



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel. centrala: 61 6550200, sekretariat: 61 6550255 E-mail: office@igr.poznan.pl www.igr.poznan.pl
NIP: 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

prof. dr hab. Piotr Kachlicki
Laboratorium Multiomiki

Poznań, 26 sierpnia 2021 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Pawła Czerniawskiego
pt.: „Unikalne zmiany w biosyntezie glukozynolanów wśród gatunków plemienia
Camelineae rodziny Brassicaceae”

1. Znaczenie podjętych badań

Glukozynolany stanowią stosunkowo nieliczną kategorię metabolitów wtórnych, liczącą około 150 zidentyfikowanych dotąd związków, wytwarzanych przez rośliny klasyfikowane w gatunkach należących do kilku zaledwie rodzin. Mimo tak pozornie marginalnego ich znaczenia w stosunku do kilkuset tysięcy znanych roślinnych produktów naturalnych, związki te są przedmiotem zainteresowania już od czasów starożytnych. Przypisywane im właściwości lecznicze były przez wieki wykorzystywane w medycynie naturalnej, walory smakowe stanowiły o przydatności warzyw i przypraw. Z drugiej strony jednak antyżywniowe właściwości niektórych z produktów enzymatycznego rozkładu glukozynolanów (zwłaszcza 2-hydroksy-3-butenylowego) poważnie ograniczały na przykład możliwość stosowania śruty rzepakowej jako karmy dla zwierząt. Już wiele lat temu stwierdzono ważną rolę glukozynolanów w procesach odpornościowych roślin wobec insektów, grzybów i bakterii chorobotwórczych. Stąd wynikał obserwowany w drugiej połowie XX w. znaczny postęp badań nad chemicznymi oraz biologicznymi właściwościami tych związków i związanych z nimi enzymami hydrolitycznymi, a także rozwój metod analitycznych ilościowego i jakościowego ich oznaczania w materiale roślinnym. Jednak podejmowane podówczas próby określenia genetycznego uwarunkowania zawartości glukozynolanów były wtedy z rozmaitych powodów skazane na niepowodzenie. Między innymi nie potrafiono w tamtym czasie wyjaśnić przyczyn zróżnicowania w regulacji ilościowej zawartości glukozynolanów alkilowych i indolowych w określonych genotypach roślin. Dopiero zsekwencjonowanie genomu *Arabidopsis thaliana* w roku 2000 a później kolejnych genomów gatunków pokrewnych, identyfikacja genów odpowiedzialnych za biosyntezę tych związków i regulację tego procesu a także uzyskanie znacznej liczby mutantów i linii transgenicznych pozbawionych ekspresji ściśle określonych genów umożliwiły szybki postęp badań genetycznych. Duże znaczenie poznawcze ma ustalenie powiązań procesów biosyntezy i metabolizmu glukozynolanów indolowych z obecnością innych pochodnych indolowych w tym hormonów z grupy auksyn czy też fitoaleksyn – pochodnych kamaleksyny. Co więcej ostatnio identyfikuje się coraz więcej nowych funkcji

tych związków takich jak wpływ na funkcjonowanie aparatów szparkowych, powiązanie z reakcją roślin na cykl dobowy, czy też inicjacją kwitnienia.

Jakkolwiek uważano, że glukozynolany są syntetyzowane i/bądź akumulowane we wszystkich częściach roślin rodziny Brassicaceae stwierdzano jednak na przykład zaskakujący brak tych związków w liściach, lecz ich obecność w nasionach, Inicznika (*Camelina sativa*) i niektórych genetycznie zbliżonych gatunków. Recenzowana rozprawa doktorska przedstawia uwieńczony sukcesem badania mające na celu wyjaśnienie tego zjawiska i znalezienie jego genetycznego uwarunkowania. Czerpiąc z bogatego zestawu linii genetycznych uzyskanych z różnych laboratoriów oraz wytwarzając własne transformanty Doktorant bardzo sprawnie wykonał analizy ilościowe badanych związków a także korzystając z baz danych oraz narzędzi bioinformatycznych przeprowadził analizę porównawczą klastrów genów odpowiedzialnych za ich biosyntezę oraz sekwencji odpowiednich enzymów.

2. Ocena pracy

Oceniana rozprawa ma charakter monografii, obejmuje 148 stron i posiada układ typowy dla prac doktorskich. Zawiera ona 44 rysunki i 8 tabel (plus dwie tabele uzupełniające, zawierające dane spektrometryczne analizowanych związków). Część uzyskanych wyników została opublikowana na początku tego roku (Phytochemistry 181 (2021) 112571)

Wykaz skrótów zamieszczony na trzech stronach obejmuje skróty nazw reagentów i technik stosowanych w pracach badawczych, nazw analizowanych związków i innych pojęć używanych w pracy.

