

Prof. dr hab. Ewa U. Kurczyńska
Wydział Nauk Przyrodniczych,
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Śląski
ul. Jagiellońska 28
40-032 Katowice

Katowice, 04.12. 2020

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Izabeli Sańko-Sawczenko

„Wybrane mechanizmy molekularne zaangażowane w podtrzymywanie aktywności
merystatycznej brodawek korzeniowych u gatunków modelowych z rodziny
Fabaceae”

Praca doktorska mgr inż. Izabeli Sańko-Sawczenko została wykonana pod kierunkiem dr hab. inż. Barbary Łotockiej, prof. SGGW, oraz promotora pomocniczego dr inż. Weroniki Czarnockiej, w Katedrze Botaniki, Instytutu Biologii, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Wybór tematyki badawczej

Znaczenie procesu redukcji azotu do form dostępnych dla roślin, co dzieje się za pośrednictwem między innymi bakterii, jest fundamentalne. Brak zredukowanych związków azotowych w glebie jest głównym czynnikiem ograniczającym wzrost roślin, w tym roślin uprawnych. Symbioza roślin bobowatych z bakteriami, które mogą redukować azot cząsteczkowy jest powszechnie znana. Udowodniono, że takie rośliny doskonale radzą sobie na glebach ubogich w azot. Z tego powodu, wszystkie informacje mogące przybliżyć nas do poznania mechanizmów regulujących „współpracę” roślin z bakteriami wiążącymi azot daje nadzieję, na opracowanie strategii pozwalających na zmniejszenie nawożenia azotowego, na rzecz wykorzystania roślin wiążących i redukujących azot cząsteczkowy. W ten nurt badawczy doskonale wpisuje się przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani Sańko-Sawczenko. Znaczenie badań na poziomie molekularnym, które zostały zaprezentowane w tej rozprawie, jest istotne tak z punktu widzenia badań podstawowych, jak i późniejszego ich wykorzystania w praktyce.

Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenia, omówienia wyników uzyskanych w poszczególnych pracach stanowiących rozprawę

doktorską oraz podsumowania (zajmujących 28 stron dysertacji). Poza tym zamieszczono wszystkie prace składające się na dysertację, artykuł, który stanowił podstawę do wszczęcia przewodu doktorskiego, oświadczenia współautorów, streszczenia i PDF plakatów prezentujących cząstkowe wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu doktorskiego. W całości rozprawa doktorska liczy 196 stron. Doktorantka dostarczyła również całą rozprawę na nośniku cyfrowym i stwierdzam, że nie ma różnic między drukowaną, a cyfrową wersją rozprawy doktorskiej.

Wszystkie artykuły składające się na rozprawę doktorską opublikowano w 2019 roku, i są to dwa artykuły opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 4,556; pkt. MNiSW 2019 = 140) i jeden rozdział w monografii wydawnictwa John Wiley & Sons. Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską stanowią trzy spójne tematycznie artykuły mające charakter prac badawczych. Sumaryczny IF czasopism, w których opublikowano cykl prac stanowiących rozprawę doktorską mgr inż. Sańko-Sawczenko to 9,12, a pkt. MNiSW 2019: 280 + 20 (rozdział w monografii) = 300.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej to:

1. **Sańko-Sawczenko I**, Dmitruk D, Łotocka B i wsp. (2019a) Expression analysis of *PIN* genes in root tips and nodules of *Lotus japonicus*. *Int J Mol Sci* 20:235.
2. **Sańko-Sawczenko I**, Łotocka B, Mielecki J i wsp. (2019b) Transcriptomic changes in *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* root nodules during drought stress. *Int J Mol Sci* 20:1204.
3. Skawińska M, **Sańko-Sawczenko I**, Czarnocka W, Łotocka B (2019) Organization and ultrastructure of *Medicago truncatula* root nodule meristem. In: *The Model Legume Medicago truncatula*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 726–740.

Doktorantka w dwóch pracach była pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami współautorów oraz samej Doktorantki, Jej udział w dwóch pracach był znaczący (55% i 40%), zaś w rozdziale w monografii wynosił 15%. Muszę przyznać, że jestem przeciwniczką określania procentowego udziału współautorów w pracach składających się na rozprawę doktorską, gdyż często prowadzi to do sytuacji niezręcznych, szczególnie wobec promotora pracy. Zgodnie z oświadczeniem, Doktorantka uczestniczyła w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadziła większość eksperymentów i ich analiz, uczestniczyła w opracowaniu wyników i ich graficznym przedstawieniu, a także w przygotowaniu manuskryptów. Na tej podstawie stwierdzam wiodący udział Doktorantki w przedłożonej do recenzji rozprawie doktorskiej.

