

Radzików, 08.05.2023.

**Recenzent:**

Prof. dr hab. Wacław Orczyk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Radzików, 05-870 Błonie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Tomasza Jamruszki pt.:**

**„Analiza funkcjonalna transportera ABCG biorącego udział w negatywnej regulacji gęstości korzeni bocznych i liczby brodawek u *Medicago truncatula*”**

**wykonanej**

**w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin pod kierunkiem promotora: prof. dr. hab. Michała Jasińskiego i promotorki pomocniczej: dr Joanny Banasiak**

**Wprowadzenie**

Zredukowane formy azotu są niezbędnym składnikiem pokarmowym, ich deficyt w glebie jest jednym z silniejszych stresów. Rośliny wyewoluowały wiele mechanizmów unikania tego stresu. W gatunkach bobowatych jest nim zdolność do symbiozy z bakteriami brodawkowymi i symbiotycznej asymilacji azotu. Jest to proces bardzo wydajny, pozwala na wiązanie od 200 do 500 kg N<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> rok<sup>-1</sup> i jednocześnie bardzo energochłonny. Asymilacja 1 mola N<sub>2</sub> wymaga energii pochodzącej z 16 moli ATP. Z tego względu wszystkie reakcje roślin bobowatych zarówno w odpowiedzi na deficyt azotu jak i na interakcję z bakteriami brodawkowymi są pod bardzo ścisłą kontrolą. Przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej jest białko transporterowe **MtABCG40** oraz system regulacji procesów morfogenetycznych korzenia *Medicago truncatula* w reakcji na stres deficytu azotu.

**Dane formalne o rozprawie**

Przedstawiana do recenzji dysertacja ma format klasycznej, napisanej po polsku, monografii naukowej. Praca liczy 142 strony. W cytowanej literaturze naliczyłem 223 pozycji. Dobór literatury bardzo dobrze oddaje obecny stan wiedzy. Rozdziały i podrozdziały są dopracowane i kompletne. Liczby stron kolejnych rozdziałów ‘Wprowadzenie literaturowe’ (24 strony), ‘Materiały i Metody’ (42 strony), ‘Wyniki’ (23 strony) i ‘Dyskusja’ (9 stron) są wyważone i proporcjonalne. Dysertacja jest ilustrowana bardzo dobrze przygotowanymi rycinami, jest ich 39. Tabel jest 39. Opisy rycin i tabel są generalnie poprawne, jakkolwiek w niektórych przypadkach zastąpienie zdań wielokrotnie złożonych zdaniami prostszymi ułatwiłoby ich zrozumienie. Język dysertacji jest komunikatywny, poprawny merytorycznie i praktycznie bez żargonu laboratoryjnego. Używana terminologia naukowa jest poprawna. Podsumowaniem wyników pracy jest siedem wniosków, w których doktorant zawarł najważniejsze wyniki, obserwacje i konkluzje. Podsumowaniem pracy są również dwa



modele biologiczne przedstawiające udział transportera MtABCG40 w badanych procesach, każdy zilustrowany i dobrze opisany w Dyskusji.

Recenzowana praca doktorska została wykonana w ramach, kierowanego przez promotora tego doktoratu, projektu NCN OPUS 2015/19/B/NZ9/03548. Wyniki dysertacji są opisane w manuskrypcie, który jest w trakcie recenzji obecnie dostępnym jako 'preprint':

**Jamruszka T**, Banasiak J, Pawela A, Jarzyniak K, Xia J, Biała-Leonhard W, Plačková L, Iacobini FR, Novák O, Geisler M, Jasiński M. (2022). Medicago truncatula ABCG40 is a cytokinin importer negatively regulating lateral root density and nodule number. *bioRxiv* (doi: 10.1101/2022.11.10.516000)

Ponadto, efektem badań przedstawionych w pracy doktorskiej są dwa artykuły opublikowane w wysoko indeksowanych czasopismach: *Nature Plants* i *Plant Physiology*.

