

prof. UPP dr hab. Katarzyna Nuc  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii  
Katedra Biochemii i Biotechnologii  
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań  
katarzyna.nuc@up.poznan.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej  
**mgr Izabeli Sańko-Sawczenko**

pt.: „Wybrane mechanizmy molekularne zaangażowane w podtrzymywanie aktywności merystematycznej brodawek korzeniowych u gatunków modelowych z rodziny Fabace”  
wykonana pod kierunkiem promotora, **dr hab. inż. Barbary Łotockiej prof. SGGW**  
oraz promotora pomocniczego **dr inż. Weroniki Czarnockiej**  
**w Katedrze Botaniki Instytutu Biologii**  
**Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**

Poniższa recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr. **Izabeli Sańko-Sawczenko** przygotowana została na podstawie decyzji Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych SGGW w Warszawie, która na posiedzeniu w dniu 29.10.2020 powołała moją osobę na recenzenta wyżej wymienionej dysertacji.

Wśród wielorakich zjawisk biologicznych, posiadających skomplikowane mechanizmy regulacyjne, należy wymienić proces diazotrofii, który jest istotnym elementem geochemicznego cyklu obiegu azotu. Mimo, że  $N_2$  stanowi aż 80% atmosfery niewiele organizmów jest zdolnych do wykorzystania tych zasobów. Dla większości roślin jedynym źródłem azotu są azotany i sole amonowe, pobierane z gleby przez system korzeniowy. Wykorzystanie azotu atmosferycznego, jest możliwe wyłącznie po wymagającej znacznych nakładów energii jego redukcji przez organizmy diazotroficzne, które występują w różnych systemach biologicznych. Do utworzenia układu symbiotycznego między bakteriami symbiotycznymi a roślinami motylkowatymi, dochodzi w ściśle określonych warunkach środowiskowych, z których jednym z ważniejszych elementów jest ograniczony dostęp do źródła azotu pod postacią przyswajalnych jonów amonowych lub azotanowych. Innymi ważnymi czynnikami środowiskowymi wpływającymi na proces brodawkowania są temperatura oraz ilość wody w glebie, co raczej związane jest z kondycją ogólną rośliny wynikającą ze wzrostu w niekorzystnych warunkach. Brodawka jest organem symbiozy, utworzonym po kolonizacji komórek korzenia gospodarza przez bakterie zwane rizobiami, które w zainfekowanych komórkach przekształcają się w asymilujące azot bakteroidy, które otoczone błoną tworzą symbiosom. Brodawki korzeniowe zapewniają symbiotycznym rizobiom środowisko mikroaerobowe, niezbędne dla aktywności nitrogenazy (bakteryjny enzym katalizujący redukcję  $N_2$ ). W wyniku zainicjowania procesu endosymbiozy, w zależności od gospodarza roślinnego, mogą być tworzone trzy rodzaje brodawek: brodawki typu zdeterminowanego o ograniczonym wzroście (z ang. *determinate nodules*, występujący np. u *Glycine max* i *Lotus japonicus*), typu niezeterminowanego o nieograniczonym wzroście (z ang. *indeterminante nodules*, występujący np. u *Medicago truncatula* i *Vicia faba*), oraz typ tzw. kołnierzykowaty (występujący np. u *Lupinus luteus*). Tkanka bakteroidalna, zarówno brodawek o nieograniczonym wzroście jak i kołnierzykowatych podzielona jest na strefy, zróżnicowane pod względem wieku i funkcji znajdujących się w

nich komórek, charakteryzują się trwałą aktywnością zlokalizowanego apikalnie merystemu, utrzymującą się przez całe życie brodawki. Natomiast tkanka bakteroidalna brodawek o ograniczonym wzroście nie ma wyraźnego podziału na strefy, a ich merystem, po wytworzeniu odpowiedniej liczby komórek wygasza swoją aktywność.

Oceniana rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Botaniki Instytutu Biologii SGGW w Warszawie pod opieką naukową dr hab. inż. Barbary Łotockiej prof. SGGW oraz promotora pomocniczego dr inż. Weroniki Czarnockiej, opisuje badania, które bez wątplenia wpisują się w nurt dogłębnego wyjaśnienia procesów zachodzących podczas organogenezy i funkcjonowania brodawek korzeniowych roślin z rodziny Fabace. Badania finansowane były ze środków dwóch projektów badawczych:

1. Finansowanie przyznane autorce niniejszej rozprawy, przez NCN w ramach konkursu PRELUDIUM 14, projekt nr 2017/27/N/NZ9/01211, pt.: „Rola białek PIN w rozwoju brodawek korzeniowych typu zdeterminowanego i niezeterminowanego”
2. 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)” przyznany Weronice Czarnockiej, przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach konkursu IUVENTUS PLUS.