Rozprawa doktorska została napisana poprawnym językiem naukowym i starannie zredagowana. Dokumentacja fotograficzna w rozprawie doktorskiej jest doskonałej jakości i w sposób przejrzysty dokumentuje uzyskane wyniki.

Zatem, z formalnego punktu widzenia rozprawa Pani mgr inż. Izabeli Sańko-Sawczenko nie budzi żadnych zastrzeżeń, a fakt opublikowania prac w bardzo dobrych czasopismach naukowych wskazuje również na wysoką wartość merytoryczną rozprawy.

Ocena merytoryczna rozprawy

Artykuły, które stanowią podstawę dysertacji, przeszły już proces recenzji merytorycznej przed kwalifikacją do publikacji. Z tego względu praca recenzenta takiej rozprawy doktorskiej jest ułatwiona.

Przygotowane przez Doktorantkę wprowadzenie napisane jest zrozumiale i kompetentnie. We wszystkich pracach składających się na rozprawę doktorską widać, że Doktorantka potrafi krytycznie spojrzeć na uzyskane wyniki, przedyskutować je z najnowszą literaturą i wyciągać wnioski oraz wskazywać kierunki dalszych badań. To wskazuje na dojrzałość naukową mgr inż. Sańko-Sawczenko.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska miała na celu znalezienie odpowiedzi na pytania: 1/ czy aktywność merytematyczna brodawek korzeniowych występujących u *Medicago truncatula* i *Lotus japonicus* jest taka sama czy zróżnicowana w związku z różnym typem brodawek wytwarzanych przez te gatunki, 2/ jakie mechanizmy molekularne uczestniczą w regulacji aktywności merytematycznej brodawek, w szczególności zaangażowanych w podtrzymywanie ich aktywności merytematycznej, 3/ jakie geny zaangażowane są w rozwój i funkcjonowanie brodawek korzeniowych na tle genów zidentyfikowanych w korzeniach badanych roślin, 4/ czy aktywność genów w brodawkach korzeniowych i korzeniach w warunkach stresu suszy jest taka sama czy różna oraz 5/ czy można wskazać inicjaty poszczególnych tkanek brodawki korzeniowej na podstawie analizy histologiczno-ultrastrukturalnej? Należy dodać, że wszystkie przeprowadzone badania wykonano na gatunkach modelowych dla tego rodzaju badań, gdyż rośliną modelową do prowadzenia badań nad brodawkami typu niezdeteminowanego jest *Medicago truncatula*, zaś nad brodawkami typu zdeterminowanego jest *Lotus japonicus*.

W pierwszej z prac stanowiących rozprawę doktorską celem było określenie udziału białek PIN w morfogenezie brodawek typu zdeterminowanego. Szczegółowa analiza wykazała ekspresję genów *PIN* w aspekcie czasowo-przestrzennym, co pozwoliło powiązać ekspresję poszczególnych genów *PIN* (*LjPIN1*, *LjPIN2*, *LjPIN3*, *LjPIN4*, *LjPIN5*, *LjPIN6*,

LjPIN7, *LjPIN8*) z procesami rozwojowymi brodawki typu zdeterminowanego. To z kolei, w powiązaniu z analizą DR5-GUS pokazało czasowo-przestrzenną lokalizację auksyny skorelowaną z procesami morfogenezy brodawki. Uzyskane wyniki pozwoliły wyciągnąć wnioski dotyczące związku między białkami uczestniczącymi w ukierunkowanym transporcie auksyny, jej koncentracją i stadium rozwojowym brodawki. Na uwagę zasługuje także dokonana analiza ekspresji genu *PIN8*, gdyż w kontekście utrzymania homeostazy auksyny w poszczególnych komórkach, wiedza o jego ekspresji jest istotna. Należy podkreślić, że o ile pozycji literaturowych odnoszących się do lokalizacji, funkcji i regulacji ekspresji genów *PIN* i białek PIN u modelowego gatunku, jakim jest *Arabidopsis*, jest ogromna, o tyle danych dla innych gatunków jest znacznie mniej. Dlatego uważam, że wyniki dostarczone przez Doktorantkę wspaniale uzupełniają naszą wiedzę w tym zakresie, dla gatunku, który nie jest postrzegany, jako modelowy w badaniach molekularnych.

