Dr hab. Ireneusz Ślesak
prof. Instytutu Fizjologii Roślin
im. Franciszka Górskiego PAN
w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Eckstein zatytułowanej:

„Regulacja przemieszczeń chloroplastów w roślinach wyższych. Interakcje szlaków sygnałowych indukowanych przez światło i auksyny"

Wśród procesów zaliczanych do ruchów wewnątrzkomórkowych w komórce roślinnej, fotoindukowane zmiany położenia chloroplastów stanowią odrębną, niezmiernie ciekawą grupę zjawisk. Zdolność chloroplastów do fototranslokacji została opisana już w 1856 r. Jednakże systematyczne studia nad tym zjawiskiem rozpoczęły się dopiero w XX w. i są kontynuowane do dzisiaj. Dotychczas prowadzone badania pozwoliły rozszerzyć listę glonów i roślin, u których stwierdzono tego rodzaju ruchy wewnątrzkomórkowe oraz w znacznym stopniu rozszyfrować ich molekularny mechanizm.

OPIS FORMALNY PRACY DOKTORSKIEJ

Recenzowana rozprawa zawiera 114 stron maszynopisu i jest napisana w formacie typowym dla prac doktorskich. „Spis treści" poprzedza 2-stronicowy „Wykaz skrótów" i „Streszczenie". „Wykaz skrótów" ułatwia Czytelnikowi pełne zrozumienie tekstu, który bardzo obficie jest naszpikowany rozmaitymi skrótami nazw genów, białek, inhibitorów itp. "Streszczenie" zwięźle przedstawia tematykę pracy oraz uzyskane wyniki i jest dobrym wprowadzeniem do bardziej szczegółowych rozważań przedstawionych w dalszych częściach rozprawy. Obszerny „Wstęp" (27 stron) ma charakter aktualnego przeglądu literatury, który pozwala zapoznać się z dwoma podstawowymi zagadnieniami przedstawionymi w rozprawie, czyli szczegółowym opisem fotoindukowanych ruchów chloroplastów w układzie „od receptora do efektora" oraz mechanizmem działania auksyn. Następnie jest rozdział „Cele pracy", po którym następuje opis zastosowanych materiałów i metod. Kolejne rozdziały to opis uzyskanych wyników oraz ich dyskusja, przeprowadzona w oparciu o dane literaturowe. Właściwą część pracy kończy „Podsumowanie" i obszerna, bo licząca ponad 350 pozycji literaturowych „Bibliografia". Rozprawę uzupełnia „Dodatek", który zawiera zestawienie stosowanych odczynników, opis pasty lanolinowej użytej do aplikacji auksyn i inhibitorów ich transportu, wykaz starterów do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, opis parametrów reakcji PCR oraz skład buforów zastosowanych w elektroforezie denaturującej (SDS-PAGE).

OPIS MERYTORYCZNY ROZPRAWY

Obecnie uważa się, że fotoindukowane ruchy chloroplastów są zjawiskiem dość powszechnym w świecie roślin i obok ruchów wzrostowych (tropizmów) i tzw. ruchów helitropowych liści, stanowią kluczową adaptację o charakterze fizjologicznym na zmieniające się natężenie i kierunek padania światła słonecznego na roślinę. Zatem, indukowane światłem ruchy chloroplastów są jednym z podstawowych mechanizmów, który pozwala zoptymalizować proces absorpcji światła przez aparat fotosyntetyczny, a tym samym mają istotne znaczenie w regulacji intensywności fotosyntezy. Z kolei auksyny, a zwłaszcza ich podstawowa forma fizjologiczna, czyli kwas indolilooctowy (IAA), pełnią kluczową rolę regulacyjną w procesach wzrostu i rozwoju roślin na poziomie komórek i tkanek. Stąd próba znalezienia powiązań pomiędzy auksynami, a fotoindukowanymi ruchami chloroplastów wydaje się całkowicie słuszna i otwiera nowe, dotychczas niezbadane, pole badań w fizjologii i biologii molekularnej roślin.

