

Kraków, 22.06.2023

Dr hab. Marzena Popielarska-Konieczna, prof. UJ  
Zakład Cytologii i Embriologii Roślin  
Instytut Botaniki, Wydział Biologii  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie  
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków  
+48 12 664 60 27  
[m.popielarska-konieczna@uj.edu.pl](mailto:m.popielarska-konieczna@uj.edu.pl)



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr inż. Kingi Pilarskiej**

z tytułuwanej:

**„Kultury *in vitro* roślin z rodzaju *Sarracenia*  
jako źródło związków biologicznie aktywnych”**

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mieści się w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. Praca została wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu, pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Magdaleny Wróbel-Kwiatkowskiej, prof. uczelni oraz drugiej Pani promotor dr hab. Anny Kulmy, prof. UW r.

**Wartość naukowa rozprawy**

Pozyskiwanie związków biologicznie aktywnych (z których większość to metabolity wtórne) z całych roślin, czy też ich części ma istotne znaczenie dla farmacji, kosmetologii oraz produkcji suplementów diety. Zintensyfikowanie syntezy tych substancji w roślinie lub organach na drodze transformacji i kultur tkankowych umożliwia zmniejszenie kosztów uzyskiwania cennych substancji, które wykazują efekt terapeutyczny.

Praca doktorska opisuje potencjał roślin kompozytowych *Sarracenia purpurea* uzyskanych na drodze transformacji po infekcji *Rhizobium rhizogenes*. Jest to nowatorska praca naukowa dostarczająca istotnych danych na temat zwiększenia efektywności syntezy metabolitów wtórnych przez rośliny *S. purpurea*. W pracy podkreślono efekt jaki wywiera ekstrakt uzyskany z roślin kompozytowych *S. purpurea* na chorobotwórcze szczepy bakterii, zdrowe komórki ludzkie i zwierzęce, a także na linie komórek nowotworowych. Część wyników, w tym uzyskanie siedmiu transformowanych linii *S. purpurea*, optymalizacja ekstrakcji związków biologicznie czynnych, ocena zawartości związków polifenolowych, trójterpenowych, a także kwasu betulinowego, została opublikowana w artykule naukowym: Pilarska, Kinga Maria, Manuela Panić, Ivana Radojčić Redovniković,

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

[sekretariat.ib@uj.edu.pl](mailto:sekretariat.ib@uj.edu.pl)

[www.ib.uj.edu.pl](http://www.ib.uj.edu.pl)



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

and Magdalena Wróbel-Kwiatkowska. 2022. "Characterization of Carnivorous Plants *Sarracenia purpurea* L. Transformed with *Agrobacterium rhizogenes*" *Applied Sciences* 12, no. 20: 10289. <https://doi.org/10.3390/app122010289>, gdzie Doktorantka jest pierwszym Autorem i korespondencyjnym.

Podstawą rozprawy są cztery obszerne rozdziały. Pierwszy rozdział to „Wstęp”, który jest wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Opisano w nim aktualny stan wiedzy o roślinach owadożernihych o potencjale leczniczym, wykorzystaniu metod roślinnych kultur tkankowych i modyfikacjach genetycznych w celu zintensyfikowania syntezy substancji biologicznie czynnych. Na stronie 21, pisząc o „wadach kalusa” należy pamiętać, że są nimi nie tylko „brak stabilności w zachowaniu struktury chromosomów”, ale także liczba chromosomów. W podrozdziale 1.2.2. warto byłoby wspomnieć o najnowszym „nabytku” biotechnologii, czyli metodzie CRISPR/Cas9. Na stronie 23 w opisie metody sztucznych nasion podano, że w otocze są zamykane zarodki somatyczne, tymczasem może to być także inny materiał roślinny, np. pędy przybyszowe, czy nawet kalus organogeny. We „Wstępie” brakuje informacji o roślinach kompozytowych, których to definicja pojawia się w „Wynikach”. Rozdział pierwszy zamyka krótkie, ale klarowne uzasadnienie zasadności wyboru materiału badawczego. Następnie został jasno sformułowany cel pracy i konkretne zadania badawcze prowadzące do jego zrealizowania.

Drugi rozdział (w rozprawie błędnie oznaczony jako trzeci) to „Materiały i metody”, w którym Doktorantka szczegółowo przedstawia warsztat badawczy. W mojej ocenie został jednak pominięty istotny etap w uzyskaniu rośliny kompozytowej, do czego wróćę w Uwagach krytycznych.