W kolejnej pracy przeanalizowano ekspresję genów dla korzeni *M. truncatula* i *L. japonicus* i komponenta bakteryjnego w warunkach kontrolnych i w warunkach stresu suszy, poszukując odpowiedzi na pytanie czy adaptacja do warunków stresowych zależy od rośliny, symbionta bakteryjnego czy obu komponentów. Wykazano zmniejszenie zdolności do wiązania azotu jako reakcję na stres, zmiany w aktywności nitrogenazy, oraz zmiany w transkryptomie zarówno rośliny jak i bakteriodów, które, ze względu na czas pojawienia się odpowiedzi komórkowej, można zaliczyć do wczesnych etapów reakcji na zastosowany stres. Te wyniki wskazały, że stres moduluje nie tylko odpowiedź rośliny, ale także komponenta bakteryjnego objawiającą się zmianami w ekspresji genów. Poza tym, prezentowane badania pokazały, że w brodawkach korzeniowych w pierwszej kolejności wzmagają się ekspresja genów dla specyficznych białek wydzielanych przez ryzobia, a związanych z procesami różnicowania brodawki. Stwierdzono także wzmożoną ekspresję genów odpowiedzialnych za rearanzację ściany komórkowej, metabolizm flawonoidów oraz auksyny. Zidentyfikowane różnice w reakcji na stres u obu analizowanych gatunków oraz komponenta bakteryjnego, wskazują na prawdopodobną przyczynę zróżnicowanej reakcji, a mianowicie, rodzaj tworzonych brodawek korzeniowych. Określenie na czym, na poziomie molekularnym, zasadza się reakcja na stres osmotyczny jest istotnym osiągnięciem.

Trzecia praca wchodząca w skład rozprawy doktorskiej to doskonały opis histologiczny i ultrastrukturalny merystemu brodawki korzeniowej powstającej u *M. truncatula*. Głównym celem pracy było poszukiwanie markerów cytologiczno-ultrastrukturalnych komórek inicjalnych dla poszczególnych tkanek merystemu brodawki korzeniowej. Udało się zidentyfikować tylko komórki inicjalne wiązek waskularnych.

W pracy przeanalizowano także ekspresję genów zaangażowanych w utrzymanie tożsamości komórek wierzchołka pędu korzenia oraz brodawek korzeniowych, i stwierdzono, że podobna pula genów ulega ekspresji, ale o znacznie obniżonej aktywności w brodawce korzeniowej w porównaniu do RAM. Uzyskane wyniki pozwoliły na postawienie hipotezy zakładającej, że merystem brodawki składa się z rozproszonych centrów inicjalnych dla wiązek waskularnych, które mogą być źródłem sygnałów regulujących jej rozwój. Przedstawione wyniki stanowią doskonałe studium połączenia badań histologicznych z analizą ekspresji genów, dostarczając istotnych informacji na temat kontroli genetycznej zachodzących procesów rozwojowych.

W wyżej wymienionych pracach wykorzystano między innymi techniki molekularne takie jak RT-PCR, Real Time qPCR. Wykonano transformację roślin. Przeprowadzono analizę filogenetyczną genów *PIN* *Arabidopsis*, *L. japonicus* i *M. truncatula* oraz lokalizację błonową białek *PIN*. W badaniach zastosowano również chromatografię gazową oraz analizę histologiczno-cytologiczną zarówno na poziomie mikroskopu świetlnego jak i elektronowego. Oczywiście nie wszystkie analizy wykonywała Doktorantka, ale w badaniach molekularnych odgrywała wiodącą rolę, co zasługuje na podkreślenie. Oznacza to bowiem, że dysponuje rzetelną wiedzą teoretyczną oraz praktycznymi umiejętnościami niezbędnymi do prowadzenia badań naukowych.

Podsumowując, można stwierdzić, że uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że mechanizmami odpowiedzialnymi za podtrzymanie i funkcjonowanie brodawek korzeniowych u Fabaceae, na poziomie molekularnym, są czynniki regulujące cykl komórkowy oraz czynniki transkrypcyjne uczestniczące w regulacji aktywności merystematycznej, a także białka zaangażowane w kierunkowy przepływ auksyny, co wskazuje na regulującą rolę tego hormonu, również w funkcjonowaniu merystemu brodawek korzeniowych. Uzyskane wyniki wskazują, że powstawanie brodawek korzeniowych typu zdeterminowanego i niezdeterminowanego może wynikać właśnie z różnic w poziomie auksyny generowanych nie tylko za pośrednictwem białek *PIN* zlokalizowanych w błonie, ale także tych zlokalizowanych w błonach retikulum endoplazmatycznego.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej uważam:

- Dostarczenie informacji na temat struktury i mechanizmów regulacji rozwoju brodawek korzeniowych o typie wzrostu zdeterminowanym i niezdeterminowanym, co umożliwi w przyszłości dalsze badania na poziomie molekularnym mechanizmów regulujących rozwój tych struktur.

