



Dr hab. prof. UAM Magdalena Krzesłowska
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, dn. 28.11. 2022 r.

***Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Słupianek, pt.
„Mechanizmy transportu międzykomórkowego w drewnie wtórnym”***

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy nowego obszaru badań związanego z transportem międzykomórkowym w drewnie wtórnym drzew należących do roślin okrytonasiennych. Transport ten obejmuje szlaki (1) z komórek naczyń do komórek miękiszu drzewnego, mających bezpośredni kontakt z naczyniami, tzw. komórki typu VAC (*ang. vessel-associated cell*) oraz (2) między komórkami miękiszu drzewnego czyli przemieszczanie substancji z komórek, typu VAC do komórek, które nie mają bezpośredniego kontaktu z naczyniami, tzw. nonVAC (*ang. non-vessel-associated cell*), oraz między komórkami nonVAC.

Ocena Formalna Pracy

Przedstawiona do oceny praca liczy 163 strony i ma typowy dla rozprawy doktorskiej układ rozdziałów: streszczenie, wykaz stosowanych skrótów, wykaz rycin, tabel i tablic, wstęp, cel pracy i hipotezy badawcze, materiał i metody, wyniki wraz z tablicami, tabelami i schematami, dyskusja, podsumowanie, literatura.

Wstęp liczy 23 strony i jest przeglądem literatury związanej z zagadnieniami podjętymi w niniejszej rozprawie doktorskiej. Co ważne uwzględnia doniesienia z ostatnich lat. Rozdział ten pokazuje znajomość literatury przedmiotu Doktorantki. Zawiera, m.in. omówienie struktury drewna wtórnego drzew, ze szczególnym uwzględnieniem miękiszu drzewnego oraz transportu symplastycznego wraz z budową plasmodesmy. Wstęp zawiera także charakterystykę transportu endocytotycznego: szlaków zależnego i niezależnego od klatryny.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła cel pracy, którym było scharakteryzowanie na poziomach tkankowym, komórkowym i molekularnym dróg transportu międzykomórkowego (pęcherzykowego i symplastowego), w miękiszu drzewnym drewna wtórnego wybranych gatunków drzew liściastych: klonu jaworu (*Acer pseudoplatanus* L.), jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior* L.) oraz mieszańca topoli osiki i topoli amerykańskiej (*Populus tremula* x *tremuloides* Michx.).

Chciałam w tym miejscu zwrócić uwagę, że po pierwsze pęcherzyki także należą do symplastu, protoplastu komórki, więc przy sformułowaniu celu pracy powinna Doktorantka dodać – transportu symplastowego przez plasmodesmy – bo o to tutaj chodziło. Ponadto przy sformułowaniu celu rozprawy brakuje skrótów dotyczących odkrywców poszczególnych gatunków, przy nazwach łacińskich drzew.

W dalszej części rozdziału znajdujemy uzasadnienie podjęcia takiej tematyki badań. Jak pisze Doktorantka, niewiele jest dostępnych informacji w literaturze przedmiotu dotyczących radialnego transportu substancji w obrębie ksylemu, głównie transportu z naczyń do komórek miękiszowych oraz w obrębie miękiszu drzewnego w drewnie wtórnym.

Cel badań realizowano weryfikując postawione hipotezy badawcze, które zakładały, że :

1. transport związków z apoplastu do symplastu w drewnie wtórnym odbywa się na drodze endocytozy,
2. głównym typem endocytozy działającej w drewnie wtórnym jest endocytoza zależna od klatryny,
3. związki pobierane za pośrednictwem endocytozy z naczyń do komórek typu VAC są rozprowadzane między żywymi komórkami drewna szlakiem symplastowym, przez plasmodesmy,
4. udział poszczególnych mechanizmów transportu w pobieraniu i rozprowadzaniu związków w drewnie wtórnym zmienia się sezonowo.