1. Jarzyniak K, Banasiak J, **Jamruszka T**, Pawela A, Di Donato M, Novak O, Geisler M, Jasinski M. (2021). Early stages of legume–rhizobia symbiosis are controlled by ABCG-mediated transport of active cytokinins. *Nature Plants*, 7: 428–436. (doi: 10.1038/s41477-021-00873-6)
2. Banasiak J, **Jamruszka T**, Murray JD, Jasiński M. (2021). A roadmap of plant membrane transporters in arbuscular mycorrhizal and legume rhizobium symbioses. *Plant Physiology*, 1–21. doi: 10.1093/plphys/kiab280

Wyniki te zastały wyróżnione trzema nagrodami.

1. Nagroda Naukowa Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN za najlepszą publikację eksperymentalną powstałą w Instytucie w roku 2021.
2. Wyróżnienie Komitetu Biologii Molekularnej Komórki PAN w konkursie im. prof. K. Bassalika za artykuł „Early stages of legume–rhizobia symbiosis are controlled by ABCG-mediated transport of active cytokinins”.
3. Nagroda Wydziału II Nauk Biologicznych i Rolniczych PAN w 2022 roku za wybitne osiągnięcie badawcze pt. „Poznanie mechanizmu dystrybucji cytokinin w procesie biologicznego wiązania azotu u roślin bobowatych”

**Wprowadzenie literaturowe** jest bardzo dobrze napisaną pracą przeglądową obejmującą najważniejsze obszary badań. Doktorant przedstawia czytelnikowi najważniejszą wiedzę dotyczącą regulacji wzrostu i rozwoju systemu korzeniowego w tym morfogenezy korzeni bocznych i brodawek korzeniowych. Omówione są mechanizmy obronne systemu korzeniowego uruchamiane w odpowiedzi na stresy środowiskowe w tym stresy niedoboru związków azotu i fosforu. Elementem tego mechanizmu jest system autoregulacji brodawkowania obejmujący procesy inicjacji oraz hamowania rozwoju brodawki korzeniowej w interakcji roślin bobowatych z bakteriami *Rhizobium*.

Szczegółowo opisane są dwie grupy regulatorów wzrostu tj. cytokininy i auksyny. Ta część wprowadzenia jest najważniejsza dla tematyki pracy i zawiera aktualną wiedzę na temat



biosyntezy i degradacji oraz percepcji i transdukcji sygnałów obydwu klas regulatorów. Wyczerpująco omówione są procesy biosyntezy i transportu cytokinin w obrębie rozwijających się części korzenia. Te podrozdziały są jednocześnie bezpośrednim wstępem do głównej tematyki dysertacji tj. identyfikacji i badania funkcji MtABCG40, tj. białka zidentyfikowanego jako jeden z wyspecjalizowanych transporterów cytokinin.

Wstępem do części eksperymentalnej jest dobrze sformułowany **cel badań** jest nim cyt. „poznanie roli białka MtABCG40 w reakcji korzenia modelowej rośliny bobowatej *Medicago truncatula* na niedobór azotu w środowisku”. Obok celu głównego Doktorant wskazał również cele pośrednie. Są to: i) identyfikacja związku transportowanego przez białko MtABCG40, ii) poznanie funkcji MtABCG40 w procesach morfogenetycznych korzenia oraz iii) zaproponowanie mechanizmu oddziaływania MtABCG40 i cytokinin na morfogenezę korzenia w warunkach niedoboru azotu.

**Wyniki** badań przedstawione są w kolejności takiej jak rozwijała się ścieżka badań i realizowane były kolejne etapy prowadzące do realizacji celów pośrednich. Omawiając tę część zwrócę uwagę tylko na najważniejsze etapy oraz te, w stosunku do których proszę o dodatkowe wyjaśnienia.

Wzór ekspresji genu *MtABCG40* jest organowo specyficzny. Transkrypt tego genu jest obecny praktycznie tylko w korzeniach i brodawkach korzeniowych, a jego ilość jest silnie regulowana przez brak lub obecność jonów amonowych w podłożu (Ryc. 4.2).

Analiza transkryptów badanego genu w mutantach insercyjnych *mtabcg40-1* i *mtabcg40-2* wykazała znacznie niższy poziom w porównaniu do roślin typu dzikiego WT (Ryc. 4.5). Wyniki te są ważne, ponieważ połączone z innymi analizami są punktem wyjścia do dalszego wnioskowania. Z tego względu, proszę o komentarz do następującego problemu.

Insercję transpozonu w mutantach stwierdzono w regionie transkrybowanym, a nie promotorowym. Dlaczego więc obserwowane były mniejsze ilości transkryptów *mtabcg40-1* i *mtabcg40-2* w porównaniu do *MtABCG40* w roślinach typu WT?