- Szczegółowy opis (histologiczno-ultrastrukturalny i ekspresji wybranych genów) merystemu brodawki korzeniowej u *M. truncatula*, co stanowi podstawę dla dalszych analiz na różnych poziomach, od molekularnego po strukturalny, dla tego gatunku modelowego.
- Przedstawienie czasowo-przestrzennej ekspresji genów w korzeniach i brodawkach korzeniowych poddanych stresowi suszy. Te wyniki będą stanowiły podstawę dalszych badań nad wczesną odpowiedzią komórkową, myślę, że nie tylko w aspekcie stresu suszy.

Można zatem stwierdzić, że cele naukowe postawione w tym projekcie doktorskim zostały osiągnięte i dostarczają nowych, ważnych dla rozwoju dyscypliny naukowej reprezentowanej przez mgr inż. Sańko-Sawczenko, wyników.

Uwagi

Moim zdaniem brak przejrzystego sformułowania celów pracy i wniosków, mam nadzieję, że zostanie to uwzględnione w autoreferacie. Byłoby bardzo dobrze, aby jasno wypunktować jakie hipotezy badawcze przyświecały przy podejmowaniu badań, a także wymienić w punktach uzyskane wyniki/wnioski. To wszystko oczywiście można znaleźć czytając poszczególne prace, ale jeśli już został przygotowany tak obszerny wstęp, to byłoby dobrze, znaleźć w nim, wyraźnie uwypuklone cele badań oraz najważniejsze wnioski.

Zagadnienia do dyskusji

Zapoznając się z przedstawioną do recenzji pracą doktorską nasunęły mi się zagadnienia do dyskusji o charakterze bardziej ogólnym i chciałam Doktorantkę prosić o przedstawienie swojej opinii na poniższe tematy.

1/ Czy stwierdzoną zróżnicowaną ekspresję genów *PIN* w korzeniach i brodawkach korzeniowych można powiązać z reakcją obu symbiontów na działanie, na przykład grawitacji? Znamy wyniki badań wskazujących, na relokację białek *PIN* w odpowiedzi na ten czynnik. Czy jest możliwe, aby i tutaj zachodziła taka relacja?

2/ W związku z analizą ekspresji istotnych dla utrzymania tożsamości komórek wierzchołka korzenia genów, i ponieważ analizowano czynniki transkrypcyjne takie jak *SHR* i *SCR*, proszę o omówienie udziału komunikacji symplastowej w regulacji różnicowania komórek w wierzchołku korzenia. Wiadomo, że istnieje taka kontrola. Czy można podejrzewać, że również w przypadku brodawek, istnieje możliwość kontrolnej roli komunikacji symplastowej w regulacji różnicowania tej struktury?

3/ W związku z udokumentowanym zjawiskiem przemieszczania się auksyny poprzez plazmodesmy, czy należy podjąć analizy pozwalające na odpowiedź na pytanie jaki jest udział błonowych przenośników auksyny i auksyny przemieszczającej się poprzez plazmodesmy w regulacji różnicowania się brodawki korzeniowej?

Dodatkowe informacje

Należy podkreślić, że badania stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej były finansowane ze źródeł zewnętrznych, co zasługuje na uznanie, gdyż nie każdy wniosek badawczy skierowany do NCN czy MNiSW znajduje uznanie gremium przyznającego środki finansowe. Wspomniane granty to: Projekt nr 2017/27/N/NZ9/01211, pt.: „Rola białek PIN w rozwoju brodawek korzeniowych typu zdeterminowanego i niezeterminowanego”; Narodowe Centrum Nauki (NCN) w ramach konkursu PRELUDIUM 14 oraz Projekt nr 0512/IP1/2015/73, pt.: „Analiza różnic w transkryptomach brodawek korzeniowych *Medicago truncatula* oraz *Lotus japonicus* w warunkach optymalnych i w warunkach stresu suszy przy pomocy sekwencjonowania RNA następnej generacji (NGS); Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach konkursu IUVENTUS PLUS.


Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Izabeli Sańko-Sawczenko spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669).

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych SGGW w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Izabeli Sańko-Sawczenko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową wykonanych badań wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem


Prof. dr hab. Ewa U. Kurczyńska