Kolejny rozdział - Materiał i Metody przedstawia w sposób czytelny zastosowane techniki badawcze. Wart podkreślenia jest dobry, szczegółowy opis stosowanych w pracy technik, co z jednej strony pozwala czytelnikowi szybko zorientować się w metodyce badań, z drugiej pozwoli na ewentualne powtórzenie doświadczeń w przyszłości. Chciałam zapytać w tym miejscu o źródło procedury podwójnego znakowania substancji metodą immunogold do mikroskopu transmisyjnego, ponieważ nie znalazłam go w niniejszej pracy. Pytam o to dlatego, że w podobnych doświadczeniach stosowałam procedurę wg Harris and Oparka 1994 (Plant Cell Biology. A Practical Approach) w której dwie substancje w danej próbce znakuje się po kolei, podając najpierw przeciwciało pierwszorzędowe, a następnie drugorzędowe znakujące substancję A, następnie przeciwciało pierwszorzędowe i dalej drugorzędowe znakujące substancję B. W procedurze stosowanej przez Doktorantkę podawano razem, w tym samym czasie, dwa przeciwciała pierwszorzędowe, a następnie razem, dwa przeciwciała drugorzędowe.

Zwróciło moją uwagę również wysokie, bo aż 5% stężenie, GA w utrwalaczu materiału do reakcji immunocytochemicznych. Czy nie ma tu pomyłki, bo często stosowane jest stężenie 0,5%?

I jeszcze jedno pytanie – czy Doktorantka jest pewna, że pędy drzew zanurzone w roztworach barwników pobierały na wysokość 3-5mm roztwory tylko przez naczynia? Czy nie było tu możliwości podsiąkania i wnikania roztworów do apoplastu innych komórek, np. miękiszowych i transportu apoplastycznego tym szlakiem? Czy w jakiś sposób to sprawdzano?

Ocena wartości merytorycznej pracy

Rozdział „Wyniki” obejmuje 66 stron i zawiera dobrze i przejrzysto przedstawione rezultaty przeprowadzonych doświadczeń, zilustrowane, m.in. licznymi mikrografiami, głównie z mikroskopu konfokalnego (LSM), ale też świetlnego ze światłem przechodzącym, fluorescencyjnego i

elektronowego transmisyjnego (TEM), pokazującymi dane jakościowe oraz wykresami ilustrującymi dane ilościowe.

Kolejne podrozdziały „Wyników” pokazują etapy logicznego, przemyślanego i konsekwentnie rozwiązywanego problemu badawczego, w oparciu o przedstawione hipotezy badawcze. W wielu miejscach znajdujemy też wyjaśnienia, dlaczego podjęto przeprowadzenie danych eksperymentów oraz liczbę próbek, na której te eksperymenty wykonano – co bardzo mi się podoba. Atutem tej części rozprawy są także krótkie podsumowania po każdym podrozdziale wyników. Ułatwiają one czytelnikowi analizę otrzymanych rezultatów. Dzięki nim „Wyniki” układają w spójną, ciekawie i przejrzystą opowiedzianą historię transportu substancji w obrębie drewna wtórnego, wybranych gatunków drzew liściastych. Przyznaję, że czytałam ten rozdział z przyjemnością.

Na początku rozdziału „Wyniki” przedstawiono anatomię drewna wtórnego trzech badanych gatunków drzew, ze szczególnym uwzględnieniem komórek miękiszu drzewnego VAC i nonVAC, pokazane w Tablicy 2. Bardzo ładne i czytelne są, moim zdaniem, mikrografie z mikroskopu świetlnego w tej tablicy (Tabl. 2 A-F). Z kolei mikrografie G, H, I w Tabl. 2 przedstawiają ultrastrukturę komórek VAC i nonVAC trzech badanych gatunków drzew w TEM. Doktorantka napisała, że „komórki te charakteryzowała obecność gęstej cytoplazmy z licznymi pęcherzykami, dobrze rozwinięte ER, liczne mitochondria i wakuole”. Tylko sporadycznie obecne były w tych komórkach ziarna skrobi”. Jako biolog komórki roślinnej, pracujący na co dzień z TEM, mam kilka uwag.

