



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych  
i Weterynaryjnych

dr hab. Justyna Wiśniewska, prof. UMK  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych  
Instytut Biologii  
ul. Lwowska 1,  
87-100 Toruń  
e-mail: jwisniew@umk.pl

Toruń, 10.05.2023

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Tomasza Jamruszki  
pt. "Analiza funkcjonalna transportera ABCG biorącego udział w negatywnej regulacji gęstości  
korzeni bocznych i liczby brodawek u *Medicago truncatula*"**

***Przedmiot i cel rozprawy***

Przedmiotem badań opisanych w recenzowanej pracy 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, Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem promotora: prof. dr. hab. Michała Jasińskiego i promotora pomocniczego dr Joanny Banasiak była ważna roślina z rodziny bobowate (*Fabaceae*) - *Medicago truncatula*. Lucerna występuje na wszystkich kontynentach, a niektóre rośliny z rodziny bobowate jak: groch (*Pisum sativum*), fasola (*Phaseolus vulgaris*), bób (*Vicia faba*), soja (*Glycine max*), łubin (*Lupinus albus*), lucerna siewna (*Medicago sativa*), koniczyna (*Trifolium sp.*) i komonica (*Lotus corniculatus*) ze względu na wysoką zawartość białka i składników mineralnych, są nieocenionym elementem diety człowieka i cennymi roślinami pastewnymi, które uprawiane są z przeznaczeniem na zielonkę, paszę, susz, siano lub kiszonkę dla zwierząt. Roślina ta też jest wykorzystywana w charakterze międzyplonu, zwiększając produkcję innych roślin uprawnych poprzez zasilanie ziemi w azot, związki organiczne i próchnicę, poprawianie struktury gleb, zapobieganie wymywaniu z nich związków mineralnych oraz hamowanie erozji wietrznej i wodnej. Ważną rolę roślin z tej rodziny jest również stwarzanie odpowiednich warunków dla rozwoju mikroorganizmów. Niewątpliwie cechą tych roślin jest brodawkowanie czyli zawiązywanie przez rośliny symbiotycznych relacji z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny z rodzaju rodzajów: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* i *Mesorhizobium*, zdolnymi do przekształcania azotu atmosferycznego do jego formy amonowej, która może być dalej metabolizowana w organizmie roślinnym. Proces ten zachodzi w warunkach niskiej dostępności azotu glebowego, co przyczynia się do wzbogacenia gleb w azot. Rola korzeni w ochronie całej rośliny przed stresem abiotycznym ma kluczowe znaczenie, gdyż to one odpowiedzialne są za pobieranie wody i składników odżywczych. Na podstawie przeprowadzonych badań do najczęstszych modyfikacji organów podziemnych w odpowiedzi roślin na stres należy wydłużanie lub skracanie długości korzenia głównego oraz dostosowywanie gęstości korzeni bocznych, a w przypadku roślin bobowatych jest dodatkowo wytwarzanie brodawek korzeniowych, zasiedlanych przez bakterie wiążące azot atmosferyczny, co ma za zadanie przeciwdziałać skutkom niedoborów tego pierwiastka w glebie. Zmiana morfologii korzenia zależna jest nie tylko od warunków zewnętrznych, ale także od wielu czynników endogennych jakimi są np. fitohormony, czego szczególnym przykładem są cytokininy, auksyny i ABA. Aktywność tych hormonów ma wielowymiarowy wpływ m.in. na długość korzenia głównego, liczbę korzeni bocznych oraz rozwój i liczbę brodawek, nierzadko w antagonistycznej relacji.

**Doktorant, pod opieką naukową pana Profesora Michała Jasińskiego i promotora pomocniczego dr Joanny Banasiak podjął ambitne i istotne dla nauki wyzwanie jakim było poznanie roli transportera MtABCG40 w reakcji korzenia modelowej rośliny z rodziny bobowatych *Medicago truncatula* na niedobór azotu w środowisku. Badania finansowano z grantu NCN OPUS**



2015/19/B/NZ9/03548: Rola transporterów błonowych w kaskadzie sygnałowej cytokinin podczas symbiozy bobowatych z bakteriami brodawkowymi: kierownik: prof. dr hab. Michał Jasiński, a w **trakcie realizacji pracy doktorskiej powstały 3 publikacje opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, co dodatkowo podkreśla wartość naukową recenzowanej pracy. Oceniając dysertację należy zwrócić szczególną uwagę na fakt, że temat dysertacji jest niezwykle interesujący, nowatorski nie tylko w zakresie badań podstawowych, ale także aplikacyjnych tj. wyzwań stojących przed współczesną agrobiotechnologią jakim jest niedobór dostępnej formy azotu w glebie oraz poznanie mechanizmu tworzenia brodawek korzeniowych u bobowatych.**

