

Warszawa, 01. 06. 2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Kingi Marii Pilarskiej pt. „Kultury in vitro roślin z rodzaju *Sarracenia* jako źródło związków biologicznie aktywnych”.

Praca doktorska mgr inż. Kingi Marii Pilarskiej została wykonana pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Wróbel-Kwiatkowskiej, prof. Uczelni (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) oraz dr hab. Anny Kulmy, prof. Uczelni (Uniwersytet Wrocławski), w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

#### Ocena formalna

#### Wartość naukowa i merytoryczna rozprawy

Rośliny mięsożerne, ze względu na specyficzną adaptację do pozyskiwania składników odżywczych, stanowią ciekawą grupę organizmów samożywnych. Biologiczne inwestowanie w pułapki, dzięki którym mogą zdobywać pokarm jest energochłonne, co przekłada się na wolniejszy przyrost biomasy takich roślin. Ich naturalne siedliska są zagrożone działalnością człowieka. Ze względu na ewolucyjne przystosowanie roślin mięsożernych do specyficznego kontaktu ze zwierzętami syntetyzują one szereg atraktantów, których potencjał biologiczny (farmakologiczny) nie został w pełni określony. Ponadto, trawienie zewnątrzkomórkowe wymaga udziału różnych związków o charakterze bakterio- i grzybobójczym. Rośliny mięsożerne występują często w trudno dostępnych rejonach (np. lasy tropikalne, bagna, torfowiska), zatem niektóre gatunki dopiero są odkrywane, a wraz z nimi nowe związki biologicznie aktywne. Poza środowiskiem naturalnym, zapewnienie warunków do uprawy takich roślin (zwłaszcza na większą skalę) jest zadaniem samym w sobie. Obecnie, kiedy coraz więcej drobnoustrojów chorobotwórczych wykazuje

---

Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

Dr hab. Urszula Krasuska, prof.  
SGGW  
Instytut Biologii  
Katedra Fizjologii Roślin

ul. Nowoursynowska 159  
bud. 37, pok. 0/122,  
02-776 Warszawa  
+48 22 593 25 29  
urszula\_krasuska@sggw.edu.pl  
www.sggw.edu.pl



antybiotykoodporność, poszukiwanie skutecznej alternatywy ma szczególne znaczenie ogólnoludzkie. Roślinne kultury *in vitro* są wykorzystywane do pozyskiwania cennych składników (metabolitów wtórnych), których znaczenie farmakologiczne (czy inne zastosowanie) pokrywa spore nakłady finansowe, wynikające ze specyfiki tej techniki. Tego typu kultury roślin mięsożernych są prowadzone również w Polsce (stosunkowo od dawna) i dotyczą różnych przedstawicieli tej grupy organizmów.

Problematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę wiąże się zarówno z propagowaniem roślin mięsożernych jak i charakterystyką związków biologicznie aktywnych, izolowanych z tych roślin. Wyniki, stanowiące istotną część niniejszej rozprawy, opisane i przedyskutowane przez Doktorantkę, mają charakter oryginalny. Praca wykonana w ramach projektu pt. „Bio Tech Nan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego. Przedstawiona do recenzji rozprawa jest opracowaniem naukowym, napisanym w języku polskim w sposób poprawny i zrozumiały, liczy 198 stron. Oceniana dysertacja ma układ typowy dla tego typu pracy, który obejmuje: Wstęp (literaturowy) – 22 strony, Cel pracy (1 strona), Materiały i metody (29 stron), Wyniki (85 stron), Dyskusję (13 stron) i Wnioski końcowe (2 strony). Rozprawa doktorska jest poprzedzona streszczeniem w języku polskim i angielskim, ponadto opatrzona w spis treści, wykaz skrótów, spis rycin, tabel i załączniki. W pracy Doktorantka umieściła 47 rycin, 19 tabel i 19 załączników (w postaci tabel i wykresów) oraz spis cytowanego piśmiennictwa (255 pozycji – zgodnie z zastosowaną w pracy numeracją i 3 pozycje netograficzne).