- Ultrastruktura komórek VAC jest w miarę dobrze widoczna u klonu jawora - na zdjęciu G. Na pozostałych dwóch zdjęciach H oraz I, które przedstawiają komórki VAC u jesionu, a szczególnie u topoli, trudno zobaczyć struktury wymienione w powyższym opisie, czyli ER, mitochondria, pęcherzyki, nawet po powiększeniu w wersji PDF pracy. Niezbędne, byłoby w tym miejscu zamieszczenie większych mikrografii, o większych powiększeniach, przedstawiających ultrastrukturę komórek VAC, tym bardziej, że to one są głównym przedmiotem dalszych badań.
- Doktorantka napisała o licznych wakuolach w komórkach VAC. Zasadniczo, w komórkach zróżnicowanych, do których należą komórki miękiszu drzewnego, występuje jedna centralnie ułożona wakuola. Musimy pamiętać, że w TEM oglądamy jedynie ultracienki skrawek, przeciętnie o grubości 70nm, a nie komórkę 3D, która ma kilka μm średnicy. Dlatego, trzeba zachować ostrożność w interpretacji obrazów z TEM. Wrażenie licznych wakuol, może wynikać z różnego kształtu/architektury wakuoli na różnych poziomach komórki i uzyskanego przekroju. Jak różną morfologię może mieć wakuola na różnych poziomach komórki świetnie pokazują rekonstrukcje 3D wakuol uzyskane techniką SBF SEM (ang. *Serial Block Face Scanning Electron Microscope*), np. w pracy Scheuring et al. 2016 PNAS, 113, pp. 452–457). Ponadto, w nomenklaturze międzynarodowej, wakuolę na mikrografiach, oznacza się jako V, a nie W - jak oznaczono w pracy.
- Doktorantka napisała też o nielicznych ziarnach skrobi w komórkach VAC, a moim zdaniem ziarna skrobi – tak naprawdę amyloplasty, są całkiem spore na przekrojach komórek jesionu i topoli. Faktycznie, nie widać ich w komórce klonu jawora, ale to tylko ultracienki przekrój przez komórkę.

- Myślę, że przydałaby się także mikrografia, o większym powiększeniu, jamki kontaktowej - podobnie jak pokazano jamki proste z plazmodesmami.
- Bardzo podoba mi się natomiast to, że podano liczbę analizowanych próbek w TEM. Zwiększa to niewątpliwie wiarygodność otrzymanych wyników.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę żywotności komórek miękiszu drzewnego w trzech badanych gatunkach drzew. Wszystkie komórki miękiszowe były żywe. Zamieszczone mikrografie z mikroskopu fluorescencyjnego potwierdzają też wcześniejsze obserwacje, z mikroskopu świetlnego ze światłem przechodzącym, że najczęściej miękiszu zawierało drewno klonu jawora, mniej jesionu, a zdecydowanie najmniej topoli. Widać to tutaj bardzo wyraźnie.

W kolejnej serii doświadczeń weryfikowano hipotezę 1 i pokazano, że transport substancji (w doświadczeniach były to barwniki 3 TR i 10 TR oraz FM4-64 i FM 1-43), ze światła naczyń, czyli z apoplastu, do protoplastu komórek miękiszowych VAC, może odbywać się na drodze endocytozy. Wyniki te potwierdzono stosując inhibitory endocytozy takie jak, np. Brefeldynę A (BFA). Ponieważ odkryto ten szlak u wszystkich badanych gatunków drzew, można sądzić, że pobieranie endocytotycznych substancji z naczyń do komórek miękiszowych kontaktujących się z naczyniami, czyli VAC, jest dość **powszechną drogą transportu substancji w drewnie wtórnym u roślin okrytonasiennych. Moim zdaniem, jest to wynik bardzo cenny, ponieważ ten szlak transportu z naczyń do żywych komórek miękiszowych VAC, pokazano po raz pierwszy.** Co więcej, Doktorantka potwierdziła ten wynik stosując inhibitory transportu pęcherzykowego takie jak BFA oraz dokumentując charakter powstałych agregatów immunolokalizacją wakuolarną H^+ -ATP-azy. Z kolei obecność barwników TR i FM w komórkach nonVAC sugeruje ich przemieszczanie pomiędzy komórkami miękiszowymi symplastem, przez plazmodezmy. Barwnik TR znajdowano też w jamkach kontaktowych (wyraźnie widoczne na załączonych mikrografiach) jak i w jamkach prostych – widoczne słabiej, a na zdjęciu K w Tabl.4 w miejscu jamki prostej, które wskazuje strzałka żółta nie widać wcale zabarwienia. Z kolei barwniki typu FM pokazano tylko w jamkach prostych - choć jest to słabo widoczne na załączonych mikrografiach. Przydałyby się duże powiększenia tych miejsc.

