



**Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**

Dr hab. Anna Stojakowska  
Zakład Fitochemii  
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk  
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

Kraków, 09/05/2022

### **Recenzja**

rozprawy doktorskiej mgr inż. Wojciecha Makowskiego  
zatytułowanej

**„Fizjologiczne podstawy syntezy wybranych metabolitów wtórnych  
w elicytowanych i transformowanych kulturach tkankowych roślin *Dionaea muscipula* J.  
Ellis i ich właściwości antybakteryjne.”**

wykonanej w Katedrze Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie  
pod kierunkiem promotora – dr hab. Inż. Aleksandry Królickiej, prof. UG  
i promotora pomocniczego – dr inż. Krzysztofa Tokarza, prof. URK

Nieodróżniane hodowle tkankowe roślin oraz hodowle in vitro mikropędów i korzeni stanowią bardzo dobry system doświadczalny do badań nad regulacją wtórnego metabolizmu roślin. Jego zastosowanie jest szczególnie uzasadnione w przypadku roślin rzadkich i podlegających ochronie. Muchotłówka amerykańska (*Dionaea muscipula*), jakkolwiek często hodowana na sprzedaż jako roślina doniczkowa, w swoim naturalnym środowisku jakim są przybrzeżne torfowiska Karoliny Północnej i Południowej (USA) występuje coraz mniej licznie i na malejącej liczbie stanowisk, co sprawiło, że rozważa się objęcie tego gatunku ochroną. Ekstrakt z muchotłówki jest wykorzystywany w medycynie tradycyjnej, stąd zainteresowanie metabolitami syntetyzowanymi przez roślinę i ich aktywnością biologiczną.

Przedstawiona do oceny rozprawa poświęcona jest badaniu wpływu procesu elicytacji, za pomocą lizatu bakterii *Cronobacter sakazakii*, na wytwarzanie wybranych metabolitów wtórnych (wyspecjalizowanych) przez hodowle pędów muchotłówki prowadzone w pożywce płynnej z aeracją mechaniczną (wstrząsarka rotacyjna) oraz produktywności kultur teratom pędowych muchotłówki uzyskanych poprzez transformację genetyczną przy użyciu „dzikich” szczepów *Rhizobium rhizogenes*. W przypadku teratom pędowych badano także liczne parametry fizjologiczne tkanki roślinnej jak poziom oksydacji lipidów, zawartość proliny, tyrozyny i karotenoidów, aktywność enzymów antyoksydacyjnych, obecność zredukowanej i utlenionej formy glutationu, zawartość lipidów i cukrów. Dysertacja obejmuje trzy oryginalne wieloautorskie prace eksperymentalne, opublikowane w latach 2020-2021, w czasopismach o ustalonym współczynniku oddziaływania (IF), opatrzone zbiorczym omówieniem i stosowną dokumentacją.

Doktorant jest pierwszym autorem wszystkich trzech prac eksperymentalnych i wraz z promotorami autorem korespondującym. Według załączonych oświadczeń współautorów, Pan Magister Wojciech Makowski jest też współtwórcą koncepcji badań i postawionych hipotez badawczych, zaprojektował i przeprowadził większość eksperymentów, opracował i zinterpretował wyniki badań oraz przygotował pierwsze wersje manuskryptów. Prace zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, w trybie „open access”. Współczynnik oddziaływania czasopism wynosił 3,267 – 4,813. Sumaryczna punktacja MEiN, w odniesieniu do trzech



wymienionych prac eksperymentalnych, wynosi 340. Pomimo że od publikacji pierwszych wyników upłynęły zaledwie dwa lata, były one już kilkakrotnie cytowane przez innych badaczy, a liczba ich cytowań łącznie z autocytowaniami wynosi 13 (Web of Science).

Publikacje wchodzące w skład rozprawy poprzedzone są zbiorczym opracowaniem, liczącym 29 stron i obejmującym: wykaz stosowanych skrótów, wykaz publikacji z krótką informacją bibliometryczną i oświadczeniami doktoranta dotyczącymi jego wkładu w powstanie poszczególnych prac, wstęp teoretyczny z materiałem ilustracyjnym (dwie ryciny i jedna fotografia), przedstawienie głównych celów i zadań badawczych pracy doktorskiej, omówienie szczegółowych celów i wyników poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wnioski będące weryfikacją postawionych hipotez badawczych, krótkie podsumowanie i spis literatury obejmujący 49 pozycji, w większości cytowanych także w opublikowanych pracach eksperymentalnych, w tym 15 pozycji współautorstwa doktoranta i promotorów pracy doktorskiej. Opracowanie zamykają streszczenia rozprawy w językach polskim i angielskim.

