadzania niektórych metabolitów z ekspresją określonych genów pozwala lepiej poznać te mechanizmy i być może w przyszłości pozwoli na takie manipulacje genetyczne które doprowadzą do uzyskania pełnej odporności i stosowanie środków ochrony roślin w produkcji roślinnej stanie się zbyteczne. Dlatego też uważam, że temat rozprawy doktorskiej wychodzi naprzeciw tym oczekiwaniom i należy uznać go za wysoce celowy.

Przedłożona do oceny praca doktorska obejmuje 151 stron maszynopisu; zawiera 9 tabel, 37 rysunków i wykresów, oraz 266 pozycji cytowanej literatury.

Badania własne Doktorantka poprzedziła 39 stronicowym przeglądem literatury, w którym szczegółowo przedstawiła interakcję roślina-mikroorganizm, a w szczególności znane formy odporności występujące w roślinach. Następnie omówiła wybrane związki naturalne związane z układem immunologicznym roślin należące do grupy fitoantycypin (saponiny, glukozynolany, benzoksazynony czy glukozydy cyjanogenne) i do grupy fitoaleksyn (stilbeny, terpenoidy, związki fenolowe itp.). Ta część opisana jest dość pobieżnie z podaniem jedynie wybranych przykładów np. w przypadku saponin są to interakcje awenacyna-Ggt czy też mniej znane antybiotyczne oddziaływania glikoalkaloidu tomatyny, podczas gdy bardziej dokładne badania dotyczące biosyntezy saponin triterpenowych były przeprowadzone na modelowym gatunku bobowatych *M. truncatula*. Podobnie cytowanie w przypadku benzoksazynonów pozycji z 1996 r. nie jest wystarczająco adekwatne i przypisywanie aktywności biologicznej aglikonowej części związku nie jest do końca prawdziwe. Dopiero produkty degradacji aglikonu (BOA): 2-amino-3H-fenoksazin-3-one (APO), 2-acetylamino-3H-fenoksazin-3-one (AAPO) i o-aminofenol (o-AP) wykazywały stukrotnie wyższe aktywności w stosunku do *Cephalosporium gramineum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *Graminis* i *Fusarium culmorum* niż sam aglikon (Martyniuk i in. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 1036-1039).

W dalszej kolejności przeglądu literatury, Doktorantka skupiła się na opisie gatunków roślin o poznanym genomie z rodziny krzyżowych wykorzystywanych w badaniach tolerancji/reakcji na stresy biotyczne i abiotyczne. Bardziej szczegółowo scharakteryzowała i uzasadniła celowość wybrania do swoich badań powszechnie wykorzystywanego gatunku *Arabidopsis thaliana* oraz czterech innych gatunków czyli *Capsella rubella*, *Cardamine hirsuta*, *Arabis alina* oraz *Thellungiella salsuginea*. W dalszej kolejności dość szczegółowo opisała najbardziej poznaną grupę związków naturalnych roślin krzyżowych tj. glukozynolany, przedstawiając ich struktury, biosyntezę, degradację i ich udział w odporności roślin. Omówiła również związki należące do grupy fitoaleksyn o strukturze indolowej przedstawiając ich biosyntezę i funkcję/znaczenie w odporności roślin na patogeny. Dwa związki z tej grupy tj. kamaleksyna i kwas indolilo-karboksylowy zostały w tym opisie szczególnie wyróżnione. Trzecią opisaną dość szczegółowo grupą występującą w roślinach krzyżowych są fenylopropanoidy, związki dość powszechnie występujące w roślinach i dość intensywnie badane z uwagi na łatwość detekcji w rozdzielach chromatograficznych.

Ta część pracy napisana jest bardzo starannie i logicznie, przez co łatwo wprowadza czytelnika w meritum zagadnienia. Cytowana literatura to głównie najnowsze pozycje obcojęzyczne, prawidłowo wyselekcjonowane z natłoku dostępnej informacji. Ta umiejętność selekcji i doboru pozycji najbardziej istotnych świadczy o dobrym rozeznaniu doktorantki w piśmiennictwie światowym i najnowszych osiągnięciach badań w zakresie jej zainteresowań.