Niemniej jednak, chciałam zapytać w jaki sposób zdaniem Doktorantki barwniki, pobrane na drodze endocytozy przez komórki VAC z naczyń, czyli zlokalizowane w pęcherzykach i strukturach systemu błon wewnętrznych, przedostały się do plazmodesm zlokalizowanych w jamkach prostych, łączących komórki VAC z komórkami nonVAC – może Doktorantka zaproponuje inną koncepcję niż sugerowana w dyskusji? I drugie pytanie - jak Doktorantka sądzi, czy barwniki te z komórek VAC do nonVAC mogły także przedostawać się na drodze endocytozy (np. po wcześniejszej egzocytozie z komórek VAC do ścian komórkowych)?

W kolejnym etapie badań, weryfikując hipotezę 2, pokazano, że za transport pomiędzy światłem naczyń, a komórkami VAC w znacznym stopniu odpowiedzialna jest endocytoza zależna od klatryny. Klatrynę zidentyfikowano na podstawie reakcji immunocytochemicznej na poziomie mikroskopu konfokalnego, w błonie komórkowej, cytoplazmie komórek VAC i nonVAC drewna wtórnego wszystkich badanych gatunków drzew oraz w jamkach prostych łączących komórki miękiszu drzewnego u klonu jawora i topoli. Jednakże w reakcji immunogold na poziomie TEM w drewnie wtórnym topoli, klatrynę zlokalizowano tylko na terenie cytoplazmy, a nie zlokalizowano na terenie jamek prostych i plazmodesm (Tabl. 19). Czy Doktorantka mogłaby to wyjaśnić.

Z kolei fakt kolokalizacji barwników pobieranych endocytotycznie FM4-64FX oraz 3TR z występowaniem klatryny, zidentyfikowanej immunocytochemicznie, potwierdza bardzo

wyraźnie udział endocytozy zależnej od klatryny (CME) w transporcie z naczyń do komórek miększu drzewnego typu VAC.

Jak wspomniano immunodetekcja w LSM białek klatrynowych wykazała ich obecność w błonie komórkowej, cytoplazmie oraz w jamkach prostych komórek miększu drzewnego badanych gatunków drzew, a nie wykazała na terenie jamek kontaktowych. Stąd powstaje pytanie – którędy odbywa się zdaniem Doktorantki endocytotyczny transport barwników FM4-64, FM1-43 oraz 3TR i 10TR z naczyń do komórek VAC. Rozumiem, że jamki kontaktowe nie biorą w tym udziału. Wynika z tego kolejne pytanie - jaka jest zatem funkcja jamek kontaktowych występujących pomiędzy naczyniami, a komórkami miększowymi typu VAC?