Z części związanej z przeglądem dostępnej literatury, przedstawionej przez Doktorantkę, można wnioskować, że pani mgr inż. Kinga Maria Pilarska jest dobrze obeznana z wybraną tematyką badawczą. Wstęp literaturowy Autorka podzieliła na podrozdziały, ściśle związane z tematyką niniejszej dysertacji: krótka charakterystyka roślin owadożernych (zwłaszcza pod kątem wytwarzanych przez nie substancji aktywnych biologicznie), w tym roślin z rodzaju kaptownic (*Sarracenia* L.), przedstawienie techniki i zastosowania kultur *in vitro* wraz z krótkim opisem modyfikacji genetycznych roślin, opis w jaki sposób powstają korzenie włośnikowate i jakie są praktyczne możliwości zastosowania kultur tego typu korzeni. W ostatnim podrozdziale Doktorantka krótko przedstawiła dane literaturowe związane z próbami wprowadzania kaptownic do kultur *in vitro* i wskazała na braki w opublikowanych opisach mikropropagacji tych roślin. Dane literaturowe są skromne, a materiał roślinny ma duże możliwości badawcze. Jak sama Doktorantka stwierdziła,

istotną przesłanką w podjęciu przez nią badań było rosnące zapotrzebowanie na substancje pochodzenia roślinnego o potencjale terapeutycznym i chemoprewencyjnym. Zatem, mgr inż. Kinga Maria Pilarska postawiła Sobie za cel pracy doktorskiej wprowadzenie kaptownicy purpurowej (*S. purpurea* L.) do kultur *in vitro* wraz z ukierunkowaniem wzrostu i rozwoju tych roślin na wytwarzanie korzeni włośnikowatych, akumulujących substancje o potencjale farmakologicznym. W ramach realizacji powyższego celu Doktorantka określiła szereg zadań badawczych, które dotyczyły: optymalizacji procesu mikropropagacji kaptownicy purpurowej, oceny składu biochemicznego roślin, których kultura *in vitro* zakończyła się sukcesem po transformacji (z wykorzystaniem bakterii *Rhizobium rhizogenes*), optymalizacji metody ekstrakcji związków bioaktywnych z pędów i korzeni otrzymanych roślin oraz ocenę właściwości antibakteryjnych i cytotoksycznych ekstraktów z kaptownicy purpurowej. W pracy brak opisanych odrębnych, jasno sformułowanych hipotez badawczych. Materiał i metody badawcze dobrane prawidłowo, podobnie jak narzędzia statystyczne. Spektrum wykorzystanych metod obejmuje podstawowe i bardziej skomplikowane analizy, co w tego typu badaniach jest dużą zaletą. Sposób przedstawienia graficznego wyników jest ogólnie prawidłowy, choć nie wszystkie wykresy są czytelne. Doktorantka przeprowadziła krytyczną analizę uzyskanych wyników w części dyskusji niniejszej rozprawy. Wnioski sformułowane jasno. Cytowana literatura dobrana prawidłowo, część dotyczy artykułów opublikowanych w ostatnich 10 latach (co do faktycznej ilości cytowań informację zamieściłam w ocenie poprawności redakcyjnej i uwagach szczegółowych).

#### **Ocena poprawności redakcyjnej i uwagi szczegółowe**

Praca napisana językiem poprawnym, choć z pewnymi błędami edytorskimi (np. zróżnicowanie w sposobie cytowania literatury w tekście), literówkami, czasem nieścisłościami językowymi, które nie umniejszają jakości merytorycznej pracy. Dla przykładu: uważam, że to ludzie z plemienia Garo... a nie „plemię” Garo stosowali rośliny... Niektóre fragmenty pracy powtarzały się co jakiś czas, ale nie było to czynione nagminnie. W spisie cytowanej literatury brakuje niektórych cytowań (np. Ninfali i wsp. 2005, Mostafa i wsp. 2017, Wróbel-Kwiatkowska i wsp. 2022(!)...) lub zdarzają się literówki w nazwisku (str. 48). Spis skrótów bardzo ubogi, brakuje części stosowanych skrótów dalej w tekście.

#### **Uwagi dotyczące Wstępu.**

Mam pytanie, dlaczego Autorka nie stosuje nazwy rośliny mięsożerne, która bardziej odnosi się do



„diety” tej grupy roślin? W literaturze anglojęzycznej jest stosowany powszechnie termin „carnivorous plants”. Proszę o komentarz.