#### **Ocena merytoryczna pracy**

Doktorantka w swoich badaniach porusza bardzo istotne zagadnienie obejmujące molekularne mechanizmy związane z aktywnością merystematyczną brodawek korzeniowych. Do swoich badań Doktorantka wybrała dwie rośliny modelowe: *Medicago truncatula* do prowadzenia badań nad brodawkami typu niezeterminowanego oraz *Lotus japonicus* do prowadzenia badań nad brodawkami typu zdeterminowanego. Ze względu na możliwość poszerzenia wiedzy na temat funkcjonowania tkanki merystematecznej w brodawkach korzeniowych roślin motylkowatych, temat podjęty przez Doktorantkę jest bardzo interesujący i ambitny. W tym zakresie autorka skupia się przede wszystkim na molekularnej charakterystyce najważniejszych czynników związanych z regulacją cyklu komórkowego, ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne regulujące aktywność merystematyczną oraz na funkcji jakie spełnia polarny transport auksyny w tym procesie. Szczególną uwagę Doktorantka poświęciła rodzinie transporterów PIN – białek odpowiedzialnych za polarny transport auksyny. Drugim nurtem badań prezentowanych w przedstawionej pracy jest analiza wpływu warunków suszy na transkryptomy *M. truncatula* cv. Jemalong A17 i *L. japonicus* cv. Gifu oraz bakterii symbiotycznych *Sinorhizobium meliloti* i *Mesorhizobium loti*.

W swojej pracy Doktorantka posługuje się szerokim zakresem nowoczesnych technik: masowe sekwencjonowanie transkryptomów (NGS), PCR w czasie rzeczywistym (analiza poziomu ekspresji genów metodą bezwzględną oraz względną), analiza tkanek pod mikroskopem świetlnym, uzyskanie roślin hybrydowych (zawierających transgeniczny korzeń) do analizy aktywności promotora.

Doktorantka we wstępie, poprzedzającym publikacje składające się na rozprawę doktorską, przedstawiła zwięzłe opracowanie dotyczące: budowy brodawek korzeniowych (typu zdeterminowanego i niezeterminowanego), funkcjonowania cyklu komórkowego w brodawkach korzeniowych z uwzględnieniem białek biorących udział w regulacji tego procesu. Następnie Doktorantka płynnie przechodzi do uzyskanych wyników, traktując