Kolejny rozdział to „Wyniki”. Pierwszymi etapami pracy badawczej było ustalenie optymalnych warunków kultury *in vitro* dla gatunku *S. purpurea*. Synteza metabolitów wtórnych następuje w wyniku interakcji ze środowiskiem i wpływu czynników biotycznych oraz abiotycznych. Już sam dobór odpowiednich warunków kultury *in vitro* może wpłynąć pozytywnie na intensywność syntezy związków biologicznie aktywnych, natomiast transformacja jeszcze ten efekt potęguje. W kolejnych podrozdziałach Kandydatka prezentuje całość wyników uzyskanych w trakcie swoich kompleksowych badań. Pomimo ogromu uzyskanych danych wyniki są przedstawione w sposób jasny, do czego przyczyniają się liczne wykresy i tabele.

W rozdziale „Dyskusja” Kandydatka obszernie i krytycznie omawia uzyskane wyniki w kontekście danych literaturowych. W końcowej części rozdziału są przedstawione propozycje kontynuacji badań, w których nacisk został położony m.in. na zbadanie cytotoksyczności ekstraktów z roślin kompozytowych *S. purpurea* względem innych zdrowych tkanek ludzkich oraz linii nowotworowych. Kandydatka sugeruje również zaawansowane analizy dotyczące farmakokinetyki i biodostępności (tu błąd literowy na stronie 149, powinno być „oraz” w miejsce „o”), a także

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl





UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

przeprowadzenie testów na antybiotykoopornych szczepach bakterii z wykorzystaniem wspomnianych ekstraktów.

Rozprawę zamyka rozdział „Wnioski końcowe”, który stanowi podsumowanie najważniejszych wyników i wnioski, po których następuje wykaz piśmiennictwa z 255 pozycjami literatury oraz trzema źródłami internetowymi.

#### Wartość merytoryczna rozprawy

W prezentowanej rozprawie Doktorantka przedstawia zoptymalizowaną metodę kultury *in vitro* i transformacji *S. purpurea* oraz ekstrakcji substancji biologicznie aktywnych. Doktorantka określiła również zawartość wybranych substancji w liniach transformowanych i porównała je z wynikami dla typu dzikiego. Zawartość substancji wyekstrahowanych zwłaszcza z korzeni linii transformowanych była nawet kilkukrotnie większa, niż w typie dzikim. Taki wynik może być szansą w pozyskiwaniu na dużą skalę cennych substancji syntetyzowanych przez rośliny tego gatunku.

Cel rozprawy i pytania badawcze są właściwe, biorąc pod uwagę najnowsze dane w zakresie roślin owadożernych, ich transformacji i znaczenia substancji aktywnych. Kandydatka w logiczny sposób nakreśliła planowany cel. Przeprowadzone zadania badawcze są adekwatne do celu pracy i prawidłowo zaplanowane. Stosowane techniki są dobrze dopasowane do celu badań i dokładnie udokumentowane. Wyniki są opisane prawidłowo. W trakcie poszczególnych eksperymentów zostały właściwie zastosowane analizy statystyczne. Kandydatka potrafi krytycznie analizować i prezentować wyniki badań.

#### Poprawność redakcyjna rozprawy

Rozprawa została napisana w języku polskim i jest zorganizowana w sposób typowy dla rozprawy doktorskiej, tzn. zawiera rozdziały zatytułowane: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis literatury. Jakość prezentacji, styl i edycja tekstu rozprawy Kandydatki jest bardzo dobra. Ryciny i tabele są adekwatne do treści każdego rozdziału, dobrej jakości, przejrzyste i zawierają dużo informacji. Wyjątkiem są niestety niskiej jakości mikrofotografie zaprezentowane na Ryc. 12 oraz 14, dodatkowo w fotografiach na Ryc. 12, Ryc. 13 oraz na Ryc.14B i 14D brak skali. Na Rycinach 40 – 43 brak oznaczeń statystycznych nad niektórymi słupkami na wykresach.