Z drugiej strony barwnik 10TR lokalizowano na terenie jamek kontaktowych. Według niektórych źródeł, cytowanych również przez Doktorantkę w niniejszej rozprawie, (Gao i wsp. 2016 Scientific Reports | 6:35179 | DOI: 10.1038/srep35179 “Texas red-conjugated dextran, a marker of fluid phase uptake (Fig. 3e), suggesting that its uptake may also involve in part a macropinocytic pathway”) barwniki TR są markerami endocytozy fazy płynnej (pinocytozy). Jak Doktorantka sądzi - czy skoro 10TR był obecny na terenie jamek kontaktowych, ten typ transportu może zachodzić na terenie tych jamek, mimo że doświadczenie z wykorzystaniem innego markera pinocytozy, LYCH, którego wyniki zamieszczono w niniejszej rozprawie, nie potwierdziły występowania tego typu transportu pomiędzy naczyniami, a komórkami VAC?

Kolejnym dowodem na występowanie transportu endocytotycznego zależnego od klatryny pomiędzy komórkami naczyń i komórkami miększu drzewnego drewna wtórnego typu VAC, było zastosowanie barwnika FM4-64FX wraz z inhibitorami endocytozy zależnej od klatryny. Chciałabym podkreślić w tym miejscu, że **określenie rodzaju endocytozy, jako CME, odpowiedzialnej w znacznym stopniu za transport z naczyń do komórek VAC, to kolejny cenny wynik niniejszej rozprawy doktorskiej. Co więcej doświadczenia te pokazały, że transport barwnika FM4-64FX z naczyń do komórek VAC nie został całkowicie zablokowany przez inhibitory endocytozy klatrynozależnej, a więc CME nie była jedyną drogą transportu substancji z naczyń do komórek VAC w drewnie wtórnym badanych gatunków drzew liściastych.**

W tym miejscu zwrócił moją uwagę, na wykresach C, D w Tabl. 10, brak słupka obrazującego inhibicję pobierania FM4-64FX z naczyń do komórek VAC po zastosowaniu wortmaniny. Z związanych mikrografii natomiast wynika, że wortmanina działała niemal równie silnie jak IKA.

Następnie sprawdzono czy funkcjonuje mechanizm transportu substancji niezależny od klatryny, związany z obecnością mikrodomen błonowych. Wykonano immunodetekcję flotyliny, białka charakterystycznego dla mikrodomen błonowych i wykazano jej występowanie, przede wszystkim w komórkach typu VAC. Niemniej, moim zdaniem, na mikrografiach widoczna jest też flotylina w kilku komórkach nonVAC. Doktorantka napisała, że flotylina w komórkach VAC była obecna w błonie komórkowej, co jest naturalne, oraz na terenie cytoplazmy. Niemniej, tak naprawdę, dokładną lokalizację flotyliny w komórkach, byłoby lepiej widzieć na zdjęciach z TEM, w reakcji immunogold. Zdaję sobie jednak sprawę, że w ramach doktoratu nie da się zrobić wszystkiego, a lokalizacja flotyliny nie była głównym zadaniem w tej pracy.

W dalszych doświadczeniach stwierdzono ponadto, że transport wielkocząsteczkowych związków, takich jak zastosowany w doświadczeniach BSA połączony z Alexa 647, był transportowany z naczyń do komórek VAC, ale drogą inną niż endocytoza zależna od klatryny i nie był transportowany do komórek nonVAC.

Cennym osiągnięciem tej części pracy jest pokazanie, że substancje mogą być transportowane z komórek naczyń do komórek miękiszu drzewnego typu VAC innymi drogami, niż endocytoza zależna od klatryny. Można się tego oczywiście spodziewać, niemniej przeprowadzone doświadczenia pokazują to jednoznacznie.

W kolejnej części pracy Doktorantka napisała „Wcześniejsze wyniki sugerują możliwość współdziałania i współzależności różnych mechanizmów w procesie transportu związków do komórek typu VAC w drewnie wtórnym. Aby zweryfikować, czy na intensywność transportu pęcherzykowego mogą wpływać funkcjonujące na granicy apoplast/symplast transportery błonowe, zastosowano inhibitor transporterów anionów organicznych –probenecid.” Wyniki badań dały odpowiedź negatywną. Chciałam zapytać jak Doktorantka zakładała, w jaki sposób transportery błonowe mogłyby wpływać na endocytozę klatrynozależną?

