



INSTYTUT GENETYKI ROŚLIN POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: centr. 61 6550200, sekret. 61 6550255 Fax: 61 6550301 E-mail: office@igr.poznan.pl
www.igr.poznan.pl NIP: 7811621455 REGON: 000326204

prof. dr hab. Piotr Kachlicki
Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin

Poznań, 21 stycznia 2020 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Barbary Moniuszko-Szajwaj
pt. „Saponiny z korzenia mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.) – budowa chemiczna,
oznaczanie ilościowe i aktywność biologiczna”

1. Znaczenie podjętych badań

Termin „metabolizm wtórny” roślin powstał w XIX wieku, kiedy to badaczom wydawało się, że związki chemiczne wytwarzane w jego wyniku nie pełnią istotnych funkcji biologicznych i są one jakimiś produktami ubocznymi metabolizmu czy też efektem ewolucji biochemicznej. Obecnie, gdy wiadomo, że 15 do nawet 25% genomu różnych roślin jest odpowiedzialne za biosyntezę tych związków i regulację tego procesu oraz gdy określono funkcje pełnione przez rozmaite metabolity wtórne, znacznie bardziej docenia się ich rolę. Substancje barwne, aromatyczne i smakowe z jednej strony wabią insekty zapylające z drugiej strony zwierzęta żywiące się owocami i przenoszące nasiona umożliwiając rozmnażanie roślin i ich ekspansję. Różnorodne związki chemiczne chronią rośliny przed stresami środowiskowymi lub też na skutek swych właściwości toksycznych bronią je przed patogenami i roślinożercami. Niezależnie od funkcji biologicznej pełnionej przez metabolity wtórne dla wytwarzającej je rośliny związki te mają istotne znaczenie dla ich użytkowania. Właściwości smakowe, żywieniowe, lecznicze i wielorakie inne cechy użytkowe roślin zależą właśnie od tych ich komponentów.

Wśród metabolitów wtórnych jedną z najistotniejszych i najbardziej licznych grup strukturalnych stanowią saponiny, tworzące grupę kilkudziesięciu tysięcy związków występujących w taksonomicznie różnorodnych roślinach należących do przynajmniej stu różnych rodzin. Do niedawna nie uświadamiano sobie jak liczne i zróżnicowane strukturalnie związki mogą występować w tkankach jednej rośliny, przy czym ich zestawy w różnych częściach tej samej rośliny mogą być całkowicie odmienne. Oceniana rozprawa doktorska bardzo dobrze wpisuje się w nurt prac badawczych nad charakterystyką struktur i właściwości saponin prowadzonych w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa od dziesięcioleci, a należy nadmienić, że ośrodek ten jest pod tym względem uznanym laboratorium w skali światowej. Poznanie właściwości saponin i uświadomienie możliwości różnorodnego wykorzystania tych produktów naturalnych jako środków ochrony roślin poprzez różne możliwe zastosowania farmaceutyczne po produkcję chałwy i innych produktów spożywczych może przyczynić się do popularyzacji upraw roślin nie znajdujących się aktualnie w polu zainteresowań współczesnego rolnictwa. Zastąpienie chemicznych środków ochrony roślin przez substancje pochodzenia naturalnego jest jednym z istotnych

trendów współczesnej dbałości o środowisko naturalne i dlatego należy doceniać wszelkie prace zmierzające w tym kierunku.

Mając na uwadze powyższe przesłanki należy stwierdzić, że w obecnej erze wyzwań ekologicznych adresowanych do rolnictwa niezbędne jest opracowywanie metod analizy chemicznej mających na celu dogłębną ocenę właściwości plonu roślin uprawnych. Taką rolę pełni oceniana rozprawa doktorska.

2. Ocena pracy

Rozprawa obejmuje 161 stron i posiada układ typowy dla prac doktorskich. Zawiera ona 21 rysunków i 13 tabel.

Wykaz skrótów zamieszczony na ponad dwóch stronach obejmuje skróty nazw reagentów i technik stosowanych w pracach badawczych, nazw cukrowych podstawników saponin i innych pojęć używanych w pracy.

Wstęp stanowiący bardzo obszerne wprowadzenie literaturowe na 63 stronach bardzo szczegółowo zaznajamia czytelnika z charakterystyką obiektu badań Autorki, jakim są saponiny, w tym zwłaszcza wytwarzane przez rośliny z rodziny goździkowatych. Opracowanie to wymagało od Autorki krytycznego zapoznania się z bardzo licznymi publikacjami naukowymi i artykułami przeglądowymi. Bardzo skrupulatnie i wnikliwie został omówiony szereg zagadnień związanych z opisem struktur, biosyntezy i właściwości badanych związków. Jedynym drobnym zastrzeżeniem związanym z omówieniem szlaku biosyntezy saponin jest brak trzech wiązań podwójnych w strukturze 2,3-oksydoskwalenu (Rys. 3 i 4). Natomiast niezaprzeczalną zaletą wprowadzenia literaturowego jest przedstawienie obecnego stanu wiedzy o właściwościach biologicznych saponin, ich wpływie na inne organizmy w tym zwierzęta roślinożerne, na chorobotwórcze wirusy, bakterie oraz grzyby czy też allelopatyczne oddziaływanie na inne rośliny.