Wstęp teoretyczny zwięźle prezentuje bieżący stan wiedzy na temat roślin mięsożernych z rodziny Droseraceae, a w szczególności muchołówki amerykańskiej jako gatunku modelowego w badaniach nad mięsożernością i elektrofizjologią roślin, przedstawia metabolity fenolowe rosiczkowatych, omawia biosyntezę, właściwości i potencjalne zastosowanie związków fenolowych syntetyzowanych przez muchołówkę oraz kultury *in vitro*, elicytację i transformację genetyczną jako techniki o potencjalnym zastosowaniu w badaniach nad muchołówką amerykańską i jej metabolizmem. Doktorant odwołuje się tutaj do 43 pozycji piśmiennictwa, z których jedynie siedem pochodzi sprzed roku 2010. Jest to atut świadczący o znajomości bieżących doniesień literaturowych, ale też ograniczenie. We wstępie brakuje informacji dotyczących pionierskich prac nad mikrorozmnażaniem *in vitro* muchołówki, techniki od dawna powszechnie stosowanej w pozyskiwaniu materiału roślinnego dla celów komercyjnych, a także na temat metabolitów wyspecjalizowanych izolowanych z hodowanych *in vitro* pędów tej rośliny. Co prawda cytowana przez doktoranta praca przeglądowa Banasiuka i współautorów (2012) wymienia niektóre wcześniejsze doniesienia poświęcone kulturom *in vitro* muchołówki, niemniej jednak od autora dysertacji należałoby oczekiwać szczegółowego wprowadzenia czytelnika w zagadnienia o podstawowym znaczeniu dla interpretacji uzyskanych przez niego wyników. W szczególności zastanawia brak w cytowanej literaturze monografii autorstwa Kukułczanki i Budzianowskiego „*Dionaea muscipula* Ellis (Venus Flytrap): *In vitro* cultures and *in vitro* production of secondary metabolites” opublikowanej, w roku 2002, w wydawnictwie seryjnym „Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants” pod redakcją Nagaty i Ebizuki, zawierającej wyczerpujące dane dotyczące metabolitów wtórnych produkowanych przez kultury *in vitro* *Dionaea muscipula*. W tekście wstępu znalazły się także pewne niedoprecyzowane lub wieloznaczne fragmenty. Na przykład, ryzykowne wydaje się stwierdzenie, że transformacja genetyczna za pomocą dzikich szczepów *Rhizobium rhizogenes* jest narzędziem służącym do zwiększania puli cennych metabolitów wtórnych. Bynajmniej nie jest to regułą. Jeśli jako konsekwencję zakażenia rośliny bakteriami *R. rhizogenes* wymieniono „hairy root syndrome”, to odpowiednio dla *R. tumefaciens* należałoby wymienić „crown gall syndrome”. Zaburzenia gospodarki hormonalnej roślin zainfekowanych wymienionymi bakteriami z rodzaju *Rhizobium* nie wynikają stricte ze zmian w genomie rośliny-gospodarza prowadzących do syntezy opin. Nieco niezręczne wydaje się też sformułowanie „wysoka aktywność biologicznie czynna”. Są to jedynie błędy redakcyjne łatwe do skorygowania.



Główny cel naukowy pracy – opracowanie efektywnych narzędzi biotechnologicznych prowadzących do zwiększenia syntezy związków fenolowych w kulturach tkankowych muchotłówki amerykańskiej oraz zadania badawcze służące jego realizacji zostały logicznie i precyzyjnie sformułowane i uzasadnione. Jedynie zadania badawcze wymienione w punkcie trzecim i szóstym wymagałyby pewnej korekty redakcyjnej. Wybrana strategia elicytacyjna może bowiem prowadzić do zmian w aktywności biologicznej ekstraktów uzyskanych z roślin poddanych elicytacji, nie może natomiast wywołać zmian aktywności biologicznie czynnych metabolitów wtórnych rozumianych jako poszczególne związki. Co do punktu szóstego, transformacja za pomocą dzikiego szczepu *R. rhizogenes* nie jest zdarzeniem prowadzącym do włączenia jednego, wybranego genu do genomu rośliny-gospodarza. Poza tym, że istnieje kilka genów *rol*, także inne geny z plazmidu Ri mogą ulegać integracji do genomu roślinnego. Aby mówić o odpowiedzi na obecność konkretnego genu *rol* w genomowym DNA, należałoby wcześniej wykluczyć obecność w genomie rośliny wszystkich innych genów przenoszonych przez plazmid Ri.