"Wstęp" i "Cele pracy"

W prezentowanej pracy Autorka postanowiła sprawdzić rolę auksyn w indukowanych światłem niebieskim ruchach chloroplastów. Do tego celu użyła trzech gatunków roślin: rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), tytoniu (*Nicotiana tabacum)* i trzykrotki (*Tradescantia albiflora*). Wybór taki nie był przypadkowy, a wynikał z kilku kluczowych faktów: 1) we wszystkich trzech gatunkach fotoindukowane ruchy chloroplastów zostały juz wcześniej opisane, 2) *N. tabacum* i *T. albiflora* ze

względu na swoją morfologię umożliwiały wykonanie eksperymentów z odcięciem wierzchołka wzrostu pędu (tzw. dekapitację) oraz z egzogennym podawaniem auksyn lub inhibitorów ich transportu, 3) dla *A. thaliana* dostępna jest spora grupa tzw. mutantów auksynowych, u których zaburzona jest szeroko rozumiana homeostaza auksynowa. Ponadto, *A. thaliana* jest gatunkiem modelowym w biologii roślin o najlepiej rozpoznanym mechanizmie ruchu chloroplastów i metabolizmie auksyn. Wybór takich, a nie innych gatunków roślin świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki.

W pierwszej części „Wstępu" zostały przedstawione najnowsze dane na temat indukowanego światłem niebieskim mechanizmu ruchu chloroplastów wg schematu od fotoreceptorów, jakimi są fototropiny 1 i 2 (PHOT1 i PHOT2), aż po aktyno-miozynowy układ efektorowy. Następnie omówione są szlaki transdukcji sygnału wraz z zaangażowanymi w nie białkami i tzw. wtórnymi przekaźnikami sygnału. Właściwie jedyną drobną uwagą jaką można tutaj zgłosić jest nie do końca jasny powód umieszczenia właśnie owych szlaków transdukcji sygnału pod sam koniec omawiania zjawiska fototranslokacji chloroplastów. Przecież w generalnym schemacie transdukcji dowolnego bodźca, szlak transdukcji sygnału, wraz z zaangażowanymi w ten proces białkami/wtórnymi przekaźnikami sygnału, poprzedza w czasie aktywację danego układu efektorowego. Bardzo dobrym pomysłem, podsumowującym przegląd najnowszej wiedzy na temat ruchu chloroplastów, było przedstawienie tego zjawiska w powiązaniu z innymi szlakami sygnałowymi w komórce roślinnej. Podkreślono, że rola fitohormonów, poza pojedynczymi doniesieniami wskazującymi na udział kwasu abscysynowego (ABA) w tym procesie, nie została dotychczas rozpoznana.

Kolejna część pracy bardzo obszernie przedstawia Czytelnikom najnowszą wiedzę na temat metabolizmu i mechanizmu działania auksyn w roślinach. Szlaki metaboliczne, w które zaangażowane są auksyny, również opisano w szerszym kontekście ekofizjologicznym. Szczególną uwagę zwrócono na fototropizm i ruchy aparatów szparkowych, które oprócz tego, że regulowane są przez poziom auksyn to, podobnie jak ruchy chloroplastów, zależą od bodźca jakim jest światło niebieskie. Ponadto podkreślono, że auksyno-zależna polarność komórek i tkanek, obecność wspólnych wtórnych przekaźników sygnału dla wielu auksyno-zależnych szlaków transdukcji sygnału i fotoindukowanych ruchów chloroplastów oraz oddziaływania auksyn z cytoszkieletem aktynowym sugerują, że auksyny mogą być również zaangażowane w fototranslokacje chloroplastów. Szkoda, że Doktorantka nie wyodrębniła tych informacji, jako ostatni podrozdział "Wstępu" zatytułowany np. *"Przypuszczalne interakcje pomiędzy szlakami transdukcji sygnału dla auksyn i ruchów chloroplastów"* lub podobnie. Niemniej jednak, podanie kilku kluczowych przesłanek, które mogą łączyć auksyny z fototranslokacjami chloroplastów uznaję za bardzo dobry pomysł, który w miarę płynnie wprowadza Czytelnika do następnego rozdziału pt. "Cele pracy", przez co stają się one bardziej zrozumiałe. Warto podkreślić, że czytanie ze zrozumieniem przeglądu literatury, jakim *de facto* jest „Wstęp", znacznie ułatwiały ilustracje (ryc. 1-4), zwłaszcza, gdy np. opisywane były skomplikowane szlaki odpowiedzi na auksyny.

