Poznań 26 kwietnia 2021 r.

Prof. UPP dr hab. Dorota Narożna
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Biochemii i Biotechnologii
ul. Dojazd 11
60-632 Poznań

Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Witaszak

pt.: „Zmiany metabolizmu pierwotnego i wtórnego *Fusarium proliferatum* pod wpływem roślinnych związków bioaktywnych"

Recenzja została opracowana na zlecenie Dyrektora Instytutu Genetyki Roślin w Poznaniu Pana prof. dr hab. Pawła Krajewskiego z dnia 5 marca 2021 r. Przedstawiona praca została wykonana w Instytucie Genetyki Roślin PAN Poznań, pod kierunkiem prof. dr hab. Łukasza Stępnia. Promotorem pomocniczym była dr inż. Justyna Lalak-Kończugowska.

Ocena problematyki badawczej

Gatunki z rodzaju Fusarium występują w różnych szerokościach geograficznych. Patogeniczne dla roślin gatunki z tego rodzaju wywołują szereg chorób, które są fuzariozami danego gatunku. Fuzariozy są ważnymi i groźnymi ekonomicznie chorobami roślin na świecie, stanowią rosnące zagrożenie wynikające nie tylko ze strat plonów ale także z obniżenia jakości plonów przez skażenie ich metabolitami wtórnymi, szkodliwymi dla ludzi i zwierząt, mają działanie rakotwórcze, cytotoksyczne, embriotoksyczne, mutageniczne.

Dodatkowo zmiany klimatyczne, których skutkiem jest występowanie nowych albo rozprzestrzenianie się już istniejących patogenów roślin stawia ludzkość przed nowymi wyzwaniami. Jednym z nich jest rosnące zagrożenie spowodowane zwiększaniem się populacji patogennych grzybów w tym *Fusarium proliferatum*, który bytuje na różnych roślinach-żywicielskich, m.in. szparagu, kukurydzy, czosnku i ananasie, ale ostatnio atakuje także inne gatunki roślin. Patogen ten produkuje szereg szkodliwych dla zdrowia mykotoksyn takich jak: fumonizyna B1, moniliformina, bowerycyna, czy fuzaproliferyna. Brak skutecznych środków ochrony roślin przed tym patogenem sprawia, iż problem ten narasta.

Biorąc pod uwagę wyżej przedstawione problemy uważam, ze temat pracy doktorskiej podjętej przez mgr Natalię Witaszak jest niezwykle ważny nie tylko dla weryfikacji wiedzy ale także może mieć znaczenie praktyczne w zwalczaniu roślinnego patogena grzybowego jakim jest *Fusarium proliferatum*

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 161 stron. Zawiera 31 tabel (22 zamieszczone w Załącznikach), 37 rycin (jedna zamieszczona w Załącznikach) oraz cytowania 230 pozycji literaturowych z tego 226 anglojęzycznych. Pani Magister w pracy doktorskiej cytuje najnowszą literaturę , spośród wszystkich 167 pozycji stanowią publikacje pochodzące z ostatniej dekady. Praca doktorska składa się ze streszczeń przedstawionych w językach: polskim i angielskim oraz 8 rozdziałów uszeregowanych w sposób logiczny i odpowiadający treści pracy. Rozdziały zamieszczono w następującej kolejności: Wstęp; Przegląd literatury; Materiały i metody; Wyniki badań; Dyskusję wyników; Podsumowanie; Wnioski i Literaturę. Autorka zawarła także Załączniki, które obejmują Suplement zawierający szczegółowe wyniki analiz, składy pożywek i buforów oraz odczynników, spis rycin i tabel.

Ocena merytoryczna rozprawy

We wstępie Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy w oparciu o dostępną literaturę naukową, w pierwszej kolejności charakteryzuje *Fusarium proliferatum*, opisuje różnorodność mykotoksyn (fumonizyny i pozostałe mykotoksyny), i hormonów roślinnych produkowanych przez tego patogennego grzyba. Autorka opisuje współzależność metabolizmu pierwotnego i wtórnego, białka uczestniczące w procesie patogenezy i te odpowiedzialne za wirulencję patogenu oraz interakcje roślina-patogen, charakteryzuje roślinne związki bioaktywne i interakcje Fusarium-roślina w roślinach modelowych

Rozdziały te stanowią wnikliwy opis wynikający z analizy licznych opracowań naukowych w sposób kompleksowy i dogłębny. Wstęp ten jest podstawą do właściwego doboru materiału i metod analitycznych opisanych w kolejnych rozdziałach oraz w oparciu o który dokonano dyskusji uzyskanych wyników. Jest to cenne zestawienie wiedzy stanowiące podłoże, w oparciu o które sformułowano cele badań.