Proszę wyjaśnić co to jest „szerokie spektrum chwytania”? Czy sposób pozyskiwania pokarmu: „chwytanie ofiar” można odnieść do wszystkich grup roślin mięsożernych? Czy kapturnice mogą „chwycić” ofiary (str 16.)?

Co Autorka miała na myśli pisząc „ubogie środowisko”?

Ogólna uwaga: dla zwierząt przyjęło się, że wytwarzają narządy, a rośliny organy.

Strona 10. i 11. Autorka podaje liczbę gatunków roślin mięsożernych odnosząc się do dosyć starego cytowania. Czy ta liczba jest nadal aktualna, czy coś się zmieniło? Poproszę o komentarz.

Str. 11. Dzbaneczniki (Nepenthes) odnosi się do rodzaju, a pułapka określana jest jako dzbanek, dzban czy czasami kielich. Czy kaptur stanowi odrębny typ pułapki?

Dlaczego Doktorantka w pracy nie stosuje nazw zwyczajowych roślin mięsożernych (konsekwentnie, bo czasem są używane), a innych roślin już owszem. W przypadku niektórych roślin brakuje nazw łacińskich.

Str. 12.: Mam pytanie do zdania: „Rośliny z rodzaju Sarracenia...” – całe rośliny czy określone fragmenty? Podobnie w innych częściach pracy (np. „ekstrakty z roślin”). Czy zawsze były wykorzystywane te same fragmenty roślin do analiz? Co Doktorantka miała na myśli pisząc „ziele”? Określenie to pojawiło się w różnych częściach pracy.

Str. 15. W przypadku metabolitów wtórnych, rozumiem, że Doktorantka miała na myśli podstawowe procesy życiowe, czy wszystkie procesy życiowe?

Str. 18. Czy taksyfolina jest syntetyzowana w całej roślinie?

Str. 21.: W swojej pracy Doktorantka używa terminów: kultura i/lub hodowla roślin (m.in. str. 34.). Kultura roślin - powielanie cech roślin, co może wiązać się z przenoszeniem na nowe podłoża i pielęgnacją roślin o tym samym genotypie co roślina „wyjściowa”, a hodowla roślin – uzyskanie nowej odmiany roślin o nowych cechach. Czy wszędzie w pracy można dowolnie stosować termin „hodowla”? Czy pojawienie się „nowych cech fenotypowych” wiąże się z reakcją stresową rośliny na czynnik biotyczny i czy to wiąże się z hodowlą? Proszę o komentarz.

Str. 22.: Bardzo mi się podoba przedstawiona rycina.

Str. 25.: Ryc. 4 – zgodnie z opisem w tekście część nadziemna rośliny z korzeniami włósnikowatymi powinna być nieco zmieniona w stosunku do rośliny wyjściowej.

Str. 26. Czy chodziło o kwas 3-octowy czy o kwas indolilo-3-octwowy? Cytokiny czy cytokininy?

Str. 28.: W jaki sposób kultura korzeni włośnikowatych mogłaby być „bezpieczną platformą”?

#### **Część Materiały i metody:**

Metody opisane ogólnie obszernie i prawidłowo, co uważam za mocną stroną tego rozdziału. Uwagi szczegółowe zamieściłam poniżej. Uwaga ogólna: niektóre nazwy odczynników podawano w języku angielskim np. dla soli sodowej cefotaksymu. Jest to uwaga, która nie ma wpływu na wartość merytoryczną pracy, podobnie jak moja uwaga co do zapisu wielkości liter przy słowie: „chlorofil”. Stosuje się małe litery: *a, b* ... w przypadku różnych rodzajów chlorofilu.

W opisie części metod było podane, gdzie te analizy były wykonywane i przez kogo, a przy części nie ma takiej informacji. Dlaczego? Ponadto w przypadku analiz strukturalnych z zastosowaniem spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni, czy Doktorantka miała okazję również „spróbować” swoich sił przy wykonywaniu doświadczeń? Mam pytanie, czy materiał roślinny był uzyskany z jednej rośliny (str. 60), czy Doktorantka otrzymała więcej „osobników”? Jeśli była to jedna roślina to na jakiej podstawie dokonano wyboru?