Bardzo interesujące są wyniki kolejnego doświadczenia przeprowadzone przez Doktorantkę z wykorzystaniem techniki FRAP, które jednoznacznie pokazało, że istnieje transport substancji, w tym przypadku barwnika FM4-64FX, pomiędzy komórkami miękiszu drzewnego.

Z kolei potwierdzenie obecności plazmodesm w jamkach prostych pomiędzy komórkami nonVAC miękiszu drzewnego, poprzez immunodetekcję kalozy, nie było moim zdaniem konieczne, ponieważ doktorantka pokazała plazmodesmy w tych jamkach, bardzo wyraźnie wcześniej, na mikrografiach z TEM w Tabl. 2 J,K). Z kolei w Tablicy 18, ilustrującej wynik immunodetekcji kalozy w plazmodesmach na poziomie mikroskopu konfokalnego, przydałby się obraz plazmodesmy ze światła przechodzącego, tak jak Doktoranta robiła to na wcześniejszych tablicach.

Mikrografie jednocześnie przeprowadzonej immunodetekcji wielkocząsteczkowego białka 3TR i klatryny na poziomie TEM sugerują, że pęcherzyki opłaszczane klatryną są zaangażowane w transport wielkocząsteczkowego barwnika 3TR na terenie cytoplazmy komórek mięksiszowych drewna wtórnego jesionu i topoli. Rzeczywiście tę kolokalizację ładnie widać na mikrografiach z TEM. Niemniej, moim zdaniem, należy być ostrożnym z interpretacją tego wyniku. Utrwalanie chemiczne do reakcji immunogold powoduje, że błony biologiczne w komórce praktycznie nie zostają zachowane. Klatryna to białko opłaszczające błony pęcherzyków. Ponieważ błony pęcherzyków nie są widoczne, w niektórych miejscach, cząstki złota identyfikujące klatrynę, wyglądają jak cargo pęcherzyków – a może to być, np. widok z góry na pęcherzyk. Aby jednoznacznie potwierdzić prawdziwość tego wyniku, można by w przyszłości zastosować technikę High Pressure Freezing Freeze Substitution (zamrażania z podstawianiem), która pozwala na zachowanie błon biologicznych i przeprowadzenie reakcji immunogold na tych samych preparatach. Mam nadzieję, że technika ta będzie niedługo dostępna w Poznaniu – zapraszam więc na nasz Wydział.

Barwnik 3TR jednak wykryto także na terenie jamek prostych, ale w tym rejonie nie wykazano kolokalizacji z białkami klatrynowymi. Pojawia się ponownie pytanie - jak 3TR dostał się do plazmodesmy? Wydaje się mało prawdopodobne, aby 3TR wydostał się pęcherzyków opłaszczonych klatryną. A może to ta część 3TR, która dostała się do komórki inną drogą transportu, np. w wyniku endocytozy fazy płynnej przez jamki kontaktowe, niezależną od klatryny, o której wspominałam wcześniej? Jak Doktorantka sądzi?

Ciekawe są również odnotowane sezonowe prawidłowości w transporcie radialnym barwnika FM4-64FX u badanych gatunków drzew pomiędzy naczyniami drewna wtórnego i komórkami VAC, z VAC do nonVAC i pomiędzy komórkami nonVAC.

U klonu jawora oraz topoli najintensywniejszy transport radialny występował w lecie, u jesionu pod koniec lata. U wszystkich gatunków transport ten był najmniej intensywny zimą, a wiosną spadał w czasie przymrozków, co pokazuje, że nie tylko sezon ale i temperatura mają wpływ na radialny transport substancji, głównie z naczyń do komórek VAC.