### **Ocena merytoryczna – struktura, język rozprawy, najważniejsze osiągnięcia naukowe**

Pod względem formalnym rozprawa jest typową monografią o charakterze eksperymentalnym. Praca liczy 142 strony zawiera 34 ryciny i 39 tabel oraz załącznik z dodatkowymi 8 rycinami. W pracy zacytowano ponad 330 pozycji literatury, głównie anglojęzyczne z wiodących, międzynarodowych czasopism. Zawiera typowe rozdziały: streszczenie po polsku i angielsku, wykaz skrótów, wstęp (odpowiednik przeglądu literatury w innych rozprawach), cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i spis literatury. Od strony językowej manuskrypt napisany jest dobrze, wszystkie części rozprawy zostały napisane poprawnym, wolnym od poważniejszych błędów gramatycznych i stylistycznych. W kilku miejscach Autor nie ustrzegł się określeń żargonowych np. traktowane odwrotnym szeregiem etanolowym..., charakterystyka mutantów w genach ich biosyntezy..., wiązkowy wzór ekspresji..., nie jest to jednak nagminne i absolutnie nie obniża wartości pracy. Zastrzeżenia budzi stosowanie określenia korzenie włosowate, a powinno być włosnikowate, które powstają w wyniku transformacji *Agrobacterium rhizogenes*, brak napisanych kursywą nazw łacińskich roślin w tekście i rozdziale literatura np. *Arabidopsis* czy *Medicago*. W całej pracy pojawiają się błędy redakcyjne: na końcu wersu często występuje litera w lub i, często też rozdzielone nieprawidłowo zostały nazwy związków chemicznych, opis pod rycinami jest przeniesiony na następną stronę. W rozdziale literatura nie ujednolicono stylu cytowania artykułów naukowych (w części tytułów prac tylko pierwszy wyraz napisany jest z wielkiej litery, a w innych każde słowo z wielkiej litery).

**Wstęp** przejrzysto wprowadza czytelnika w temat. Doktorant przedstawił, w oparciu o odpowiednio dobraną literaturę naukową, aktualny stan wiedzy o: rozwoju korzenia i zmianach jego morfologii w reakcji na stresy abiotyczne, metabolizmie cytokinin i ich percepcji przez komórki, udziale auksyn i cytokinin w negatywnej regulacji procesów morfogenetycznych korzenia, syntezie i transporcie cytokinin w korzeniu. Ponadto przedstawił *Medicago truncatula* jako organizm modelowy w badaniach podstawowych.

**Cel pracy** został jasno zdefiniowany tj. poznanie roli, jaką pełni transporter MtABCG40 w reakcji korzenia modelowej rośliny bobowatej *Medicago truncatula* na niedobór azotu w środowisku. Poza celem głównym, w pracy Doktorant wskazał cele pośrednie takie jak:

- identyfikacja transportowanego przez MtABCG40 związku poprzez przeprowadzenie eksperymentów transportu w układzie heterologicznym,
- przeprowadzenie analizy funkcjonalnej MtABCG40 z uwzględnieniem jego udziału w procesach morfogenetycznych korzenia,
- zaproponowanie mechanizmu oddziaływania MtABCG40 i cytokinin na morfologię korzenia *M. truncatula* w warunkach niedoboru azotu.

**Podsumowując, podjęte w rozprawie badania uważam za aktualne i interesujące dla współczesnej nauki, gdyż dotychczasowa wiedza o lokalizacji i roli transportera MtABCG40 w korzeniu głównym, korzeniach bocznych i podczas tworzenia brodawek korzeniowych jest nieznana.**

W pracy szczegółowo zestawiono w tabelach zastosowane materiały i opisano szczegółowo metody badawcze. **Bardzo mocną stroną pracy jest część metodyczna, gdyż aby rozwiązać wspomniane problemy badawcze Doktorant zastosował szeroki wachlarz technik biologii molekularnej, które**



wymagają dużej staranności i wysiłku, co zasługuje na szczególne uznanie np.: klonowanie i tworzenie różnych konstruktów genetycznych: *proMtABCG40:GUS*, *proMtLOG3:GUS*, *MtABCG40 RNAi*, *MtLOG3 RNAi*, *proUBI10:GFP-MtABCG40*, *proMtABCG40:NLS-GFP*, *proMtLOG3:NLS-tdTomato*, genotypowanie mutantów insercyjnych, technikę PCR, analizę poziomu ekspresji genów metodą Real-Time PCR, przygotowywanie preparatów mikroskopowych i analizę przestrzennego wzoru aktywności promotorów *MtABCG40* i *MtLOG3* za pomocą białek reporterowych (GUS GFP, tdTomato, DsRED) przy pomocy mikroskopu Leica DMI 4000B lub skaningowego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5, izolację protoplastów z liści mezofilu *A. thaliana* i ich transformację metodą PEG, wykonanie transformacji pośredniej za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* komórek mezofilu liści *Nicotiana benthamiana*. Niektóre badania zostały wykonane w ośrodkach zagranicznych, jak np. pomiar stężenia fitohormonów we wierzchołkach wzrostu korzenia i tworzenie konstruktów genetycznych *pro2x35S:GFP-MtABCG40*, co świadczy o dociekliwości i poszukiwaniu rozwiązań problemów badawczych. Ponadto podczas analizy uzyskanych wyników Doktorant zastosował prawidłowe analizy statystyczne (badanie normalności rozkładu badanych prób oraz testy parametryczne i nieparametryczne).