"Materiały i metody"

Rozdział ten został napisany w sposób przejrzysty i zwięzły. Na szczególną pochwałę, podobnie jak w przypadku „Wstępu", zasługuje strona ilustracyjna. Ryciny 5-6 ułatwiały zrozumienie, jakie parametry ruchu chloroplastów były mierzone oraz jak wyglądał schemat jednego z podstawowych eksperymentów przedstawionych w rozprawie.

"Wyniki", "Dyskusja" i "Podsumowanie"

Zgodnie z obowiązującym w fizjologii roślin poglądem auksyny produkowane są głównie w obrębie merystemu stożka wzrostu pędu. Eksperyment z dekapitacją wykazał zahamowanie fotoindukowanego ruchu chloroplastów w stosunku do roślin kontrolnych, czyli z nieodciętym wierzchołkiem pędu. Rezultat ten stanowił mocną przesłankę za istotną rolą auksyn w przemieszczaniu się chloroplastów i stanowił punkt wyjścia do dalszych badań. Potencjalny wpływ auksyn na ruch chloroplastów dodatkowo potwierdziły eksperymenty z egzogennym podaniem auksyn: kwasu indolilooctowego (IAA) i kwasu naftylooctowego (NAA) w miejscu odciętego wierzchołka pędu. W wyniku takiego zabiegu zarówno kinetyka, jak i amplituda reakcji ruchowej chloroplastów została przywrócona do stanu takiego jak w roślinach kontrolnych. W kolejnym eksperymencie aplikowano w rejon podwierzchołkowy pędu inhibitory wypływu auksyn z komórki, które miały w zamyśle imitować

sytuację z odciętym merystemem wierzchołkowym. W tym wypadku wyraźne zahamowanie ruchu chloroplastów zaobserwowano dla jednego inhibitora (kwas 2,3,5-trijodobenzoesowy, TIBA) w przypadku *T. albiflora* oraz słabszy efekt zahamowania reakcji ruchowej dla innego inhibitora (kwas 1-*N*-naftyloftalamowy, NPA) w odniesieniu do *N. tabacum*. Ważnym uzupełnieniem tych doświadczeń było określenie realnej zawartości szerokiego wachlarza fitohormonów w liściach *N. tabacum* po dekapitacji oraz egzogennym podaniu IAA i inhibitorów jej wypływu z komórki. Okazało się, że zawartość IAA w liściach roślin zdekapitowanych oraz traktowanych IAA i inhibitorami transportu auksyn była znacznie wyższa niż w liściach z roślin kontrolnych. W kontekście rezultatów, gdzie dekapitacja hamowała ruch chloroplastów, a egzogenny IAA ten ruch przywracał, taki zaskakujący wynik dał Doktorantce ważny sygnał, że poziom IAA nie jest bezpośrednio zaangażowany w ruch chloroplastów. Dodatkowe eksperymenty wykluczyły też efekt zranienia, wynikający z dekapitacji pędu, na fototranslokacje chloroplastów. Dyskusja tej części rezultatów została zrobiona wszechstronnie, a przede wszystkim z krytycznym spojrzeniem na wyniki własne. Na uznanie zasługuje wysunięcie oryginalnej hipotezy, że przy braku merystemu wierzchołkowego, to liście mogą przejąć funkcje głównego producenta IAA. Ta część pracy pokazuje też, iż w badaniach liczy się pomysł i dobrze zaplanowany eksperyment. W tym wypadku stary układ doświadczalny, bo jeszcze z lat 30-dziestych ubiegłego wieku, który dotyczył badań dominacji wierzchołkowej i roli auksyn w tym procesie, z powodzeniem zaprzęgnięto do badań nad rolą auksyn w ruchach chloroplastów.