Sprawdzono także udział endocytozy zależnej od klatryny podczas całego roku w aspekcie zmian sezonowych, stosując inhibitor tego rodzaju endocytozy TA23. Pokazano, że u klonu jawora endocytoza zależna od klatryny odgrywa najbardziej istotną rolę w transporcie z naczyń do komórek VAC latem, u jesionu zimą, wiosną i latem, natomiast u topoli inhibitor endocytozy klatrynozależnej (CME) nie ograniczał transportu tym szlakiem, co może wskazywać, że ten gatunek drzewa jest mniej wrażliwy na zastosowany inhibitor. Moim zdaniem to również bardzo ciekawe wyniki.

Z kolei na podstawie badania aktywności genów kodujących (1) ciężki i lekki łańcuch białek klatrynowych - związanych z CME (2) remoryn, białek charakterystycznych dla tratw lipidowych, występujących także w plazmodesmach i związanych z endocytozą niezależną od klatryny (CIE) oraz (3) transporterów sacharozy u topoli metodą RT PCR pokazano, że geny kodujące łańcuchy klatryny znajdowały się na podobnym poziomie aktywności przez cały rok. Wyniki te sugerują, że w drewnie wtórnym topoli transport tym szlakiem nie wykazuje zmian sezonowych, natomiast silna ekspresja genów kodujących remoryny latem, pokazała że intensywność szlaku transportu CIE, silnie wzrasta o tej porze roku. Również transportery sacharozy wykazywały silniejszą ekspresję wiosną i latem.

Uważam, że pokazanie odmiennej aktywności różnych szlaków transportowych, w zależności od sezonu, jest także bardzo cennym wynikiem niniejszej rozprawy doktorskiej.

Kolejny rozdział - podsumowanie wyników i wnioski - jest tak naprawdę głównie podsumowaniem wyników. Trochę zabrakło mi w tym miejscu ostatecznej konkluzji, może schematu obrazującego, podsumowującego całość otrzymanych wyników.

Dyskusja jest przeprowadzona poprawnie, z uwzględnieniem pozycji literaturowych z ostatnich 4 lat. Sformułowane wnioski są adekwatne do uzyskanych wyników. W dyskusji omówiono najszerzej i słusznie najciekawsze osiągnięcia niniejszej rozprawy, czyli endocytozę jako szlak transportu pomiędzy apoplastem i symplastem w drewnie wtórnym oraz udział endocytozy klatrynowej i niezależnej od klatryny w tym procesie. Nie do końca przekonuje mnie jednak wyjaśnienie zasugerowane przez Doktorantkę, że „wielkocząsteczkowe związki, po internalizacji z naczyń do komórek typu VAC, zostają wbudowane w system endomembranowy, a następnie przetransportowane do sąsiadujących komórek **przez desmotubulę obecną w PD**”. Myślę, że wyjaśnienie tej bardzo intrygującej kwestii wymaga dalszych badań.

Mam też kilka innych uwag do tego rozdziału. Moim zdaniem w dyskusji znajdujemy trochę za dużo powtórzeń z rozdziału „Wyniki” i raczej też nie powinno się przytaczać tutaj tablic, figur i schematów pokazanych w rozdziale „Wyniki”. Początek dyskusji pasuje bardziej do wstępu.

Na koniec jeszcze drobne uwagi techniczne. Doktorantka pisze w jednych miejscach klon jawor, w innych tylko klon lub tylko jawor. Oczywiście klon jawor to *Acer pseudoplatanus*, ale może bardziej elegancko byłoby zachować spójne nazewnictwo w całej pracy. W streszczeniu znajdujemy takie zdanie: „komórki typu VAC są zdolne do internalizacji substancji transportowanych **w martwych elementach** przewodzących na drodze endocytozy zarówno zależnej, jak i niezależnej od klatryny”. Powinno być **z martwych** elementów przewodzących, w tym przypadku literówka ma dość istotne znaczenie. Oraz drugie stwierdzenie również zawarte w

streszczeniu – „wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowią pierwszy dowód na funkcjonowanie endocytozy, czyli **nowego** mechanizmu transportowego działającego w drewnie wtórnym drzew liściastych”. Endocytoza nie jest generalnie nowym mechanizmem, bo znanym od wielu lat w komórkach roślinnych - jest natomiast po raz pierwszy odkrytym i opisanym przez Doktorantkę - jako szlak transportu substancji z naczyń do komórek VAC w drewnie wtórnym drzew liściastych.