Rozdział Cel pracy zawiera sformułowany główny cel badań i cele cząstkowe oraz wynikające z nich zadania badawcze. Sformułowanie celu głównego jest nieco niefortunne. Celem pracy nie może być analiza zmian metabolizmu pierwotnego i wtórnego *Fusarium proliferatum* pod wpływem roślinnych związków bioaktywnych. Wynika bowiem z niego, że badania podjęto aby dokonać analizy, a nie po to aby uzyskać nową wiedzę. Analiza jest tylko sposobem uzyskania wiedzy o badanych procesach czy zjawiskach.

Rozdział Materiały i metody ma typowy układ dla rozpraw doktorskich. Rozdział ten opisuje materiały i metody w sposób umożliwiający wysoko ocenić kompetencje Doktorantki zarówno w prawidłowym doborze stosowanych metod jak i ich zastosowaniu. Należy podkreślić, że zrealizowanie celu pracy było możliwe wyłącznie dzięki opanowaniu przez Nią bardzo szerokiego wachlarza technik badawczych: od prac z materiałem biologicznym, poprzez prace z zakresu chromatografii i biologii molekularnej obejmujące analizy kwasów nukleinowych. W kolejnych podrozdziałach Pani Magister szczegółowo opisała stosowane metody badawcze, które dodatkowo przedstawiła na schematach w postaci rycin. Metody te są dobrane właściwie co umożliwiło przeprowadzenie zaplanowanych badań.

W rozdziale Wyniki Doktorantka syntetycznie opisała interesujące wyniki badań które, przedstawiła w czytelnych i dobrze opracowanych rycinach i tabelach. Rozdział Wyniki został podzielony na podrozdziały odpowiadające celom badawczym. Autorka zaprezentowała wyniki trzech niezależnych eksperymentów, dotyczących wpływu ekstraktów roślinnych, różnych frakcji pochodzących z tych ekstraktów i wybranych metabolitów tych roślin na *F. proliferatum*. Określono wpływ ekstraktów roślinnych, różnych frakcji pochodzących z tych ekstraktów na zmiany biomasy *F. proliferatum*, na ekspresję wybranych genów metabolizmu podstawowego i wtórnego (geny FUM), na biosyntezę fumonizyn. Scharakteryzowano ekstrakty roślinne i ich frakcje przez oznaczenie zawartości fenoli i pojemności antyoksydacyjnej. Określono skład ekstraktów z roślin gospodarzy oraz porównano profile metabolomiczne poszczególnych frakcji. Porównano wpływ wybranych metabolitów roślinnych na wzrost i metabolizm *F. proliferatum*.
Kolejny rozdział pt. „Dyskusja" jest obszerny ale właściwie zredagowany.
Doktorantka wykazała w nim dobrą znajomość omawianych w pracy problemów i umiejętność porównania ich z badaniami innych autorów. Pozycje piśmiennictwa są trafnie dobrane i cytowane w powiązaniu z uzyskanymi wynikami badań własnych.

Autorka zestawia podsumowanie analiz z wszystkich zadań badawczych tworząc opracowanie charakteryzujące wpływ ekstraktów roślinnych, różnych frakcji pochodzących z tych ekstraktów i wybranych metabolitów tych roślin na metabolizm *F. proliferatum*. Wyciągnięte z badań wnioski zostały zestawione w rozdziale 8. W podsumowaniu Doktorantka wykazała, że roślinne ekstrakty, ich frakcje oraz poszczególne roślinne związki bioaktywne mają zróżnicowany wpływ na metabolizm pierwotny i wtórny *Fusarium proliferatum*.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Autorka zamieściła w rozprawie 8 syntetycznie sformułowanych wniosków. Wnioski są krótkie, logiczne i rzeczowe

Dysertację zamyka rozdział Literatura, która świadczy o dobrej znajomości piśmiennictwa i prawidłowym jej dobraniu do tematyki i celów rozprawy.