W rozdziale 1.6 Autorka omawia występowanie saponin w roślinach ze szczególnym uwzględnieniem kilku rodzin roślin uprawnych. Ze względu na taksonomiczną przynależność obiektu badań – mydlnicy lekarskiej (*Saponaria officinalis* L.) – do rodziny goździkowatych tej rodzinie poświęciła Ona szczególną uwagę. Duże uznanie budzi opracowanie Tabeli 1 będącej szczegółowym i pracochłonnym zestawieniem danych literaturowych dotyczących struktur związków wytwarzanych przez rośliny ponad 30 gatunków plemienia Caryophyllae. W kontekście staranności z jaką przygotowano tę tabelę pewnym zaskoczeniem jest fakt pominięcia pracy Yuping Lu, Dang Van, Leah Deibert, Greg Bishop, John Balsevich (2015) Antiproliferative quillaic acid and gypsogenin saponins from *Saponaria officinalis* L. roots. *Phytochemistry* **113**: 108-120. Autorzy tej publikacji przeprowadzili badania podobnymi metodami do opisywanych w recenzowanej rozprawie i znaleźli w kanadyjskim materiale roślinnym kilka nowych saponin.

Rozdział **Cel pracy** poprawnie i precyzyjnie przedstawia główne zamierzenia i przewidywane efekty planowanych doświadczeń. Cel wykonywanych prac badawczych podzielono na pięć podpunktów i należy stwierdzić, że wszystkie one zostały zrealizowane

Część doświadczalna została opisana w rozdziale **Materiał i metody** w sposób umożliwiający wysoko ocenić kompetencje Doktorantki zarówno w prawidłowym doborze stosowanych metod jak i sprawności w ich zastosowaniu. Metody doświadczalne zostały poprawnie i szczegółowo opisane, a opisy te nie pozostawiają wątpliwości o ich umiejętności

zastosowaniu. Wielkie uznanie budzi zwłaszcza zestaw biegle stosowanych metod chemicznej analizy instrumentalnej (preparatywne i analityczne metody chromatograficzne, różnorodne techniki jądrowego rezonansu magnetycznego, nisko- i wysokorozdzielcze metody spektrometrii mas). Trzeba stwierdzić, że biegłość wykorzystania tych metod byłaby wysoko oceniona także u kandydata do uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały opisane wraz z ich **Dyskusją** w rozdziale 4. ocenianej pracy i zostały podzielone na siedem podrozdziałów odpowiadającym różnym obszarom przeprowadzonych badań.

Znaczącym sukcesem zakończyły się prace nad oczyszczaniem poszczególnych związków. Półpreparatywne rozdziały HPLC są najlepszym z możliwych do zastosowania w tym celu narzędzi i sprawne wykorzystanie tej metody umożliwiło otrzymanie 19 związków w stanie czystym. Do pełnej oceny tego osiągnięcia brakuje tylko informacji dotyczącej ilości uzyskanych związków, zwłaszcza, że wielkość próbki użytej w eksperymentach NMR bardzo rzutuje na jakość wykonywanych widm.

Analiza strukturalna wyizolowanych saponin była najtrudniejszym zadaniem wśród prac doświadczalnych wykonanych przez Autorkę. Z pełnym uznaniem należy ocenić zakres zastosowanych metod NMR i interpretacji wyników tych analiz. Widma protonowe, węglowe i różnorodne widma 2D związków, w których strukturach występuje nawet 9 monosacharydów połączonych różnorodnymi wiązaniami glikozydowymi zawierają dziesiątki sygnałów w bardzo niewielkich zakresach przesunięć chemicznych. Właściwa interpretacja tych wyników, wyszukiwanie korelacji między sygnałami i określanie na tej podstawie przestrzennego usytuowania poszczególnych atomów i podstawników jest trudne, lecz Autorka znakomicie wywiązała się z tego zadania. Zidentyfikowanie i pełna analiza strukturalna ośmiu nowych związków jest wymiernym sukcesem tej części pracy.