Wysoko należy ocenić **Wstęp** stanowiący wnikliwe wprowadzenie literaturowe na 27 stronach i zaznajamiający czytelnika z aktualnym stanem wiedzy na temat glukozynolanów, szlaków ich biosyntezy i genetycznego uwarunkowania tego procesu, metod identyfikacji ich struktur i analizy ilościowej. Rozdział ten jest dobrze, zwięźle i precyzyjnie napisany, na uwagę zasługuje odnośnienie się także do najnowszej literatury naukowej w tym zakresie. Mam jednak parę drobnych zastrzeżeń do niektórych sformułowań Autora.

W omówieniu metod identyfikacji struktur badanych związków na str. 20 czytamy: „Jednak wciąż najdokładniejszą metodą ustalania struktur glukozynolanów pozostaje 1H NMR [20]”. Jednak nie jest to do końca prawdą, jak to zresztą ilustrują autorzy cytowanej pracy, w przypadku glukozynolanów o złożonej strukturze – np. związków zawierających zestryfikowaną cząsteczkę glukozy, czy też występujących w postaci izomerów optycznych – konieczne jest stosowanie dwuwymiarowych technik NMR, nie tylko COSY, ale także HMBC i HSQC.

Nie do końca rozumiem intencję Autora zawartą w zdaniu „Przeprowadzone do tej pory analizy LC-MS wielu innych gatunków Brassicaceae, potwierdzają, że każda z klas glukozynolanów obecna jest konstytutywnie we wszystkich organach przedstawicieli różnych plemion tej rodziny” (str. 32). Jest to stwierdzenie zdecydowanie zbyt ogólne, można podać wiele przykładów gatunków pozbawionych niektórych klas tych związków w pewnych częściach rośliny np. glukozynolany benzytowe (glukozynolan fenyloetylowy) są akumulowane w korzeniach lecz nie w pozostałych częściach różnych roślin gatunków *Brassica*.

Cel pracy poprawnie i precyzyjnie przedstawia główne koncepcje i przewidywane efekty planowanych doświadczeń. Należy tu podkreślić, że sformułowane tu zamierzenia Autora stanowią poważny problem badawczy z zakresu analityki chemicznej, genetyki i

biologii molekularnej i zrealizowanie takiego celu jest możliwe jedynie w najlepszych laboratoriach.

Rozdział **Materiał i metody** na 20 stronach szczegółowo przedstawia wykorzystywany materiał roślinny, pochodzący z różnych światowych laboratoriów oraz mutanty wygenerowane w trakcie realizacji tej pracy. Na uwagę zasługuje też szeroki wachlarz metod eksperymentalnych zastosowanych w trakcie badań obejmujący metodę chemicznego oznaczania zawartości glukozynolanów, bioinformatyczne metody identyfikacji ortologów genów związanych z biosyntezą tych związków, metody analizy ekspresji genów oraz metody transformacji genetycznych i uzyskiwania mutantów o pożądanym modyfikacjach genomu. Zastosowano metodę ilościowego i jakościowego porównywania zestawów glukozynolanów przy użyciu ultrasprawnej chromatografii cieczowej połączonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (UPLC-MS). Należy tu wspomnieć, że metoda ta nie jest w pełni ilościowa: nie stosowano standardów wewnętrznych czy też kalibracji instrumentu przy użyciu wzorców. Ale, jak wynika także z moich własnych doświadczeń z analizą tych związków oraz znajomości zastosowanej techniki analitycznej, jest to jedyna metoda umożliwiająca realizację celu prowadzonych badań. W badanych ekstraktach są obecne, niekiedy w znacznych stężeniach, liczne inne związki absorbujące światło UV, natomiast niektóre glukozynolany są obecne w ilościach śladowych bądź nieobecne w ogóle, co praktycznie wykluczyło możliwość zastosowania tego typu detektorów. Podobnie – wykrycie i analiza zróżnicowania zawartości kwasu indoliloctowego a zwłaszcza niektórych jego koniugatów byłyby niezwykle trudne.