#### Uwagi krytyczne

Podczas lektury pracy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań lub wątpliwości, do których chciałabym, aby Kandydatka ustosunkowała się w czasie publicznej obrony.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl



UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

- 1) Zastanawia mnie wybór tytułu rozprawy – dlaczego „Kultury *in vitro* roślin z rodzaju *Sarracenia* (...)” skoro przedmiotem badań jest konkretny gatunek, *Sarracenia purpurea* ?
- 2) Proces od założenia kultury *in vitro* do uzyskania roślin kompozytowych jest przedstawiony nieprecyzyjnie. W „Metodach” podrozdział 3.2.1. zatytułowany „Zakładanie aseptycznych kultur roślin z rodzaju *Sarracenia*” dotyczy konkretnie eksplantatów z fragmentów blaszek liściowych, a nie całych roślin. Natomiast kolejny rozdział 3.2.2. traktuje już o „Optymalizacji warunków wzrostu w warunkach *in vitro*”, gdzie Doktorantka wspomina o „tempie wzrostu roślin”. Następnie omawiane są dwie procedury infekcji, a w „Wynikach” podane są informacje: i) o uzyskaniu pozytywnej transformacji (potwierdzonej przez obecność genu *rolB*), ii) morfologicznych różnicach między korzeniami formy dzikiej, a korzeniami włośnikowatymi linii transformowanych oraz iii) o uzyskaniu roślin kompozytowych. W kolejnych częściach rozprawy Doktorantka używa już terminu „roślina kompozytowa” opisując materiał roślinny, z którego są ekstrahowane substancje czynne. Nie jest jasne, w jakich warunkach kultury doszło do regeneracji rośliny kompozytowej, która zapewne obejmowała regenerację pędu. W metodyce (str. 35) podany jest tylko skład medium do indukcji kalusa z eksplantatów po transformacji. Natomiast dopiero w rozdziale „Wyniki” wspomniano o pożywce SIM (nie podano jej składu), która posłużyła do mikropropagacji już uzyskanych roślin kompozytowych.
- 3) Czy Doktorantka uważa, że kultura samych korzeni włośnikowatych *S. purpurea* będzie równie (a może bardziej?) efektywna w produkcji metabolitów wtórnych, niż kultura rośliny kompozytowej? Czy są znane przykłady analiz zawartości substancji czynnych w korzeniach roślin kompozytowych *versus* kulturach tylko korzeni włośnikowatych u innych gatunków?
- 4) Jakimi danymi sugerowała się Doktorantka wybierając stopień rozcieńczenia ekstraktów etanolowych i wodnych podczas doświadczeń z liniami komórkowymi? Czy byłoby zasadne użycie mniejszych rozcieńczeń niż 20-krotne?

Uwagi i pytania zawarte w recenzji nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Rozprawa doktorska obejmuje bardzo szeroki zakres badań w pełni oryginalnych i o potencjale aplikacyjnym.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl





UNIwersytet  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

### Ocena końcowa

W mojej opinii rozprawa Pani mgr inż. Kingi Pilarskiej stanowi ważny wkład naukowy w badania nad roślinami transformowanymi syntetyzującymi substancje biologicznie czynne. Należy zaznaczyć, że część wyników badań Kandydatki została opublikowana w czasopiśmie naukowym z listy JCR.

Przedstawione badania są obszerne, a zastosowane liczne techniki i uzyskane wyniki są wysokiej jakości. Sposób przygotowania pracy oraz prezentacja i interpretacja wyników świadczą o znajomości przez Doktorantkę dziedziny nauki, której dotyczy praca. Za najważniejsze osiągnięcia pracy uważam:

- Uzyskanie transformowanych linii *S. purpurea*.
- Opracowanie protokołu wydajnej ekstrakcji etanolowej i wodnej związków bioaktywnych.
- Analizę profilu roślin kompozytowych *S. purpurea* na różnych poziomach (m.in. zawartość chlorofilu a i b, skład ścian komórkowych, zawartość aminokwasów, potencjał antyoksydacyjny) w odniesieniu do typu dzikiego.
- Potwierdzenie zwiększonej (w porównaniu z typem dzikim) zawartości polifenoli i triterpenów w ekstraktach z korzeni włóknikowatych roślin kompozytowych *S. purpurea*.
- Wykazanie, że (w porównaniu z typem dzikim) ekstrakty ze zmodyfikowanych roślin *S. purpurea* mają bardziej skuteczne działanie przeciwdrobnoustrojowe na chorobotwórcze szczepy wybranych bakterii, oraz cytotoksyczne na wybrane linie komórek nowotworowych, natomiast nie są cytotoksyczne dla wybranych zdrowych komórek ludzkich i zwierzęcych.

Wydział Biologii

Instytut Botaniki

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do oceny *rozprawa doktorska spełnia warunki* określone w art. 187 ustawy 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr inż. Kingi Pilarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką jakość pracy oraz jej potencjał badawczy i aplikacyjny, wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kingi Pilarskiej.

*M. Popielawski - Cien*

ul. Gronostajowa 3

30-387 Kraków

tel.: 12 664 67 95

sekretariat.ib@uj.edu.pl

www.ib.uj.edu.pl