

Dr hab. Krystyna Winiarczyk  
Zakład Anatomii i Cytologii Roślin  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
20-033 Lublin  
ul. Akademicka 19

Lublin, dnia 14-10-2015r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Bederskiej-Błaszczyk  
pt. „Struktura oraz aktywność wybranych składników systemu antyoksydacyjnego  
brodawek lucerny (*Medicago truncatula* Gaertn.) różniących się efektywnością w  
wiązaniu N<sub>2</sub>”.**

Rozprawa doktorska została zrealizowana na Wydziale Rolnictwa i Biologii w Katedrze  
Botaniki SGGW pod kierunkiem dr hab. Wojciecha Boruckiego.

Biologiczna redukcja azotu atmosferycznego jest istotnym ogniwem w całym cyklu obiegu tego pierwiastka w przyrodzie. Największy udział w wiązaniu azotu na lądzie ma układ rośliny bobowate-ryzobia. Szacuje się, że około 90% gatunków należących do rodziny *Fabaceae* ulega infekcji przez gatunki bakterii należące do rodzaju *Rhizobium*. Rośliny te ze względu na wysoką zawartość białka w nasionach i masie zielonej mają duże znaczenie gospodarcze.

Do nawiązania efektywnej symbiozy, która prowadzi do redukcji azotu atmosferycznego, potrzebne są dwa niezależne organizmy, są to bakterie zdolne do wiązania azotu oraz rośliny, które zapewniają odpowiednie warunki do przebiegu tego procesu. Proces symbiozy jest wieloetapowy, a rozpoczyna się wymianą sygnałów pomiędzy partnerami. Bakterie za pośrednictwem specyficznego morfogenu (czynnika Nod) indukują nowe merystemy korzeniowe, inicjując w ten sposób proces brodawkowania. Brodawka korzeniowa jest unikalnym organem roślinnym łączącym dwa odmienne organizmy – bakterię i roślinę. Bakterie zasiedlające brodawkę redukują azot cząsteczkowy do amoniaku przyswajalnego przez roślinę. Dzięki temu rośliny żyjące w symbiozie z bakteriami mogą rosnąć bez dodatkowego, lub znacznie obniżonego, nawożenia azotowego. Zmniejsza to nie tylko koszty uprawy, ale również korzystnie wpływa na środowisko.



Z powyższego wynika, że uzasadnione było podjęcie przez mgr inż. Magdalenę Bederską-Błaszczuk badań dotyczących struktury brodawek, przemieszczania asymilatów i ich rozdzielania do poszczególnych stref anatomicznych. Dostarczenie brodawkom asymilatów decyduje o ich efektywności wiązania azotu, natomiast wysoki poziom metabolizmu brodawek powoduje tworzenie dużych ilości reaktywnych form tlenu, których nadmiar powinien być skutecznie usuwany przez system antyoksydacyjny. Podjęte w niniejszej pracy badania miały na celu wskazanie pewnych cech strukturalnych oraz właściwości systemu antyoksydacyjnego istotnych dla efektywności brodawek korzeniowych. Znajomość tych zasad może ułatwić prace nad modyfikacją genetyczną roślin i bakterii w celu zwiększenia efektywności brodawek.

### **Ocena formalna**

Przedstawiona do recenzji praca liczy 158 stron tekstu oraz 189 stron dokumentacji fotograficznej wraz z podpisami i objaśnieniami użytych skrótów oraz oznaczeń. Posiada układ typowy dla prac tego typu, z wydzielonymi rozdziałami : wstęp, przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody badań, wyniki i ich omówienie, dyskusja, podsumowanie oraz spis piśmiennictwa. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są prawidłowe.

Wstęp i przegląd literatury dotyczy obiegu azotu w przyrodzie, opisu układów symbiotycznych roślin bobowatych, powstawania brodawek korzeniowych ich anatomii i morfologii. Dużo uwagi poświęcono genetycznym podstawom wiązania azotu, translokacji wody i asymilatów oraz reaktywnym formom tlenu i systemom antyoksydacyjnym w procesach metabolicznych u roślin. Przytoczone dane literaturowe wskazują na fakt, że na efektywność wiązania azotu atmosferycznego przez brodawki korzeniowe w układzie rośliny - ryzobia wpływa wiele czynników genetycznych, biochemicznych, fizjologicznych i strukturalnych. Ta część pracy doktorskiej została napisana w sposób wyczerpujący, wskazujący na dużą wiedzę Doktorantki z tego zakresu.

Cel pracy i zadania badawcze zostały wyodrębnione w oddzielnym rozdziale. W swoich badaniach Autorka analizowała dwa rodzaje brodawek korzeniowych lucerny, które różniły się między sobą aktywnością w wiązaniu azotu atmosferycznego. Na poziomie strukturalnym, fizjologicznym i metabolicznym poszukiwała podobieństw i różnic pomiędzy tymi strukturami.