„Omówienie szczegółowych celów i wyników poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej” zawiera podsumowanie poczynionych założeń i uzyskanych wyników eksperymentalnych opublikowanych wcześniej w formie recenzowanych prac oryginalnych.

Pierwsza z publikacji poświęcona jest zmianom w metabolizmie hodowanych *in vitro* roślin *Dionaea muscipula* spowodowanym zastąpieniem hodowli stacjonarnej w pożywce zestalonej agarem hodowlą w pożywce płynnej prowadzoną na wstrząsarce rotacyjnej. Zwiększonemu przyrostowi biomasy roślin prowadzonych w podłożu płynnym towarzyszył spodziewany spadek stosunku suchej do świeżej masy wskazujący na wzrost uwodnienia tkanki. Przejście na hodowlę w pożywce płynnej skutkowało także istotnym zwiększeniem całkowitej zawartości fenoli, fenylopropanoidów, flawonoidów i antocyjanów w badanym materiale roślinnym. Ponadto badano wpływ elicytora - lizatu z bakterii *Cronobacter sakazakii* – na wzrost roślin, zawartość związków fenolowych w biomacie (w tym: całkowitych fenoli, fenylopropanoidów, flawonoidów, antocyjanów oraz wybranych związków, jak plumbagina, kwas kawowy mirycetyna, kwas elagowy, hyperozyd, kwercetyna i kwas salicylowy) oraz na aktywność biologiczną (wychwył wolnych rodników i działanie przeciwbakteryjne) wyciągów z hodowanych *in vitro* roślin muchotłówki. Można się spierać czy założenie, że efektywność elicytacji będzie zależna od stężenia elicytora i czasu trwania elicytacji zasługuje na miano hipotezy. Jest to raczej powszechnie znana i wielokrotnie dowiedziona zależność. Zastosowany elicytor, w zakresie badanych stężeń, nie wpływał na wzrost roślin muchotłówki. Indukował natomiast zmiany w zawartości związków fenolowych w roślinach (na przykład istotny wzrost całkowitej zawartości fenoli i fenylopropanoidów w roślinach traktowanych najwyższym z badanych stężeniem elicytora – 5%) oraz zmiany w aktywności biologicznej ekstraktów uzyskanych z elicytowanych roślin, w odniesieniu do roślin kontrolnych. Po siedmiu dniach trwania elicytacji zaobserwowano istotnie zwiększoną aktywność antyrodnikową wyciągów z elicytowanych roślin. Aktywność antybakteryjna wyciągów wobec bakterii Gram-dodatnich wzrastała wraz z czasem trwania elicytacji (5-7 dni), natomiast słaba aktywność wobec pałeczek Gram-ujemnych była nieco wyższa w porównaniu z kontrolą dla wszystkich wyciągów uzyskanych z roślin poddanych elicytacji (niezależnie od dawki elicytora i czasu trwania elicytacji). Zarówno zastosowanie pożywki płynnej z aeracją mechaniczną jak i zastosowanie opisanego lizatu jako elicytora w hodowlach *in vitro* *Dionaea muscipula* mają niewątpliwy walor nowości. Wymienione modyfikacje warunków hodowli zwiększają zawartość związków fenolowych w biomacie i prowadzą do wzrostu aktywności biologicznej wyciągów otrzymanych z hodowanego materiału roślinnego. Autorzy nie wspominają jednak czy aktywne metabolity są wydzielane do



pożywki hodowlanej i czy proces ten (o ile zachodzi) również podlega modyfikacji na skutek zmian warunków hodowli. Inną zastanawiającą kwestią jest niezwykle wysoka zawartość kwasu salicylowego w badanym materiale roślinnym (około 300 mg/g suchej masy), dotychczas nieopisana w literaturze. Specyficzny dobór oznaczanych ilościowo związków fenolowych (plumbagina, mirycetyna, hyperozyd, kwercetyna, kwas kawowy, kwas elagowy i kwas salicylowy) spowodowany był zapewne dostępnością wzorców analitycznych.