wprowadzenie jako pewnego rodzaju uzupełnienie tych, które zostały opublikowane w przedstawionych artykułach. Analizując wyniki swoich badań Doktorantka odnosi się do cyklu komórkowego w merystemie korzenia (RAM, z ang. *Root Apical Meristem*). Analiza porównawcza transkryptomów *M. truncatula* cv. Jemalong A17 uprawianych w warunkach suszy (w stosunku do roślin kontrolnych) wykazała, że spośród 90 genów kodujących białka związane z regulacją cyklu komórkowego, jedynie 3 wykazywały wyższą ekspresję a 8 obniżoną, w brodawce korzeniowej w stosunku do nieinokulowanych korzeni. Dodatkowo, żaden z genów o różnicującym poziomie ekspresji nie koduje cyklin czy kinaz zależnych od cyklin zaklasyfikowanych do klasy B. Podobne wyniki Doktorantka uzyskała z analizy transkryptomicznej *L. japonicus*. W tym przypadku zidentyfikowano 100 genów kodujących białka związane z regulacją cyklu komórkowego, z czego 4 wykazywały wyższą ekspresję a 11 obniżoną, w brodawce korzeniowej w stosunku do nieinokulowanych korzeni. Tu jednak Doktorantka zidentyfikowała ortologię genów kodujących białka biorące udział w regulacji cyklu komórkowego: 2 spośród 4 oraz 3 spośród 11. Doktorantka sugeruje, że regulacja cyklu komórkowego w brodawkach *M. truncatula* angażuje geny kodujące inne cykliny i CDK, natomiast ekspresja pojedynczych cyklin klasy B w brodawkach *L. japonicus* może świadczyć o tym że w pobranych brodawkach dochodziło do sporadycznych podziałów komórkowych np. w obrębie wiązek przewodzących brodawki korzeniowej. Doktorantka słusznie zauważyła, tu zacytuję „Należy jednak zaznaczyć, że brodawki korzeniowe, niezależnie od ich typu, nie są organami bardzo aktywnymi mitotycznie, a korzenie wykorzystane do analizy transkryptomu również należy traktować jako materiał o niskiej aktywności merystematycznej ze względu na niski udział stożków wzrostu korzeni względem całej masy systemu korzeniowego pobranego do analiz.”. Stąd moja **uwaga** – być może lepszym rozwiązaniem w tym przypadku byłoby pobranie do analizy stożków wzrostu korzenia, jednakże rozumiem, że nadrzędnym celem (wyniki przedstawione w **publikacji 5.2**) było porównanie transkryptomów *M. truncatula* i *L. japonicus* uprawianych w warunkach suszy w stosunku do warunków „bezsuszy”. Wyniki uzyskane po porównaniu wyżej wymienionych transkryptomów wyraźnie pokazują wpływ suszy na ekspresję różnych genów w brodawkach korzeniowych obu roślin, jak również pokazują różnice w ogólnej ekspresji genów między brodawkami a korzeniami nieinokulowanymi. W wyniku przeprowadzonej analizy NGS dla *M. truncatula* scharakteryzowano 6042 geny ulegające zróżnicowanej ekspresji w brodawkach w stosunku do korzeni, natomiast dla *L. japonicus* 4830 genów. Są to głównie geny związane z brodawkowaniem oraz geny związane z syntezą, metabolizmem i degradacją flawonoidów i auksyny. Uzyskane wyniki pokazują istotne różnice między gatunkami, tylko dla 53% (1085) genów ulegających zróżnicowanej ekspresji u *L. japonicus* znaleziono ortologię u *M. truncatula*. Istotnie zauważalny jest również wpływ suszy na zróżnicowaną ekspresję genów, przy czym różnice są zależne od czasu trwania warunków stresowych. Podwyższonej ekspresji ulegają głównie geny związane z odpowiedzią roślin na stres suszy, natomiast obniżonej ekspresji ulegały geny związane z metabolizmem ogólnym oraz hormonów. Jednakże obie rośliny wypracowały inne scenariusze wychodzenia ze stresu suszy ponieważ znaleziono tylko 38 genów wspólnych (ortologów), które ulegają zróżnicowanej ekspresji w tych warunkach. Bardzo ciekawym aspektem tej pracy jest również opracowanie różnic w ekspresji genów bakteryjnych pod wpływem suszy. Wykazano, że susza wpływa nie tylko na aktywność niektórych enzymów ale także na

ekspresję genów bakteryjnych, przy czym te różnice były bardziej zauważalne dla *M. loti* niż *S. meliloti*.

W rozprawie doktorskiej zaprezentowano także porównawczą analizę mikroskopową młodych i dojrzałych brodawek korzeniowych *L. japonicus* oraz analizę ekspresji genów kodujących cykliny i kinazy zależne od cyklin klasy B (**publikacja 5.1**). Wykazano, że w młodych brodawkach korzeniowych *L. japonicus* pobranych 20 dni po inokulacji rizobiami wciąż zachodzą podziały komórkowe, w przeciwieństwie do dojrzałych brodawek (54 dpi), nie wykazujących nawet szczątkowej aktywności merystematycznej, co potwierdzono poprzez wykonanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym dzięki której wykazano ponad trzykrotnie wyższą ekspresję genu kodującego cyklinę 1 (należącą do klasy B) w brodawkach 20 dpi, w porównaniu do brodawek 54 dpi.