Uwagi:

Z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć o niedociągnięciach, których nie ustrzegła się Autorka przesłanej do recenzji rozprawy doktorskiej. Moje uwagi dotyczą pracy z kwasami nukleinowymi i redakcji:

1. Uwagi dotyczące pracy z kwasami nukleinowymi

- Pomiary stężenia całkowitego RNA użytego do odwrotnej transkrypcji przeliczano z pomiarów spektrofotometrycznych (mikrospektrofotometr Nano Drop), czy wykonano też dokładniejsze fluorymetryczne pomiary stężeń (np. fluorymetr Qubit, który wykorzystuje barwniki fluorescencyjne w celu określenia stężenie kwasów nukleinowych lub białek w próbce).

Przed reakcją odwrotnej transkrypcji powinna być wykonana również analiza jakościowa wyizolowanego RNA uwzględniająca udział poszczególnych RNA w próbach (taką możliwość daje aparat TapeStation, który pozwala na czułą analizę ilościową i jakościową roztworów DNA i RNA), a także powinna być sprawdzona obecność genomowego DNA w badanych RNA. Autorka w swojej pracy wspomina tylko o wykonanej elektroforezie RNA w 1% żelu agarozowym. Czy jakieś inne analizy RNA przed reakcją odwrotnej transkrypcji były przeprowadzone? Autorka w swojej pracy o nich nie wspomina.

2. Uwagi redakcyjne

- W podrozdziale 4.2.5.1. Ekstrakcja genomowego DNA Autorka opisuje użytą metodę izolacji, brak jednak informacji z jakich szczepów *Fusarium proliferatum* izolowano genomowe DNA

- W podrozdziale 4.2.5.2. Reakcja PCR brak informacji o wielkości amplifikowanego fragmentu PCR, użytych starterach i matrycach. Z Tabeli 2 wynika, że reakcja PCR w gradiencie temperatury została wykonana w celu zoptymalizowania warunków reakcji PCR.

- W podrozdziale 4.2.5.3. Oczyszczanie i znakowanie produktu PCR autorka pisze „Z uzyskanych fragmentów DNA usunięto nadmiar starterów……", natomiast dalej „Oczyszczony produkt PCR poddano znakowaniu fluorochromami…", niejasne jest więc ile i z jakich matryc produkty PCR zostały oczyszczone. W tym samych podrozdziale Autorka pisze o sekwencjonowaniu i tu także brak informacji o sekwencjonowanych fragmentach. Ponadto Autorka dokonała porównania uzyskanych sekwencji, nie pokazała jednak wyników tego porównania ani w rozdziale Wyniki ani w Aneksie

- W podrozdziale 4.2.6. Testowanie zaprojektowanych starterów wraz z optymalizacją warunków reakcji qPCR, Autorka wykluczyła obecność niespecyficznych produktów PCR przez wyznaczenie krzywej topnienia, obraz krzywych topnienia powinien być zamieszczony przynajmniej w Aneksie.
- W Tabeli 4 Autorka powinna umieścić dodatkową kolumnę z zamieszczonymi wielkościami amplikonów dla poszczególnych par starterów genów metabolizmu podstawowego, genów metabolizmu wtórnego i genów referencyjnych.
- Autorka nie ustrzegła się określeń pochodzących z żargonu laboratoryjnego:
Np. Fragmenty namnażane, powinno być raczej fragmenty amplifikowane albo powielane
- W opisie pod Ryc. 14. Całkowita zawartość fenoli we frakcjach uzyskanych z roślin-gospodarzy: szparaga (A) powinno być AF, kukurydzy (M) powinno być MF, czosnku (G) powinno być GF oraz ananasa (P) powinno być PF w przeliczeniu na ekwiwalent kwasu galusowego (μg/ml).
- Niektóre ryciny są mało czytelne np. Ryc. 18. Analiza hierarchiczna dla wyników metabolomicznych otrzymanych dla frakcji ekstraktów ze szparaga (A) oraz kukurydzy (B); górna i dolna część ryciny jest nieczytelna.
- tytuły tabel, wykresów oraz rycin prezentowanych w rozprawie nie powinny kończyć się kropką

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca jest interesująca. Założone cele badawcze przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały rozwiązane w wyniku przeprowadzonych badań. Osiągnięcia badawcze zostały porównane i przedyskutowane z danymi z literatury. Uwagi, które przedstawiłam w recenzji i nie umniejszają wartości merytorycznej pracy i jej wartości aplikacyjnej w zwalczaniu *F. proliferatum*. Uważam, że oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymogi formalne, zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki" (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.), stawiane rozprawom doktorskim

Stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Natalii Witaszak do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Danuta Nawara