Druga z prac wchodzących w skład cyklu dotyczy transformacji genetycznej roślin *Dionaea muscipula* za pomocą wybranych linii wektora bakteryjnego – *Rhizobium rhizogenes* i oceny produktywności transformowanej tkanki roślinnej. Oceniano przyrosty biomasy, zawartość związków fenolowych i aktywność antibakteryjną kilku klonów teratom pędowych uzyskanych w procesie transformacji. Wykazano zróżnicowaną wirulencję użytych linii agropinowych *R. rhizogenes* w stosunku do muchołówki. Dwie z trzech użytych w eksperymencie linii spowodowały wytworzenie teratom pędowych będących efektem transformacji genetycznej. Uzyskane klony transformantów różniły się między sobą tempem przyrostu biomasy, zawartością związków fenolowych i aktywnością przeciwbakteryjną. Działanie przeciwbakteryjne zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych było powiązane z zawartością związków fenolowych. Należy zaznaczyć, że przedstawiona publikacja jest pierwszą opisującą uzyskanie transformowanej genetycznie hodowli *D. muscipula* wyżej wymienioną metodą, a doktorant realizował ją w ramach własnego projektu badawczego, finansowanego przez NCN.

Jak stwierdza w omówieniu Autor; „Obecność poszczególnych genów z rodziny *rol* w genomie roślinnym i liczba kopii, w jakich zostaną one wbudowane, jest jednym z głównych czynników determinujących fenotyp rośliny transformowanej.” Należałoby tu wspomnieć również o miejscu integracji plazmidowego DNA do genomu rośliny. Zarówno w omówieniu jak i w pracy oryginalnej wspomniano jedynie, że dokonano weryfikacji obecności w genomowym DNA transformantów genów *rolC* i *rolB*, pochodzących z lewostronnej sekwencji bakteryjnego T-DNA. Co z pozostałymi genami *rol* i z genami pochodzącymi z sekwencji prawostronnej? Ponownie uwagę zwraca wyjątkowo wysoka zawartość kwasu salicylowego w materiale roślinnym (około 650 mg/g suchej masy w przypadku klonu E). Czy aby na pewno nie wkraść się tu jakiś błąd?

Tytuł trzeciej pracy eksperymentalnej „Response of physiological parameters in *Dionaea muscipula* J. Ellis teratomas transformed with *rolB* oncogene” niezbyt fortunnie sugeruje introdukcję jedynie jednego, wyselekcjonowanego genu bakteryjnego do genomu rośliny, podczas gdy transformację przeprowadzano za pomocą dzikich szczepów *R. rhizogenes*. W publikacji tej przeanalizowano wybrane parametry biochemiczne dwóch wybranych klonów teratom pędowych, w odniesieniu do nietransformowanych roślin muchołówki hodowanych w tych samych warunkach. Szczególnie dużo uwagi poświęcili Autorzy stanowi redoks w tkankach teratom i roślin nietransformowanych, oznaczając aktywność peroksydazy, katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej oraz oznaczając antyoksydanty nieenzymatyczne (glutation, karotenoidy) i aldehyd malonowy jako marker stresu oksydacyjnego. Ponadto, oznaczono zawartości proliny, tyrozyny, lipidów, skrobi i innych cukrów oraz związków fenolowych. Oprócz związków zaangażowanych w podstawowe procesy metaboliczne, analizowano także metabolity wyspecjalizowane z grupy związków fenolowych (kwasy: galusowy, protokatechowy, chlorogenowy, p-kumarowy, ferulowy oraz flawonol – kemferol). Wykazano zróżnicowanie odpowiedzi fizjologicznej i zawartości analizowanych związków w badanym materiale roślinnym. Uzyskane wyniki nie pozwoliły jednoznacznie wskazać jakie zmiany w metabolizmie rośliny (poza wzrostem aktywności



dysmutazy ponadtlenkowej i zawartości karotenoidów) są spowodowane wbudowaniem genów z plazmidowego DNA do genomowego DNA muchotłówki.