Opracowanie uzyskanych wyników i dyskusja też nie budzi zastrzeżeń. Wyniki ilustrowane są prawidłowo opisanymi i wykonanymi rycinami. Zostały one przedstawione kompaktowo, syntetycznie i jasno usystematyzowane, zakończone poprawnie sformułowanymi wnioskami. **Ta część dysertacji cechuje się wysoką jakością i starannością.** Dyskusja uzyskanych wyników to bardzo istotna część prac naukowych, która najczęściej jest wyzwaniem dla Doktorantów. **Co niezwykle cenne autor zaproponował 2 modele, jeden przedstawiający udział transportera cytokinin MtABCG40 w zmniejszaniu wrażliwości komórek RAM (ang. *root apical meristem*) na cytokininy przy niedoborze azotu w środowisku, co powoduje zmiany w morfologii korzenia tj. wydłużenie korzenia głównego oraz drugi model przedstawiający udział transportera MtABCG40 w negatywnej regulacji inicjacji korzenia bocznego i brodawki korzeniowej.**

#### **Za najważniejsze osiągnięcia naukowe w przedstawionej pracy doktorskiej uznaję:**

- określenie subkomórkowej lokalizacji białka fuzyjnego GFP-MtABCG40 w błonie komórkowej oraz wykazanie, że MtABCG40 (białko należące do rodziny transporterów ABC (ang. *ATP-binding cassette transporters*) u *Medicago truncatula* jest białkiem importującym *trans*-zeatynę [<sup>14</sup>C]tZ, będącą aktywną biologicznie formą cytokinin,
- określenie lokalizacji i poziomu ekspresji *MtABCG40* w organach *Medicago truncatula*,
- wykazanie, że badany gen podlega najsilniejszej ekspresji w korzeniach o obniżonej gęstości korzeni bocznych, mającej miejsce przy niedoborze azotu w środowisku,
- stwierdzenie, że poziom ekspresji *MtABCG40* jest hamowany przez ABA, zaś stymulowany przez 6-BAP co odpowiednio stymuluje lub obniża wzrost gęstości korzeni bocznych u *Medicago truncatula*, nie odnotowano zmian ekspresji *MtABCG40* pod wpływem systemicznych sygnałów brodawkowania,
- zidentyfikowanie dwóch linii roślin z mutacjami w genie *MtABCG40*: NF21323 (*mtabcg40-1*) i NF17891 (*mtabcg40-2*), które charakteryzowały się spowolnieniem wzrostu korzenia głównego z jednoczesnym skróceniem jego RAM oraz się zwiększoną gęstością korzeni bocznych w stosunku do roślin typu dzikiego oraz zmianami ekspresji genów markerowych odpowiedzi komórek na cytokininy i auksyny,
- wykonanie dodatkowej analizy koekspresji *MtABCG40* i pięciu genów biorących udział w aktywacji cytokinin w korzeniu przy braku azotu w środowisku (*MtLOG2*, *MtLOG3*, *MtLOG-podobny 1*, *MtLOG-podobny 3* i *MtLOG-podobny 4*).

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań:

1. Do grupy aktywnych cytokinin, zdolnych bezpośrednio do uruchomienia szlaków sygnałowych komórki, zaliczane są jedynie ich wolne formy - tZ, iP i 6-BAP. Czy na podstawie dostępnych danych literaturowych znane są specyficzne transportery tych aktywnych cytokinin u *Arabidopsis thaliana*? Czy badane przez Pana białko transportuje też iP i 6-BAP? Czy takie badania były wykonywane?

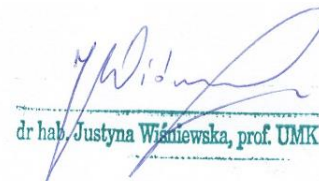


2. Czy istnieją według Pana podobieństwa i różnice w mechanizmie powstawaniu korzenia bocznego i brodawki korzeniowej u roślin?
3. Dlaczego tylko rośliny z rodziny bobowate wytwarzają brodawki korzeniowe?

#### ***Wniosek końcowy***

Nie mam wątpliwości, że w swojej rozprawie **doktorskiej mgr inż. Tomasz Jamruszka** podjął istotny problem badawczy oraz przedstawił w sposób satysfakcjonujący jego rozwiązanie. **Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Tomasza Jamruszki pt. "Analiza funkcjonalna transportera ABCG biorącego udział w negatywnej regulacji gęstości korzeni bocznych i liczby brodawek u *Medicago tuncatula*"** spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003, nr 65 poz. 595, ze zm.) oraz w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Tomasza Jamruszki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**Jednocześnie ze względu na wysoki poziom przedstawionej dysertacji wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Tomasza Jamruszki stosowną nagrodą.**



dr hab. Justyna Wiśniewska, prof. UMK