W kolejnej części Doktorantka sprawdziła czy bezpośrednia ekspozycja tkanek liścia na IAA wpłynie na ruch chloroplastów m. in. poprzez interakcję z cytoszkieletem aktynowym. Jako układ eksperymentalny wykorzystano liście *A. thaliana* (typ dziki) oraz rośliny transgeniczne z odpowiednio wyznakowanym cytoszkieletem aktynowym. Uzyskane wyniki pokazały, że IAA nie ma bezpośredniego wpływu na fototranslokacje chloroplastów, chociażby poprzez brak jakichkolwiek zmian w architekturze cytoszkieletu aktynowego. Skoro dodatkowe doświadczenia potwierdziły brak bezpośredniego wpływ auksyn na ruch chloroplastów, to założono, że być może ich transport i zmiany stężenia w dłuższym przedziale czasu były odpowiedzialne za efekty obserwowane w doświadczeniach dekapitacyjnych. W celu przetestowania tej hipotezy Doktorantka zastosowała kilka inhibitorów transportu auksyn oraz tzw. antyauksynę, które rośliny pobierały dokorzeniowo w kulturach *in vitro*. Wyraźne działanie hamujące ruch chloroplastów stwierdzono dla jednego z inhibitorów dokomórkowego transportu auksyn kwasu 2-naftoksyoctowego (2-NOA) oraz tzw. antyauksyny kwasu 2-(*p*-chlorofenoksy)izobutylowego (PCIB). Pewne osłabienie ruchu chloroplastów spowodowały też dwa inhibitory wypływu auksyn z komórki: NPA i TIBA. Z drugiej strony, wszystkie inhibitory powodowały spadek zawartości endogennego IAA w liściach *A. thaliana*, choć sposób prezentacji tych wyników w tabeli nie daje jasnej odpowiedzi, co do statystycznej istotności pomiędzy średnimi arytmetycznymi (uwagi do dyskusji poniżej). Ponadto: 1) podanie 2-NOA i egzogennych auksyn nie znosiło efektu hamowania ruchu chloroplastów w *N. tabacum,* 2) zastosowane inhibitory wywoływały pewien spadek w aktywności PSII, choć jego wpływ na ruchy chloroplastów wydaje się znikomy, 3) żaden z inhibitorów nie powodował znaczących zmian w anatomii liści *A. thaliana*, aczkolwiek Doktorantka odnotowała, że np. rośliny hodowane w obecności wyższych stężeń 2-NOA w podłożu były mniejsze, a końcowe stężenia dobierano tak, aby ten efekt wyeliminować, 4) nie zaobserwowano negatywnego oddziaływania użytych inhibitorów na cytoszkielet aktynowy w komórkach liści *N. tabacum*. Uzyskany obraz uzupełniły pomiary, które miały na celu sprawdzenie czy zastosowane inhibitory transportu auksyny i antyauksyna mogą zaburzać ekspresję fototropin (PHOT1 i PHOT2) na pozomie mRNA, i zawartości białka w liściach *A. thaliana*. Na tej podstawie stwierdzono, że auksyna nie reguluje fototranslokacji chloroplastów poprzez poziom ekspresji fototropin, a mechanizm jej działania na poziomie fotoreceptorów wydaje się znacznie bardziej złożony. Wyniki uzyskane w skrótowo opisanych powyżej badaniach zostały wnikliwie i krytycznie przedyskutowane, gdzie m. in. zwrócono uwagę na trudności interpretacyjne doświadczeń fizjologicznych z zastosowaniem inhibitorów. Niemniej jednak, obraz jaki się z tego wyłania skłania do słusznego wniosku, że auksyna, choć bezpośrednio nie oddziałuje na ruch chloroplastów, to może być zaangażowana pośrednio np. poprzez szlak transdukcji sygnału odpowiedzi na auksynę.

Na ostatnim etapie badań wykorzystano mutanty *A. thaliana* ze zredukowaną ekspresją różnych genów zaangażowanych w regulację homeostazy auksynowej. Najmocniejsze zahamowanie ruchu

chloroplastów stwierdzono w mutancie z zaburzonym dokomórkowym transportem auksyn *aux1-120* oraz w mutancie z upośledzoną transdukcją sygnału auksynowego *axr3-3*. Jako uzupełnienie pokazano, że badane mutanty nie miały znacząco zaburzonej struktury anatomicznej liści, która mogłaby wpływać na pomiary fotometryczne ruchu chloroplastów, choć zastosowana metoda otrzymywania przekrojów oraz wyniki uzyskane dla mutanta *aux1-120* mogą być przedmiotem dyskusji (uwagi do dyskusji poniżej). Szczególnie efekt hamowania fototranslokacji chloroplastów w mutantach z zaburzoną ścieżką sygnałową od auksyn zinterpretowano słusznie jako mocny, niezależny od wyników działania antyauksyny (PCIB), dowód potwierdzający zaangażowanie tego szlaku w regulację ruchu chloroplastów. Na zakończenie Doktorantka w sposób czytelny przedstawiła podsumowanie otrzymanych wyników.