Pytanie nie kwestionuje samych wyników (sam mam podobne obserwacje) chodzi o dyskusję / interpretację potencjalnego mechanizmu, który byłby odpowiedzialny za obniżoną ilość transkryptów oraz zastanowienie się, czy może to mieć znaczenie w tych badaniach.

Kolejne eksperymenty wykonane przez Doktoranta pozwoliły na określenie subkomórkowej lokalizacji białka MtABCG40 oraz jego udział w transporcie cytokinin. Posłużono się tutaj systemem heterologicznej ekspresji przejściowej po transformacji protoplastów *Arabidopsis* oraz agroinfiltracji liści tytoniu. W obydwu przypadkach ekspresja transgenów i synteza badanego białka w fuzji z białkiem z rodziny GFP pozwalała na wizualną obserwację i w ten sposób wykazano błonową lokalizację transportera MtABCG40.

Obserwowana indukcja ekspresji genu *MtABCG40* przez egzogenne cytokiny (iP i tZ) pozwoliła na sformułowanie roboczej hipotezy zakładającej udział białka MtABCG40 w



transporcie cytokinin. Efektem tego założenia było zaplanowanie i wykonanie serii doświadczeń weryfikujących. Badania, wykonane z użyciem *tZ* znakowanej izotopem węgla <sup>14</sup>C, wykazały aktywny udział białka MtABCG40 w transporcie trans-zeatyny przez błony komórkowe. Ta praca była wykonana we współpracy z zespołem na uniwersytecie w Fryburgu w Szwajcarii. Kontrolą do tych eksperymentów był transport znakowanej trytem auksyny (IAA).

W kolejnej serii eksperymentów testowano rolę MtABCG40 i MtLOG3 w procesach morfogenetycznych korzenia. Posłużono się tutaj kolejnym systemem do badania funkcji genów. Wyciszono ekspresję każdego z tych genów poprzez indukowanie procesów RNAi w korzeniach oraz obserwowano zmiany fenotypowe, wskazujące na większą niż w kontroli gęstość korzeni bocznych.

W odniesieniu do tego cyklu badań proszę odpowiedzieć, co konkretnie zrobiono, aby wyciszenie było specyficznym ukierunkowane na gen docelowy, cyt. „Przygotowana konstrukcja wyciszająca zaprojektowana została z uwzględnieniem jak najwyższej specyficzności wyciszania”?

Ponadto, proszę doktora o sprawdzenie, czy w badaniach z użyciem roślin *M. truncatula* opisano edytowanie określonych genów technologią CRISPR/Cas9 z wykorzystaniem *A. rhizogenes*. Analogicznie jak opisane w doktoracie indukowanie procesów RNAi. Jeżeli nie, to proszę o zaprojektowanie ogólnych założeń i komponentów takiego systemu. Proponowałbym, aby było to przedmiotem dyskusji w czasie obrony doktoratu.

W kolejnym etapie Doktorant badał udział białka **MtABCG40** w funkcjonowaniu merystemu wierzchołkowego korzenia. Korzystając z mutantów insercyjnych genu kodującego *mtabcg40* i form dzikich wykonał pomiary stref wierzchołka korzenia w warunkach normalnych i niedoboru związków azotu w podłożu. Obserwował wydłużenie merystemu apikalnego w mutantach w porównaniu do WT. W korzeniach mutantów badał stężenia cytokinin i auksyn oraz wzory ekspresji genów **MtRR4** (marker szlaku sygnałowego zależnego od cytokinin), **DR5** (marker sygnalizacji zależnego od auksyn), **MtLOG3** i **MtLBG16** (czynnik transkrypcyjny zależny od auksyn promujący organogenezę korzeni bocznych). Analizy hormonów wykonano we współpracy z zespołem na Uniwersytecie Palackiego w Ołomuńcu. W tej serii eksperymentów na podkreślenie zasługuje precyzja wykonania. Wszystkie badane zmiany fenotypowe były zmianami ilościowymi, nierzadko niewielkimi w porównaniu z kontrolą. Wnioskowanie o ich biologicznym znaczeniu wymagało dokładności pomiarów, odpowiedniej liczby powtórzeń biologicznych i oceny istotności zmian po analizie statystycznej. Najważniejszy wniosek z tych badań to wykazanie, że **MtABCG40** jest transporterem cytokinin, a jego aktywność negatywnie reguluje zawiązywanie korzeni bocznych i negatywnie reguluje podziały komórkowe inicjujące rozwój brodawek korzeniowych.