Kolejnym zadaniem z zakresu analityki chemicznej, którego podjęła się Doktorantka było oznaczanie ilościowej zawartości saponin w materiale roślinnym. Saponiny stanowią grupę związków, dla której szczególnie trudno jest opracować protokół analityczny. Związki te w większości nie zawierają w swojej strukturze chromoforów umożliwiających ich detekcję w powszechnie stosowanych detektorach UV chromatografów cieczowych. Dotychczasowe metody analityczne stosowały pomiar absorbancji przy długości fali 207 nm, co jednak nie jest szczególnie dogodne ze względów technicznych. Dlatego zastosowanie metody HPLC-MS w tym celu jest bardzo uzasadnione. Mam jednak pewne zastrzeżenie odnośnie wykorzystania tej metody przez Autorkę. Jak zapisano w rozprawie (str. 79 i 111) krzywą kalibracyjną do pomiarów ilościowych wykonano dla saponariozydu I tworzącego jon molekularny o m/z 1281. Jak wiadomo, pole powierzchni wierzchołka chromatograficznego w analizach HPLC-MS odzwierciedla liczbę jonów obecnych w tym wierzchołku. Dlatego też dla każdego związku wynik oznaczenia ilościowego wyliczonego według tak wykonanej krzywej kalibracyjnej należy skorygować uwzględniając stosunek masy do ładunku (m/z) odpowiedniego jonu. I tak na przykład dla dominującego ilościowo związku 6 o m/z 1861 ten współczynnik korekcyjny stanowiłby $1861/1281 = 1,45$

Kolejnym zadaniem, którego podjęła się Autorka było porównanie zawartości i profili saponin w korzeniach roślin mydlnicy z różnych lokalizacji. W wyniku tych analiz doszła Ona do wniosku, że zarówno jakościowa jak i ilościowa zawartość poszczególnych związków jest bardzo zróżnicowana i zależy od wieku roślin, ale także od trudnych do zdefiniowania czynników środowiskowych. Nie jest również wykluczona istotna zmienność genetyczna w

obrębie tego gatunku odzwierciedlająca odmienność osobników zbieranych z różnych lokalizacji. Jak Autorka słusznie wskazuje dyskutując uzyskane wyniki (str. 118), nie jest to jednak zjawisko łatwe do oszacowania zwłaszcza w przypadku tradycyjnych roślin leczniczych, a dotyczy ono różnych kategorii metabolitów wtórnych.

W trzech kolejnych rozdziałach przedstawione zostały wyniki badań różnych aktywności biologicznych (właściwości allelopatyczne, aktywność przeciwgrzybowa i właściwości hemolityczne) frakcji saponin z korzeni mydlnicy. Rezultaty przeprowadzonych doświadczeń były ogólnie rzecz biorąc zbliżone do uzyskiwanych wcześniej przez różnych autorów dla związków pochodzących z różnych gatunków roślin. Badana frakcja saponin wykazywała działanie allelopatyczne wobec wybranych roślin testowych, przy czym reakcje rzeżuchy (*Lepidium sativum*) takie jak zahamowanie wzrostu korzeni oraz wzrostu pędów w najwyższym stopniu uzależnione były od stężenia użytych związków. Z drugiej strony, jakkolwiek zaobserwowano pewną aktywność przeciwgrzybową saponin, była ona jednak stosunkowo niewielka, zwłaszcza w stosunku do *Fusarium culmorum*. Z kolei ich aktywność hemolityczna była nieco wyższa od uzyskanej z użyciem komercyjnego preparatu firmy Merck.

Recenzowana rozprawa zakończona jest rozdziałem **Podsumowanie i wnioski**. Doktorantka w 12 punktach podsumowuje uzyskane wyniki.

Streszczenie (w języku polskim i angielskim) w zwięzły i precyzyjny sposób omawia przedmiot i najważniejsze wyniki pracy.

Bibliografia cytowana w rozprawie doktorskiej obejmuje 261 pozycji. Na uwagę zasługuje fakt cytowania także artykułów opublikowanych kilkadziesiąt lat temu przynoszących istotne informacje dotyczące profili, struktur i właściwości saponin z bardzo różnorodnych gatunków roślin.

Kończąc recenzję rozprawy doktorskiej chciałbym podkreślić staranność wykonania prac eksperymentalnych, zróżnicowaną metodykę badawczą zastosowaną przez Doktorantkę oraz należytą ostrożność w formułowaniu wniosków. Jednocześnie stwierdzam, że wszystkie moje krytyczne uwagi zawarte w recenzji mają raczej charakter techniczny, mogą posłużyć Autorce podczas przygotowywania publikacji uzyskanych wyników i nie mają one wpływu na pozytywną ocenę przedstawionej rozprawy.

3. Wniosek końcowy

Po zapoznaniu się z przedstawioną mi rozprawą doktorską stwierdzam, że jest ona interesującym doniesieniem dotyczącym ważnego zagadnienia analizy strukturalnej i oznaczania ilościowego saponin oraz efektywności ich wykorzystania w różnych zastosowaniach praktycznych. Jest ona także ważnym przyczynkiem wskazującym możliwość upraw alternatywnych roślin do zastosowań nieżywnościowych. Wszystkie cele wykonanej pracy zostały pomyślnie zrealizowane. Ponieważ moim zdaniem 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 późn. zm.) zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa PIB w Puławach o dopuszczenie pani mgr Barbary Moniuszko-Szajwaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.