Przegląd literatury dość dobrze wprowadza czytelnika w następny rozdział, jakim jest jasno sprecyzowany cel pracy. Celem głównym jest charakterystyka zmian zachodzących w szlakach metabolicznych związanych z odpowiedzią odpornościową na infekcję grzybem nekrotroficznym *Plectosphaerella cucumerina* (szczep zaadaptowany i nie zaadaptowany na

A. taliana) gatunków z rodziny Brassicaceae. Celem wtórnym jest identyfikacja nowych związków pełniących funkcje obronne oraz poznanie szlaków ich biosyntezy.

Metody badawcze zastosowane w recenzowanej pracy są poprawne i nie budzą zastrzeżeń. Ich duża różnorodność świadczy o bardzo wysokich umiejętnościach analitycznych Doktorantki. Wprawnie posługuje się zarówno technikami inżynierii genetycznej, jak i metodami oznaczania związków naturalnych. Potrafi posługiwać się wieloma technikami chromatograficznymi takimi jak: UPLC-PDA, UPLC-MS/MS oraz bazami danych służących do wstępnej identyfikacji nieznanymi związków. Ponadto z powodzeniem stosuje metody ekstrakcji związków naturalnych z matrycy roślinnej.

Ustosunkowując się krytycznie do tej części pracy nie jest jasne dla recenzenta dlaczego inokulację grzybem patogennym prowadzono na roślinach rosnących w doniczkach przy naturalnym oświetleniu, natomiast MAMP stosowano na rośliny rosnące w warunkach *in vitro* (schemat na stronie 52) utrzymywane pod komorą laminarną. Ponieważ warunki wzrostowe rośliny determinują w dużym stopniu profil metaboliczny (warunki *in vitro* znacznie go upraszczają) porównywanie tych dwóch obiektów jest wątpliwe. Może tu być też znaczący wiek roślin który dla roślin doniczkowych wynosił 4-5 tygodni podczas gdy w warunkach *in vitro* 13 dni. Brak również informacji o składzie światła w obu przypadkach. Ponadto trzy powtórzenia w przypadku badań metabolomicznych stanowi niezbędne minimum, chociaż według „dobrej praktyki laboratoryjnej” dotyczącej takich badań zaleca się stosowanie 5 lub 6 powtórzeń (patrz literatura poniżej):

Oliver Fiehn i in., Minimum reporting standards for plant biology context information in metabolomic studies, *Metabolomics* (2007) 3:195–201;

Lloyd W. Sumner i in., Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* (2007) 3:211–221.

Do wyjaśnienia przez Doktorantkę pozostaje również sprawa samej ekstrakcji prób roślinnych. Ekstrakcję prowadzono za pomocą DMSO (2.5 μ L DMSO na 1 mg świeżej masy próby). Do ekstrakcji pobierano 200 mg materiału roślinnego co po przeliczeniu daje 0,5 mL DMSO na 200 mg świeżego materiału roślinnego. Według recenzenta jest to zbyt mała objętość ekstraktanta. Według prawideł fitochemicznych stosunek ekstraktanta do materiału ekstrahowanego powinien wynosić 10:1. Uwzględnić należy również zawartość wody w świeżym materiale roślinnym której jeśli przyjąć że było jej 80% to faktycznie ekstraktant zawierał 0.5 mL DMSO+0.16 mL wody. Mogła ona mieć duży wpływ na ekstrakcję związków bardziej hydrofobowych. Z uwagi na te okoliczności należało zastosować standard wewnętrzny (a najlepiej dwa o różnej polarności) i określić dla nich wydajność i powtarzalność ekstrakcji. Wydaje się, że brak wzorca wewnętrznego i walidacji metody może być problemem przy publikacji wyników w fachowych czasopismach.

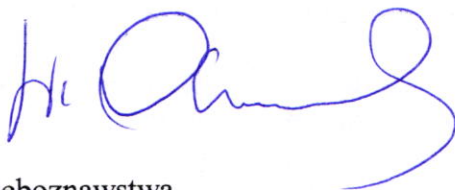
Paragraf IV zawierający zestawienie wyników badań jest napisany bardzo przejrzysto i logicznie. Zawiera on wszystkie dane dotyczące doboru szczepów *P. cucumerina* do inokulacji roślin, identyfikację metabolitów przeprowadzoną wstępnie na podstawie widm absorpcyjnych UV i czasów retencji znanych związków oraz identyfikację metabolitów metodą wysokorozdzielczej spektrometrii mas. Metody chromatograficzne pozwoliły również określić zróżnicowanie w odpowiedzi metabolomicznej badanych gatunków roślin krzyżowych, oznaczyć zmiany ilościowe w akumulacji metabolitów, jak również określić zasięg filogenetyczny indukowanych związków. W części genetycznej badania pozwoliły określić zależności filogenetyczne i transkryptomiczne szlaków metabolicznych związanych z odpowiedzią odpornościową. Ten paragraf nie budzi zastrzeżeń.