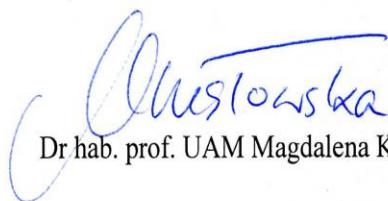
Chciałabym jednak w tym miejscu raz jeszcze podkreślić, że oprócz tych wymienionych przeze mnie potknięć w tekście, niniejsza rozprawa doktorska jest pięknie napisana stylistycznie i praktycznie bez błędów literowych.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani Mgr Aleksandry Słupianek spełnia wszystkie wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 3. 07. 2018 (Dz.U. poz. 1669) i wnioskuję do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani Mgr Aleksandry Słupianek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Chciałabym podkreślić, że wysoko oceniam przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską pani mgr Aleksandry Słupianek, zarówno pod względem koncepcji, jak i wartości merytorycznej. Podjęte przez Doktorantkę badania są niewątpliwie nowatorskie, uzyskane wyniki wartościowe, a wiele z nich jest nowych dla Nauki. Doktorantka po raz pierwszy pokazała, że endocytoza jest jedną z dróg transportu substancji na granicy apoplast/symplast w drewnie wtórnym drzew liściastych – konkretnie z naczyń drewna wtórnego (apoplast), do komórek miękiszu drzewnego sąsiadujących z naczyniami (symplast), czyli komórek VAC. Ponadto Doktorantka zidentyfikowała typ endocytozy – jako endocytozę zależną od klatryny, a także stwierdziła istnienie transportu z naczyń do komórek VAC niezależnego od klatryny, a związanego z występowaniem mikrodomen błonowych. Zostało to, moim zdaniem, pokazane bardzo czytelnie i sprawdzone wieloma technikami. Wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej p. mgr Aleksandry Słupianek pokazały także, że dalszy transport radialny, tzn. z komórek VAC do komórek nonVAC oraz pomiędzy komórkami nonVAC, w drewnie wtórnym, zachodzi szlakiem symplastowym, przez plazmodesmy. Wskazują na to, m.in. wyniki doświadczeń uzyskanych techniką FRAP, jak i znakowanie techniką immunogold cząsteczek barwnika 3TR, który pobrany przez naczynia został przetransportowany endocytotycznie z naczyń do komórek miękiszu drzewnego VAC, a następnie transportem symplastycznym przez plazmodesmy (również pokazane w reakcji immunogold) pomiędzy komórkami miękiszu drzewnego. Wartościowe są również wyniki pokazujące sezonowość intensywności transportu w drewnie wtórnym badanych drzew liściastych. Na koniec chcę podkreślić raz jeszcze, że rozprawa jest napisana bardzo starannie i poprawnie stylistycznie. Oczywiście nowe dla Nauki wyniki prowokują zadawanie licznych pytań, które zawarłam w swojej recenzji, ale to zupełnie naturalne. Moje uwagi nie obniżają jednak rangi otrzymanych przez Doktorantkę wyników, z których te moim zdaniem najciekawsze, dotyczące endocytozy jako szlaku transportu pomiędzy naczyniami, a komórkami mięksiszowymi typu VAC w drewnie wtórnym drzew

liściastych, zostały opublikowane przez mgr Aleksandrę Słupianek w New Phytologist, 222(4), 1846-1861, 2019, w artykule, w którym jest ona jest pierwszym autorem. Dodam, że praca ta otrzymała Nagrodę Główną PTBER w 2020r - w kategorii najlepsza praca oryginalna. Biorąc pod uwagę ww. osiągnięcia, wartość merytoryczną otrzymanych wyników, wnioskuję też o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani Mgr Aleksandry Słupianek stosowną nagrodą.



Dr hab. prof. UAM Magdalena Krzesłowska