## Dyskusja

Wyniki uzyskane w trakcie doktoratu pozwoliły przedstawić charakterystykę funkcji białka **MtABCG40**. Białko to ulega ekspresji głównie w korzeniach i na poziomie molekularnym jest jednym z transporterów cytokinin. Natomiast jego funkcją biologiczną jest regulacja morfologii systemu korzeniowego i procesu brodawkowania. Doktorant wykazał, że w warunkach niedoboru azotu białko **MtABCG40** reguluje zmiany morfologii korzeni. Są to: i) wydłużanie korzenia głównego, ii) hamowanie inicjacji powstawania korzeni bocznych oraz iii) hamowanie inicjacji powstawania brodawek korzeniowych. Wyniki te pozwoliły doktorantowi na zaproponowanie modeli biologicznych funkcji MtABCG40. Obydwa modele opisują rolę tego białka w transdukcji sygnałowej zależnej od cytokinin w korzeniach w warunkach niedoboru azotu.

**Model pierwszy** jest podsumowaniem roli MtABCG40 w wydłużaniu korzenia głównego. Zgodnie z nim aktywność MtABCG40 zmniejsza poziom cytokinin w apoplaście komórek RAM tym samym obniża percepcję regulatora przez receptory błonowe komórek i w efekcie hamuje wzrost wydłużeniowy korzenia głównego.

**Drugi model** jest podsumowaniem roli białka MtABCG40 w procesach zakładania zawiązków korzeni bocznych i brodawek korzeniowych. W warunkach niedoboru azotu, efektem aktywności białka MtABSG40 jest transport cytokinin i w konsekwencji hamowanie zakładania zawiązków korzeni bocznych i brodawek korzeniowych.

Zaproponowane modele wskazują, że przy niedoborze azotu w glebie aktywność badanego białka hamuje powstawanie brodawek korzeniowych. **W związku z tym prosiłbym o krótką dyskusję na temat biologicznej interpretacji tak przedstawionej roli białka MtABCG40.** Intuicyjnie oczekiwaną reakcją rośliny na niedobór azotu w podłożu jest raczej stymulacja powstawania brodawek korzeniowych, w konsekwencji większa asymilacja azotu i niwelowanie stresu braku azotu. Prosiłbym o komentarz.

Wyniki badań i obserwacji doktorant podsumował w siedmiu wnioskach, z których pierwszy i drugi są raczej podsumowaniem wyników. Większość z tych wniosków odnosi się do sformułowanych na początku celu głównego i celów pośrednich.

## Podsumowanie.

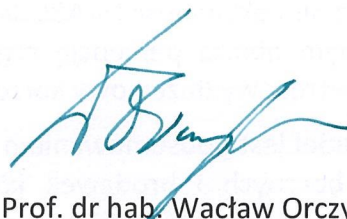
W mojej ocenie recenzowany doktorat jest dobrym przykładem kompleksowej, dobrze zaplanowanej i precyzyjnie wykonanej pracy badawczej. Cel pracy tj. poznanie na poziomie molekularnym i fenotypowym biologicznej roli białka MtABCG40 został osiągnięty. Wyniki pozwoliły na zaproponowanie dwóch modeli udziału tego białka w procesach molekularnych i morfogenezie korzenia *M. truncatula* w warunkach deficytu azotu.

**W mojej ocenie przedstawiona do oceny dysertacja doktorska mgr inż. Tomasza Jamruszki spełnia kryteria** określone w art. 13 ustawy z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie profesora (DZ.U. z 2018 r. poz. 261) zgodnie z

art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669).

**W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Tomasza Jamruszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

**Jednocześnie, biorąc pod uwagę wzorcowo przygotowaną dysertację, duże poznawcze znaczenie wyników w tym zaproponowanie dwóch modeli opisujących rolę badanego białka wnioskuję o wyróżnienie doktoratu mgr inż. Tomasza Jamruszki stosowną nagrodą.**



Prof. dr hab. Wacław Orczyk