W rozdziale „Materiał i metody badań” uzasadniono wybór gatunku badawczego i opisano szczegółowo metody stosowane przez Doktorantkę podczas wykonywania poszczególnych etapów badań. Do badań nad efektywnością wiązania azotu atmosferycznego użyto dwóch szczepów bakterii: naturalnie występujących w glebie, które indukują powstanie brodawek w pełni efektywnych (*Sinorhizobium medicae* 419) lub częściowo efektywnych (*Sinorhizobium meliloti* 1021). Jako roślinę doświadczalną użyto gatunek *Medicago truncatula* (z brodawkami niezdeteminowanymi) który posiada status rośliny modelowej do badań nad interakcjami roślina-mikroorganizmy oraz nad składem jakościowym i ilościowym metabolitów wtórnych. Roślina ta rośnie dobrze w warunkach kontrolowanych na różnego rodzaju podłożach, może być uprawiana zarówno na polu, jak i w szklarni czy fitotronie, gdzie może w ciągu roku mieć kilka pełnych cykli rozwojowych. Dzięki wymienionym cechom Doktorantka miała zapewnioną obfitość materiału badawczego. Doświadczenia prowadzono w warunkach laboratoryjnych używając do inokulacji wymienionych powyżej szczepów bakterii. Do realizacji postawionych celów badawczych użyto wielu zarówno tradycyjnych jak i bardzo nowoczesnych metod. Wszystkie metody zostały zastosowane prawidłowo.

W rozdziale „Wyniki i ich omówienie” opisano anatomię brodawek korzeniowych, ich organizację na poziomie ultrastrukturalnym, przemieszczanie się wody i asymilatów w obrębie brodawek oraz przedstawiono analizę ich aktywności oddechowej. Rozdział „Dokumentacja fotograficzna” składa się z 47 biało-czarnych oraz kolorowych tablic, do których dołączono wyczerpujące opisy. Ten rozdział jest poprzedzony listą skrótów i oznaczeń użytych w dokumentacji. Wszystkie tablice są przygotowane bardzo starannie, a zamieszczone fotografie są bardzo dobrej jakości.

W rozdziale „Dyskusja” omówiono i zinterpretowano uzyskane wyniki w świetle najnowszej literatury z tego zakresu oraz sformułowano ogólne podsumowanie uzyskanych rezultatów.

Rozdział zatytułowany „Spis piśmiennictwa” zawiera 469 pozycji, głównie anglojęzycznych oryginalnych prac eksperymentalnych, kilku prac przeglądowych oraz 1 źródła internetowego.

Układ pracy jest właściwy i odpowiedni dla rozpraw o charakterze eksperymentalnym.



## Ocena merytoryczna

W pracy swojej mgr inż. Magdalena Bederska-Błaszczyk porównywała brodawki korzeniowe lucerny cechujące się maksymalną aktywnością w wiązaniu azotu ze szczepami o obniżonej aktywności. Badania prowadzono w aspekcie anatomicznym, fizjologicznym oraz biochemicznym. Rośliny lucerny były zakażane szczepami naturalnie występującymi w glebie. Zastosowano dwa szczepy bakterii różniące się zdolnością do wiązania azotu atmosferycznego. W celu sprawdzenia efektywności badanych szczepów przeprowadzono badania anatomiczne i pomiary morfometryczne brodawek inicjowanych szczepami bakteryjnymi. Zgromadzone, liczne wyniki badań anatomicznych i strukturalnych wskazują, że szczep *S. medicae* WSM 419 efektywnie wiąże azot atmosferyczny, co przekłada się na zwiększoną masę roślin zainfekowanych tym szczepem. Natomiast wykazano, że drugi szczep o niższej aktywności wiązania azotu, indukuje większą liczbę brodawek korzeniowych. Były one równomiernie rozmieszczone na całym systemie korzeniowym, ale wcześniej obserwowano w nich przejawy starzenia i degradacji. Badania anatomiczne brodawek pokazały ich strefową budowę. Na podstawie analizy preparatów mikroskopowych opisano podobieństwa i różnice w budowie i funkcjonowaniu brodawek korzeniowych różniących się zdolnością do wiązania azotu. Wykazano między innymi, że brodawki o mniejszej efektywności posiadały szerszą strefę merystematyczną i przejściową, co według Autorki świadczyć może o zaburzeniach w procesie różnicowania komórek brodawkowych. Natomiast obecność nici infekcyjnych w brodawkach o mniejszej efektywności wskazuje, że infekcja nie zawsze skutkuje rozwojem aktywnych brodawek korzeniowych zdolnych do wiązania azotu. Wykazano, że mniejsza aktywność brodawek jest skorelowana z większym gromadzeniem skrobi w warstwie przejściowej co, zdaniem Doktorantki, świadczy o niższym metabolizmie tych brodawek. W strefie zdolnej do wiązania azotu znajdują się bakteroidy, które występują liczniej w brodawkach o mniejszej efektywności.