W przypadku stosowania linii komórkowych podczas oznaczeń właściwości przeciwnowotworowych ekstraktów roślinnych czy Doktorantka nie miała dostępu do linii komórek „zdrowych” – odpowiedników komórek nowotworowych? Czy rozważany był model doświadczalny obejmujący (poza liniami komórkowymi, które to charakteryzują się licznymi niedoskonałościami i odbiegają od warunków występowania nowotworów *in vivo*) kultury *in ovo* wykorzystujące zarodki ptasie?

Str. 35.: Na jakiej podstawie dobrano składniki podłoża?

Str. 36.: Dlaczego wybrano akurat te bakterie chorobotwórcze, które opisała w pracy Doktorantka?

Str. 41.: w naturalnym środowisku a nie w „naturalnych warunkach”. Nie używałabym słowa „pojemność” w stosunku do „zdolności” antyoksydacyjnej. Pojemność z definicji: 1. «wielkość wnętrza jakiegoś naczynia, zbiornika itp.» 2. «wielkość charakteryzująca zdolność ciała do gromadzenia ładunków elektrycznych».

Str. 43.: Czy nie miało to znaczenia co jest wybierane do transformacji: liść czy młoda roślina (cała)?

Str. 46.: Przy analizie przyrostu biomasy, czy oceniono kinetykę wzrostu różnych części roślin transformowanych? Czy oznaczono tylko suchą masę korzeni czy również liści? Zwłaszcza, że w dalszej części opisu materiałów i metod Doktorantka napisała, że do analizy chlorofilu pobrano 5-10 mg materiału roślinnego (sucha masa czy świeża masa)?

Str. 48.: co do cytowania Debetić i in. w odniesieniu do opisu metody oznaczenia całkowitej

zawartości polifenoli – zastosowano złe cytowanie, chyba, że autorzy zastosowali jakąś autorską weryfikację tej metody.

Str. 50.: Wyrażając wyniki, czy to były mg na gram suchej masy całych roślin czy liści? Jak całych roślin, to czy część podziemna była brana pod uwagę? Czy analiza HPLC była analizą autorską, czy parametry rozdziału były zaczerpnięte z jakiegoś źródła naukowego oraz czy Doktorantka stosowała standardy wewnętrzne do oceny wydajności pomiaru?

Str. 52.: Podobne pytanie do analizy GC-MS jak do HPLC – czy była to analiza autorska?

### Część Wyniki

Bogactwo wykonywanych metod przełożyło się na dużą liczbę uzyskanych wyników. Jest to najbardziej obszerny rozdział. Szczególnie ciekawe wyniki dotyczą właściwości przeciwdrobnoustrojowych, które Doktorantka przedstawiła w postaci tabel. Chciałabym dodać, że rozdział HPLC dotyczący oznaczenia związków fenolowych, badanych jako oddzielne związki, jest analizą czasochłonną. Ryc. 36 i 37. – osobiście bardzo mi się podobają tak zestawione wyniki (choć małe), czy nie można było pokusić się o zestawienie ich na jednej stronie i dlaczego Doktorantka tak „pogrupowała” te aminokwasy?

Uwaga ogólna: w części związanej z opisem wyników znaleźć można elementy dyskusji czy opisu materiału i metod. W ten sposób rozdział ten sprawia wrażenie przeładowanego. Tytuły podrozdziałów tak sformułowane nie oddają ich treści np.: podrozdział 4.1.1.1. Odmienne wartości pH podłoża. Ponadto dlaczego Doktorantka nie zdecydowała się na zastosowanie skrótów aminokwasów w tekście, za to są w tabeli 18.?

Str. 62.: To chyba jest jakiś skrót myślowy: „ Największą wartość właściwości antyoksydacyjnej zaobserwowano u roślin pochodzących z podłoża o pH 6,6.” – proszę Doktorantkę o wyjaśnienie.

Str. 73. Ryc. 12. – jakość zamieszczonych fotografii mogłaby być lepsza, jak ma to miejsce w przypadku ryciny 13.

Str. 75. Brak opisu analizy mikroskopowej w rozdziale materiały i metody.

Str. 76. Zakładam, że przedstawione zdjęcia odnoszą się do typowego rozdziału z kilku odrębnych analiz.