W omówieniu pracy, we frazie „...opisanie potencjalnych strategii aklimatyzacyjnych roślin muchotłówki amerykańskiej do obecności w jej genomie obcych genów...” sugerowałabym zmianę pojęcia „aklimatyzacja” na adaptacja. Trzecia hipoteza postawiona dla tej pracy, zakładająca, że: „...odpowieź wybranych klonów muchotłówki amerykańskiej na transformację będzie różna pomimo obecności genu *ro/B* inkorporowanego w jednej kopii do genomu obu z nich”, znalazła już swoje potwierdzenie i została poddana dyskusji w poprzedniej pracy.

Wnioski sformułowano poprawnie, w oparciu o uzyskane wyniki eksperymentalne. We wniosku dziesiątym termin „aklimatyzacja” powinien ulec zmianie, jak zaproponowałam wcześniej.

Na stronach 30-35 pracy doktorskiej zamieszczono wykaz publikacji i doniesień konferencyjnych, współautorstwa doktoranta, niewchodzących w zakres pracy doktorskiej; informację o realizowanych projektach badawczych, odbytych stażach naukowych, działalności recenzenckiej i informację naukometryczną. W wykazie publikacji znajduje się: jeden rozdział w anglojęzycznej monografii naukowej; osiem oryginalnych prac eksperymentalnych, opublikowanych w czasopismach z bazy Web of Science (IF 1,438 – 5,923); 24 doniesienia konferencyjne, w tym dziewięć na konferencjach o zasięgu międzynarodowym. Doktorant realizował projekt finansowany przez macierzystą uczelnię, a także był kierownikiem projektu „Preludium 16”, przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki. W latach 2017-2020 odbył sześć krótkoterminowych staży krajowych (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie i Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) oraz jeden dwupółmiesięczny staż, w ramach programu Erasmus+, w Instytucie Botaniki Eksperymentalnej Czeskiej Akademii Nauk w Ołomuńcu (Republika Czeska).

Pracę doktorską Pana Magistra Wojciecha Makowskiego oceniam wysoko, zarówno ze względu na oryginalność podjętej tematyki badawczej, jak i ze względu na różnorodność zastosowanych technik i metod badawczych. Zaplanowane doświadczenia przeprowadzono i opisano z dużą starannością, a sposób prowadzenia dyskusji wskazuje na dużą wiedzę teoretyczną i praktyczną, umiejętność interpretacji wyników i ich syntetycznego przedstawienia. Wcześniej wymienione wątpliwości, uwagi i dostrzeżone drobne niezręczności stylistyczne nie umniejszają merytorycznej wartości pracy, która została przygotowana z dużą skrupulatnością. Zwraca też uwagę spory dorobek naukowy doktoranta w zakresie nieobjętym dysertacją oraz jego doświadczenie zdobyte w trakcie zrealizowanych staży i kierowania własnym projektem badawczym.

Podsumowując, praca doktorska pt.: „Fizjologiczne podstawy syntezy wybranych metabolitów wtórnych w elicytowanych i transformowanych kulturach tkankowych roślin *Dionaea muscipula* J. Ellis i ich właściwości antybakteryjne, ma walory nowatorskie i aplikacyjne, została wykonana prawidłowo i jest poprawnie udokumentowana. Jej efektem jest określenie warunków uzyskania zwiększonej produkcji związków fenolowych przez hodowane *in vitro* rośliny *Dionaea muscipula* i powiązanie wyższej zawartości związków fenolowych ze wzrostem aktywności antyoksydacyjnej i antybakteryjnej wyciągów z uzyskanego materiału roślinnego oraz wyselekcjonowanie wysokoproduktywnych klonów teratom pędowych muchotłówki uzyskanych poprzez transformację genetyczną za pomocą *R. rhizogenes* i ocena parametrów fizjologicznych wybranych klonów. Przedstawiona dysertacja spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, demonstruje poziom wiedzy teoretycznej doktoranta oraz umiejętność projektowania i wykonywania eksperymentów



**Instytut Farmakologii  
im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk**

naukowych. Z przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymogi art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie magistra inżyniera Wojciecha Makowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik  
Zakładu Fitochemii  
Instytut Farmakologii im. Jerzego Maja  
Polskiej Akademii Nauk

Dr hab. nauk farm. Anna Stojakowska