Nie ma również wątpliwości co do prawidłowości zastosowania metod z zakresu biologii molekularnej. Na uwagę zasługuje umiejętne zastosowanie metod transformacji genetycznej przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* w celu introdukcji określonych genów do badanych roślin umożliwiającej potwierdzenie genetycznego uwarunkowania obserwowanych różnic akumulacji glukozynolanów oraz pochodnych kwasu indoliloctowego. Wykorzystanie transformantów umożliwiło potwierdzenie funkcji poszczególnych czynników transkrypcyjnych w regulacji biosyntezy badanych związków.

Rozdział **Wyniki** stanowi najobszerniejszą (48 stron, 33 rysunki, 4 tabele) część rozprawy. Analiza zawartości glukozynolanów przeprowadzona metodą UPLC-MS umożliwiła identyfikację oraz ilościowe oznaczenie 30 związków. Dzięki optymalizacji programu chromatograficznego uzyskano ich dobry rozdział a rejestracja deprotonowanych cząsteczek i ich fragmentacji umożliwiła ich poprawną identyfikację oraz porównawczą analizę ilościową. Potwierdzono unikalny dla Brassicaceae brak glukozynolanów w liściach i pędach roślin badanego kładu Camelinae. Na uwagę zasługuje fakt, że ich poziom w tłuszczynach jest porównywalny z obserwowanym u modelowej, blisko spokrewnionej rośliny *Arabidopsis thaliana*, a w korzeniach nawet kilkukrotnie wyższy. Stwierdzono również odmienny profil strukturalny zarówno glukozynolanów alkilowych jak i indolowych porównywanych genotypów. Obserwowane zróżnicowanie znalazło swoje uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach ekspresji genów *CYP* oraz *SUR* biorących udział w biosyntezie glukozynolanów alkilowych, filogenetycznego zróżnicowania genów *MAM* odpowiedzialnych za elongację łańcucha bocznego metioniny w tym procesie, ewolucji genów *CYP81F* oraz *IGMT* ze szlaku syntezy glukozynolanów indolowych. Przeprowadzono także badania dotyczące genów kodujących czynniki transkrypcyjne *MYB* odpowiedzialne za regulację biosyntezy glukozynolanów alkilowych i indolowych. Stwierdzono, że większość z tych genów jest wysoce konserwatywna w badanych gatunkach, z wyjątkiem genu *MYB34*, którego w ogóle nie znaleziono w *Camelina sativa* oraz *Neslia paniculata*, a który w pozostałych gatunkach kładu Camelinae podległ licznym zmianom sekwencji. Fakt ten wraz zaobserwowanym brakiem ekspresji genu *MYB34* w badanych częściach roślin rodzaju *Capsella* skłonił Autora

do wytworzenia linii transformowanych: mutantów *Arabidopsis thaliana*, w których natywny gen *MYB34* zastąpiono genem z *Capsella rubella* oraz kombinacji odwrotnej. Stwierdzono, że mimo uzyskania ekspresji wprowadzonego genu w *Arabidopsis* nie podniosła się biosynteza glukozynolanów indolowych, natomiast w *Capsella rubella* gen *MYB34* z *Arabidopsis thaliana* spowodował wzrost poziomu tych związków oraz zmiany w ich profilu. W ostatniej części pokazano, że brak czynnego genu *MYB34* u *Arabidopsis thaliana* ma istotny wpływ na biosyntezę kwasu indoliloctowego i jego pochodnych, co odróżnia ten gen od pozostałych genów kodujących czynniki transkrypcyjne MYB. Wszystkie powyższe wyniki mają bardzo istotną wartość naukową i stanowią poważny krok do zrozumienia molekularnych podstaw procesu biosyntezy bardzo ważnych metabolitów wtórnych roślin Brassicaceae.

Autor nie ustrzegł się pewnych niefortunnych sformułowań, których w przyszłości należałoby unikać. Użycie określenia „...preferencje badanych gatunków do produkcji AG...” (np. str. 67 lecz także w paru innych miejscach) sugerowałoby jakiś świadomy wybór rośliny, podczas gdy zjawisko to dotyczy jedynie uwarunkowanej genetycznie zdolności. Sformułowanie „...zmiany ewolucyjne (...) są szybsze...” (np. str. 86) należałoby zastąpić przez „zmiany ewolucyjne (...) nastąpiły wcześniej”. Podobnie sformułowanie „...C-końce [białek] podlegają przyspieszonym zmianom ewolucyjnym...” (str. 90) należałoby zastąpić określeniem w rodzaju „...były przedmiotem intensywniejszych procesów ewolucyjnych...”.