Przeprowadzone przez mgr inż. Magdalenę Bederską-Błaszczyk bardzo skrupulatne badania ultrastrukturalne zasługują na szczególne uznanie. Opis wyników doświadczeń został przedstawiony rzeczowo i kompetentnie. Dostarczają one wielu cennych informacji o naturze brodawek korzeniowych, a wykonane elektronogramy są doskonałej jakości. Badania ultrastrukturalne strefy przejściowej brodawek mniej efektywnych wykazały obecność ciał Cajala, co może świadczyć o zaburzeniach w cyklu komórkowym w tej części brodawek. Natomiast obecność licznych, drobnych wakuol w brodawkach efektywnych wskazuje na odpowiedni turgor w komórkach i ich prawidłowy metabolizm. Doktorantka dużo uwagi w swoich badaniach



poświęciła obserwacji stopnia wakuolizacji komórek i stwierdziła, że jest to istotny, ale też bardzo zmienny, wskaźnik rozwojowy. Komórki w strefie wiązania azotu wykazują wysoki stopień wakuolizacji, co według mgr inż. Bederskiej-Błaszczyk może być istotnym parametrem świadczącym o stopniu efektywności brodawek.

Wyższy metabolizm brodawek efektywnych potwierdziły badania ultrastrukturalne komórek strefy infekcji oraz strefy młodej symbiozy. Analiza preparatów mikroskopowych wykazała, że wprawdzie brodawki zainicjowane przez dwa rodzaje użytych do badań szczepów bakterii nie różniły się między sobą pod względem budowy anatomicznej, ale różniły się efektywnością wiązania azotu, aktywnością oddechową lokalizacją ROS/NOS oraz innych wybranych składników systemu antyoksydacyjnego. Za pomocą specyficznych barwień wykazano wyższy poziom metabolizmu komórek w brodawkach mniej efektywnych. Wykazano w nich wyższe stężenie glutationu, co może świadczyć o zaburzeniach równowagi procesów oksydoredukcyjnych w tych komórkach. Zaburzenia homeostazy komórkowej i zmiany potencjału redox w komórce, z kolei zakłócają prawidłowe funkcjonowanie organizmu, powodują zaburzenia transportu związków oraz zmniejszają tempo usuwania produktów metabolizmu komórkowego.

We wnioskach końcowych mgr inż. Magdalena Bederska-Błaszczyk udowodniła dodatnią korelację pomiędzy obecnością tlenu azotu w niciach infekcyjnych a większą efektywnością wiązania azotu w takich brodawkach korzeniowych. Lektura części doświadczalnej pracy pokazuje, że wykonano rzetelny i rozległy zakres badań na podstawie dobrze zazębiających się i logicznie uzupełniających się technik laboratoryjnych. Można przypuszczać, że uzyskane wyniki znajdą zastosowanie aplikacyjne w badaniach zmierzających do zwiększenia efektywności uprawy roślin bobowatych.

Z obowiązku recenzenta chciałam zawrócić uwagę na kilka drobnych niedociągnięć zauważonych przeze mnie w recenzowanej pracy.

Chciałabym uzyskać odpowiedź na pytanie: czy stwierdzenie w rozdziale „Dyskusja” na str. 102 „Średnia powierzchnia liścia posłużyła również za wskaźnik efektywności wiązania azotu” i dalej „Wyraźnie widać tutaj wpływ zaopatrzenia roślin w azot na powierzchni asymilacyjnej”, jest własnym wnioskiem Autorki, czy też są to wskaźniki stosowane w innych pracach.

Na str. 123 Autorka stawia wniosek: „Nie stwierdzono różnic w dystrybucji kwasu askorbinowego w brodawkach częściowo i w pełni efektywnych, co pozwala stwierdzić iż



efektywność w wiązaniu azotu nie jest bezpośrednio skorelowana z poziomem kwasu askorbinowego w komórkach”. Na jakiej podstawie i jaką metodą to stwierdziła, skoro w rozdziale Materiał i metody jest tylko metoda lokalizacji kwasu askorbinowego.

Tablica 17: brak fotografii D, natomiast na fotografii C – mam wątpliwości czy struktura oznaczona „m” to rzeczywiście mitochondrium.

Tablica 21: brak fotografii D, na foto C brak odcinka skalującego

Mam zastrzeżenia co do poprawności terminów: „wzmózone powiększenie” czy „dystrybucja”, który raczej jest używany głównie w naukach ekonomicznych /marketingu. Uważam również należy używać polskich terminów np. użycie skrótu „godz.”, a nie „h” czy „gwiazdka” zamiast „asterisk” .

Wymienione w recenzji uwagi nie wpływają jednak na zasadniczą, wysoce pozytywną ocenę recenzowanej pracy doktorskiej.

#### **Wniosek końcowy**

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Magdalenę Bederską-Błaszczyk zatytułowana **„Struktura oraz aktywność wybranych składników systemu antyoksydacyjnego brodawek lucerny (*Medicago truncatula* Gaertn.) różniących się efektywnością w wiązaniu N<sub>2</sub>”** stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi 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 późniejszymi zmianami), w brzmieniu ustalonym Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. (Dz. U. Nr 84, poz. 455) i wnioskuję do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Magdalena Badurskiej-Błaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi na wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, wnioskuję o nagrodzenie niniejszej dysertacji stosowną nagrodą.

Krzysztof Błaszczuk