Badania prowadzone przez Doktorantkę obejmowały również porównanie poziomu ekspresji genów kodujących niektóre czynniki transkrypcyjne, związane z aktywnością merystematyczną, w brodawkach korzeniowych w stosunku do stożków wzrostu korzeni *M. truncatula* i *L. japonicus*. Spośród analizowanych genów u *M. truncatula* zaobserwowano znaczną różnicę w ekspresji genu *MtSCR2* charakteryzującego się ponad 117-krotnie wyższą ekspresją w brodawce względem korzenia. Natomiast *MtSCR1* wykazuje jedynie nieznacznie podwyższony poziom ekspresji. Podobnie w przypadku genów kodujących czynniki transkrypcyjne *MtSHR1* i *MtSHR2*, tylko gen *MtSHR1* ulega podwyższonej ekspresji w brodawkach (3,49 razy) natomiast *MtSHR2* charakteryzuje się nieznacznie obniżoną ekspresją (1,43 razy). Doktorantka sugeruje, że istnienie dwóch ortologów tych genów wiąże się z tym, że ich ekspresja i funkcja jest w dużej mierze organospecyficzną – jeden jest charakterystyczny dla tkanek korzenia, natomiast drugi reguluje przede wszystkim aktywność merystemu brodawki korzeniowej. Spośród genów kodujących białka WOX tylko *MtWOX5* charakteryzuje się wyższą ekspresją w brodawce korzeniowej w stosunku do korzenia. Genem, który wykazywał wysoki poziom ekspresji w brodawkach *M. truncatula* w porównaniu do korzeni jest *MtHAP2-1* (ponad 9 razy). Doktorantka sugeruje, że jest to związane z tym, że jego ekspresja jest ściśle ograniczona do strefy merystemu brodawek, a czynnik transkrypcyjny przez niego kodowany związany jest procesem regulacji poprawnego różnicowania komórek brodawki korzeniowej. Analiza transkryptomu *L. japonicus* wykazała, że część opisanych powyżej genów ulega ekspresji również w brodawkach zdeterminowanych, jednakże dla większości z nich zaobserwowano niższy poziom ekspresji w brodawkach niż w korzeniach. Jedynie gen *LjWOX5* wykazał wyższy poziom ekspresji w brodawkach (prawie 3 razy). Doktorantka postuluje, że opisane wyniki wskazują na odmienną regulację aktywności merystematycznej pomiędzy dwoma gatunkami, co może być związane z szybkim wygaszaniem aktywności merystematycznej w brodawkach zdeterminowanych.

Ponieważ rozwój brodawek jest wysoce skorelowany z poziomem auksyny Doktorantka zajęła się charakterystyką białek, które mogą brać udział w jej transporcie (**publikacja 5.1**). Polarny transport auksyny jest możliwy dzięki asymetrycznej lokalizacji transporterów PIN (ang. *PIN-formed proteins*) w błonach komórkowych. Analizując bazy danych Doktorantka wyselekcjonowała 11 genów *M. truncatula* oraz 8 *L. japonicus*, które potencjalnie mogą kodować białka PIN. W swoich badaniach doktorantka wykazała, wysoki poziom ekspresji genów kodujących białka PIN, zarówno tych zlokalizowanych w błonie komórkowej jak i w ER brodawek korzeniowych *L. japonicus* (20 dni po inokulacji), który

następnie się obniża po 54 dniach i jest ograniczony przede wszystkim do bazalnej części brodawki, w miejscu połączenia systemu wiązek przewodzących brodawki z walcem osiowym korzenia. Swoje wyniki Doktorantka potwierdziła wykorzystując przygotowane konstrukcje genowe (połączenie sekwencji promotorowych poszczególnych genów *PIN* z genem reporterowym *GUS*). Uzyskane konstrukcje Doktorantka wprowadziła poprzez transformację (za pomocą *Agrobacterium rhizogenes*) do korzeni *L. japonicus* uzyskując rośliny hybrydowe (posiadające transgeniczny korzeń i „dziki” typ pędu). Po wybarwieniu histochemicznym (reakcja na obecność GUS) doktorantka prowadziła obserwacje mikroskopowe, których celem było wykrycie aktywności  $\beta$ -glukuronidazy w korzeniach i brodawkach. Doktorantka wykazała, że najwyższy poziom ekspresji w merystemach korzeniowych osiągał gen *LjPIN2*. Znalazło to również potwierdzenie w obserwacji mikroskopowej, ponieważ najwyższą aktywność GUS (gen *GUS* połączony z promotorem *LjPIN2*) zlokalizowano w rejonach merystemu korzeniowego. W brodawkach korzeniowych zaobserwowano względnie wysoki poziom ekspresji genów *LjPIN1*, *LjPIN3*, *LjPIN4*, *LjPIN6* i *LjPIN7*. Ekspresja genu *LjPIN2* ograniczona jest tylko do zawiązków brodawki. Szczegółowe zestawienie wzoru ekspresji uzyskanych konstrukcji genowych zebrano w tabeli 2 publikacji 5.1. Jak widać jest ona zróżnicowana w zależności od genu i stanu rozwojowego brodawki.

W publikacji 5.3 opisano analizę poziomu ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne związane z aktywnością merystematyczną u *M. truncatula* stosując analizę PCR w czasie rzeczywistym (część z nich była analizowana na podstawie wyników NGS). Pokazano również i dokładnie opisano strukturę brodawki korzeniowej *M. truncatula* na różnych etapach jej rozwoju. Przekroje i dokumentacja wykonane są niezwykle starannie (dotyczy to wszystkich przedstawionych prac). **Moje pytanie** jako recenzenta dotyczy analizy poziomu ekspresji wybranych genów. W podpisie do ryciny 9.5.1.2.5 zaznaczono, że analizę przeprowadzono metodą bezwzględną cytując „Absolute, normalized expression level”, zastanawiam się co oznacza „absolute, normalized”, natomiast w materiałach i metodach zapisano cytując „Results were normalized using reference gene”. Proszę aby Doktorantka wyjaśniła sposób przeprowadzenia analizy.