Ciekawie przedstawiona jest również dyskusja uzyskanych wyników. W sumie udało się odpowiedzieć na główne założenie celu pracy tj. zidentyfikować 35 związków

naturalnych, które w wyniku inokulacji grzybem *P. cucumerina* lub w wyniku rozpoznania wzorca molekularnego związanego z patogenem były w znacząco większych ilościach akumulowane w badanych gatunkach. Związki te należały do grupy metabolitów indolowych i fenylopropanoidowych. Nie są to struktury nieznane lecz raczej wcześniej opisane w literaturze. Oprócz tych dwóch grup zidentyfikowano kilka związków będących pochodnymi kwasów benzoesowego i terpenoidów a także aminokwasów i ich pochodnych. Pozwoliło to wysnuć wniosek że związki te pełnią istotną rolę w odpowiedzi odpornościowej w badanych gatunkach roślin. Jednakże reakcja poszczególnych gatunków była różna co miało odzwierciedlenie w zróżnicowaniu strukturalnym w tych gatunkach, jak i w stopniu wzrostu akumulacji. Jedynie 24% związków wykazywało zwiększoną akumulację w przynajmniej dwóch z badanych gatunków, co wskazuje na ogromne zróżnicowanie w odpowiedzi spokrewnionych gatunków na zakażenie patogenem i utwierdza w przekonaniu o występowaniu zmian ewolucyjnych odporności roślin związanej z substancjami naturalnymi. Zależności ewolucyjne stają się jeszcze bardziej wyraziste po skorelowaniu danych metabolomicznych z wynikami na poziomie genomu i transkryptomu. Ta część pracy jest mocno uwypuklona we wnioskowaniu uwzględniającym przeprowadzone badania genetyczne. W rozdziale VI na 11 sprecyzowanych wniosków aż 7 dotyczy obserwacji na poziomie genetycznym. Doktorantka zauważa w nich, że geny związane w metabolizmem tryptofanu w *A. thaliana* posiadają przynajmniej w jednym z badanych gatunków ortologu, które zachowały swoją funkcję w odpowiedzi odpornościowej. Ciekawy jest również wniosek sugerujący, że głównymi mechanizmami prowadzącymi do dywersyfikacji związków naturalnych w blisko spokrewnionych gatunkach jest duplikacja i neofunkcjonalizacja oraz utrata zdolności ekspresji poszczególnych genów. Bardzo ciekawy i o szerszym znaczeniu jest również wniosek wskazujący na brak zmian w ekspresji genów związanych ze szlakiem fenylopropanoidowym co może wskazywać na regulację tego szlaku na poziomie potranslacyjnym. Szlak fenylopropanoidowy wydaje się być dość specyficznym w metabolizmie roślinnym, gdyż na podstawie danych literaturowych wiadomo, że zmiany w akumulacji tych związków zachodzą w roślinie nie tylko pod wpływem zakażenia patogenem, ale również w innych przypadkach działania na nią czynników biotycznych i abiotycznych. Nie można go więc jednoznacznie wiązać z funkcją odpornościową w stosunku do takiego czy innego patogena czy szkodnika.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę w ocenianej dysertacji stanowią cenny naukowo materiał poznawczy. Chciałbym wyraźnie podkreślić, że jest to materiał bardzo bogaty i wielowątkowy, o cennych dla nauki wnioskach. Przedstawione uwagi krytyczne, jakie zawarłem w ocenie mają oczywiście charakter dyskusyjny i w niczym nie umniejszają mojej wysokiej oceny przedstawionej do recenzji pracy. Uważam, że zawiera ona wiele bardzo interesujących wątków (o niektórych nie wspomniałem w ocenie), a zastosowane techniki badawcze, ich różnorodność, dobra znajomość literatury, umiejętność klarownego przedstawienia wyników, świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy naukowej. Przedstawiona do oceny praca odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. W związku z powyższym stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Kułak do publicznej obrony swojej pracy.

Puławy 28 grudnia 2017



Prof. dr hab. Wiesław Oleszek
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy
W Puławach