Dyskusja przeprowadzona na 15 stronach odnosi się do najważniejszych wyników uzyskanych w opisywanych badaniach. Wysoko oceniam podrozdziały Dyskusji odnoszące się do chemicznych aspektów przeprowadzonych badań takich jak organospecyficzny wzór akumulacji glukozynolanów w badanych gatunkach roślin, molekularne przyczyny obniżonej biosyntezy glukozynolanów indolowych, braku glukozynolanów w liściach kladu Camelinae czy zróżnicowania długości łańcuchów bocznych glukozynolanów alkilowych. Pewne zastrzeżenia mam natomiast do pewnych odniesień biologicznych.

Prace mające na celu określenie roli glukozynolanów w procesach odpornościowych roślin Brassicaceae prowadzono już w latach 70. i 80. XX w. Stwierdzono wtedy, że pełnią rolę ochronną wobec różnych owadów, wskazując jednak, że niektóre z nich jak *Pieris brassicae* czy *Phyllotreta armoraciae* rozpoznają roślinę-gospodarza dzięki wytwarzanym przez nią izotiocyjanianom. Natomiast wciąż nie jest jasny ich udział w odporności na choroby powodowane przez patogeny grzybowe. Obserwowano *in vitro* hamowanie wzrostu kultur różnych grzybów przez izotiocyjaniny czy też indukcję biosyntezy glukozynolanów w roślinach w wyniku infekcji. Dotyczy to między innymi odporności na bardzo ważną ekonomicznie szarą zgniliznę kapustnych (Autor użył niestosowanej w Polsce nazwy „czarna nóżka” będącej bezpośrednim tłumaczeniem angielskiego „blackleg”) wynikającą z porażenia przez grzyb *Leptosphaeria maculans*. Jednak stwierdzono też, że genetyczne uwarunkowanie odporności rzepaku na tę chorobę ma inne podłoże, zupełnie niezwiązane z profilem i ilościową zawartością glukozynolanów w tkankach.

Zastrzeżenia też budzi pojęcie ewolucji wstecznej używane przez Autora. Pojęcie to, jak również niekiedy używane „ewolucja regresywna” bywają stosowane do określania upraszczania struktury organizmów w przeciwieństwie do ewolucji, która ma prowadzić do zwiększenia ich złożoności. Jednak należy mieć na uwadze fakt, że procesy ewolucyjne, które zachodziły spontanicznie w skali tysięcy czy milionów lat i zachodzą nadal, nie mają określonego kierunku, a my obecnie możemy obserwować wyłącznie ich efekt. Wobec tego rozważania (str. 120) dotyczące ewentualnego pojawienia się nowych metabolitów odpornościowych jako przyczyny zaniknięcia szlaków biosyntezy glukozynolanów są chyba jednak spekulacją.

Na zakończenie rozprawy sformułowano 11 **Wniosków**. Z większością z tych wniosków całkowicie się zgadzam, w kontekście moich uwag dotyczących wstecznej ewolucji uważam jednak, że Wnioski 4, 5, oraz 9 należałoby przerehabilitować.

Bibliografia cytowana w rozprawie doktorskiej obejmuje 184 pozycje niemal wyłącznie (poza jedną pracą przeglądową) anglojęzycznej literatury naukowej.

Kończąc recenzję rozprawy doktorskiej chciałbym podkreślić bardzo zróżnicowaną metodykę badawczą zastosowaną przez Doktoranta, staranność wykonania prac eksperymentalnych i przeprowadzenie ich w znacznej liczbie powtórzeń biologicznych, co zapewniło wysoką rzetelność sformułowanych wniosków. Jednocześnie stwierdzam, że całość rozprawy doktorskiej ma bardzo wysoki poziom merytoryczny, a moje drobne krytyczne uwagi zawarte w recenzji mają na celu wskazanie potrzeby dbałości o precyzję przekazu. Nie mają one oczywiście najmniejszego wpływu na wybitnie pozytywną ocenę przedstawionej rozprawy.

3. Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z przedstawioną mi rozprawą doktorską stwierdzam, że jest ona bardzo interesującym doniesieniem w ważki sposób przyczyniającym się do poznania genetycznych uwarunkowań biosyntezy glukozyzolanów – grupy metabolitów wtórnych o istotnym znaczeniu w reakcjach odpornościowych roślin jak i z punktu widzenia praktycznego wykorzystywania roślin z rodziny Brassicaceae. Wszystkie cele wykonanej pracy zostały pomyślnie zrealizowane. Ponieważ bez wątpienia praca spełnia wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu o dopuszczenie pana mgr. Pawła Czerniawskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