### **Ocena formalna pracy**

Przedstawioną do oceny rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie zbiór trzech artykułów naukowych opublikowanych w roku 2019 wraz z omawiającym je autoreferatem:

5.1. **Sańko-Sawczenko Izabela**, Dmitruk Dominika, Łotocka Barbara, Różańska Elżbieta, Czarnocka Weronika (2019) Expression analysis of PIN genes in root tips and nodules of Lotus japonicus. *International Journal of Molecular Sciences*, 20:235. 10.3390/ijms20020235 (cytowana 4 razy)

5.2. **Sańko-Sawczenko Izabela**, Łotocka Barbara, Mielecki Jakub, Rekosz-Burlaga Hanna, Czarnocka Weronika (2019) Transcriptomic changes in Medicago truncatula and Lotus japonicus root nodules during drought stress. *International Journal of Molecular Sciences* 20:1204. 10.3390/ijms20051204

5.3. Skawińska Monika, **Sańko-Sawczenko Izabela**, Czarnocka Weronika, Łotocka Barbara (2019) Organization and ultrastructure of Medicago truncatula root nodule meristem. The Model Legume Medicago truncatula. Wydawnictwo: *John Wiley & Sons, Ltd*, pp 726–740. doi.org/10.1002/9781119409144.ch91

Do dokumentacji Doktorantka dołączyła również artykuł, który był wykorzystany do wszczęcia przewodu doktorskiego niebędący częścią rozprawy.

4. **Sańko-Sawczenko Izabela**, Łotocka Barbara, Czarnocka Weronika (2016) Expression analysis of PIN genes in root tips and nodules of *Medicago truncatula*. *International Journal of Molecular Sciences* 17(8): 1197. doi: 10.3390/ijms17081197 (cytowana 12 razy)


Publikacje oznaczone 5.1 i 5.2, to prace oryginalne, obie zostały opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* IF<sub>2019</sub> = 4,556 (łącznie 9,112) w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Publikacja 5.3 zawiera również wyniki eksperymentalne, jednakże jest przedstawiona jako rozdział w monografii pt. „The Model Legume *Medicago truncatula*”.

Wstęp teoretyczny w sposób rzeczowy wprowadza czytelnika w literaturę przedmiotu opierając się na licznych referencjach publikacyjnych (w sumie ponad 73 pozycje). Pragnę wyrazić podziw dla Doktorantki za znajomość szerokiego wachlarza metod i umiejętnie ich wykorzystanie. Niewątpliwie warsztat metodyczny Pani mgr. Izabeli Sańko-Sawczenko jest poparty wieloletnim doświadczeniem zespołu i promotora dr hab. inż. Barbary Łotockiej.

**W podsumowaniu**, rozprawa doktorska Pani mgr. Izabeli Sańko-Sawczenko pt. „Wybrane mechanizmy molekularne zaangażowane w podtrzymywanie aktywności merystematycznej brodawek korzeniowych u gatunków modelowych z rodziny Fabace” stanowi spójny tematycznie zbiór trzech artykułów naukowych zebranych i podsumowanych w załączonym autoreferacie, zgodnie z wymaganiami stawianymi tego typu opracowaniom. Wiedza Doktorantki z zakresu podejmowanej w artykułach tematyki jest rozległa i ugruntowana, o czym świadczy sposób i jakość podawanych i opisywanych informacji, a warsztat badawczy zasługuje na szczególne uznanie. Na uwagę zasługuje również fakt, że przedstawione prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o wysokim IF. Włożoną w uzyskanie wyników pracę oceniam bardzo wysoko. Przedstawiona do oceny rozprawa mgr. Izabeli Sańko-Sawczenko, przygotowana na podstawie zgromadzonych danych eksperymentalnych **stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymagania określone na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 30 października 2015 r., w związku z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669)**. Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych SGGW w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr. Izabeli Sańko-Sawczenko do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publiczną obronę pracy.

**Mając na uwadze wysoką ocenę rozprawy** - zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych SGGW w Warszawie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

10 stycznia 2021

  
prof. UPP Katarzyna Nuc