Str. 77. Dlaczego Doktorantka zdecydowała się na taki typ wykresu (liniowy), a nie słupkowy? Podobne pytanie mam co do ryciny 18. i 19. – czy pomiary były wykonywane w tych wszystkich punktach pomiarowych?

Str. 86. Proszę o wyjaśnienie co oznacza, że chlorofil *b* pełni funkcje pigmentu pomocniczego?

Str. 87. Na wykresie (Ryc. 22.) Doktorantka przedstawiła zmiany zawartości chlorofili *a* i *b* oraz ich całkowitą zawartość, z kolei w tekście określiła te barwniki jako: „zawartość barwników fotosyntetycznie czynnych”. Czy wykres obejmuje również barwniki pomocnicze (aktywne fotosyntetycznie) - karotenoidy czy chodziło tylko o chlorofile?

Str. 91. Czy oznaczono więcej rodzajów kwasów tłuszczowych (poza kwasem alfa-linolenowym)? Czy Doktorantka określiła faktycznie „profil” czy całkowitą zawartość kwasów tłuszczowych? I dlaczego nie ma wyników dla korzeni?

Ogólna uwaga: Doktorantka zdecydowała się pokazać na wykresie widma IR badanych roślin, a następnie wyniki przedstawiła w postaci wykresów liniowych i słupkowych. Dlaczego tylko w przypadku tej analizy Autorka w taki sposób zaprezentowała wyniki, a nie w przypadku rozdzielów HPLC i GC (przedstawienie chromatogramów)? Jak dla mnie wykresy słupkowe (dla tej analizy) nie są zbyt czytelne. Czy tylko w taki sposób przedstawia się te wyniki?

Str. 115. Dlaczego żywotność komórek określona testem MTT przekroczyła 100%?

Str. 120. Jak określono proliferację komórek?

Brakuje mi jakiegoś osobnego przedstawienia różnic w składzie chemicznym pomiędzy ekstraktami wodnymi i etanolowymi, np. w postaci tabeli.

### **Część Dyskusja**

Dyskusja jest poprowadzona w sposób zrozumiały. Jednakże kolejność diskutowanych wyników mogłaby być zachowana w stosunku do innych części pracy. Znajdują się tu powtórzenia z części wstępu literaturowego i z części wyników.

Uzyskanie stabilnej kultury wymaga doświadczenia i czasu. Mam pytanie, jak bardzo kosztowne jest otrzymanie roślin z korzeniami włósnikowatymi i prowadzenie ich kultury? Czy zawartość - stężenie plumbaginy w badanych roślinach są istotne z punktu widzenia potencjalnego farmakologicznego wykorzystania (i pozyskiwania na większą skalę tego związku)?

Czy Doktorantka określiła reakcję na stres roślin po transformacji, poza zdolnością antyoksydacyjną? Mam tu bardziej na myśli np. zawartość reaktywnych form tlenu, których zbyt wysokie stężenie mogłoby wpływać na utlenianie pewnych metabolitów i ich toksyczność (cytotoksyczność).

Czy Autorka mogłaby zaproponować jeszcze inną reakcję roślin (poza zmianami epigenetycznymi) i związane z nią zmiany w ogólnej zawartości triterpenów w części pędowej badanych roślin?



Jakie potencjalne działanie allelopatyczne miała na myśli Doktorantka w przypadku swojego materiału doświadczalnego? (Str. 142.)

Uwaga: Chlorofile mają charakter hydrofobowy, ale przede wszystkim określa się je jako barwniki asymilacyjne biorące udział w procesie (a nie procesach) fotosyntezy.

Co Doktorantka miała na myśli pisząc: „przeciwutleniacze posiadają zdolność do pochłaniania reaktywnych form tlenu” oraz „poprawa właściwości przeciwutleniających w roślinach”?

Czy Autorka mogłaby w skrócie przybliżyć w jaki sposób można by stosować ekstrakty uzyskane z transformowanej kaptownicy (z korzeni, części pędowych?) w przypadku zakażeń bakteriami, które zostały wybrane w czasie realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

#### **Wniosek końcowy**

Podsumowując, pozytywnie oceniam przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską mgr inż. Kingi Marii Pilarskiej, jako opracowania naukowego oraz stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Kingi Marii Pilarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa dn. 01. 06. 2023 r.

Urszula Krasuska