UWAGI DO STRONY MERYTORYCZNEJ ROZPRAWY

Uwagi do rozdziału "Materiały i metody"

Niemniej jednak, pozwolę sobie na garść uwag krytycznych o charakterze propozycji do dyskusji, które przytaczam poniżej.

1. Na końcu str. 38 napisano, że do doświadczeń używano roślin *T. albiflora* po określonej ilości tygodni „od posadzenia". Termin „od posadzenia" jest trochę nieścisły, bo trzykrotki rozmnażano wegetatywnie przez sadzonki pędowe, pozyskane od roślin macierzystych, których wieku nie określono. W jakim stadium rozwoju (wieku?) były sadzonki trzykrotki np. ile miały liści?
2. Str. 43. W metodyce stosowano infiltrację liści *T. albiflora* i *N. tabacum* przed pomiarami fotometrycznymi ruchu chloroplastów, aby zwiększyć transmisję światła przez tkanki liścia. W związku z tym nasuwa się pytanie, czy infiltracja jest zabiegiem technicznym, który w ogóle umożliwia pomiar ruchu chloroplastów w grubych, wielowarstwowych liściach, a jeśli nie, to czy wykonano też pomiary kontrolne liści nieinfiltrowanych? Infiltracja, czyli wysycenie wodą tkanek liścia jest pewną ingerencją w jego strukturę, dlatego ciekawe jest czy fototranslokacje chloroplastów w takich liściach różnią się znacznie od pomiarów wykonanych na liściach nieinfiltrowanych.
3. Str. 43. Nie do końca jasne jest zastosowanie do pomiarów fluorescencji chlorofilu *a* z fotosystemu II (PSII) aż dwóch typów fluorymetrów. Skoro analizowane były tylko dwa parametry: tzw. maksymalna wydajność kwantowa PSII (Fv/Fm) i wskaźnik witalności (PI), to wystarczające było użycie tylko aparatu do pomiarów tzw. szybkiej fluorescencji, czyli Pocket PEA, który mierzy te parametry równocześnie. System PAM 210 działa na trochę innej zasadzie i np. nie podaje wartości wskaźnika witalności.
4. Str. 45. Czy w opisanej procedurze do immunoblottingu rzeczywiście pobierano próbki zawierające, aż 53 mg białka? Wydaje się, że chodzi raczej o 53 µg. Ponadto, nie wiadomo jaka była całkowita ilość białek rozpuszczalnych nakładanych na żel (na ścieżkę) (?). Podano jedynie objętość markera masowego (5 µl).
5. Str. 47. Pewnym zaskoczeniem jest zastosowanie dość nieprecyzyjnej metody otrzymywania przekrojów poprzecznych liści poprzez krojenie ich na skrawki przy użyciu żyletki. Uzyskane w ten sposób przekroje są prawie zawsze skośne i zbyt grube, co odbija się na jakości otrzymywanych obrazów mikroskopowych. Czy przy wyborze takiej metody kierowano się li tylko jej prostotą, szybkością wykonania i niskimi kosztami, i z góry założono, że - dla potrzeb prowadzonych badań - użycie innych metod z zakresu mikrotechniki roślinnej nie jest konieczne?

Uwagi do rozdziałów "Wyniki" i "Dyskusja"

1. Str. 52. Podano, że: "NPA powodował nieznaczny spadek amplitud i szybkości obu reakcji [...]", choć na ryc. 9 (str. 53) pokazano, że NPA hamował tylko szybkość reakcji ucieczki chloroplastów, tzn. jedynie ten parametr wykazywał istotnie statystyczną różnicę względem kontroli. W przypadku innych mierzonych parametrów ruchu chloroplastów takiej istotności nie zaznaczono, trudno zatem w tym wypadku mówić o "nieznacznym spadku". Można co najwyżej zaznaczyć, że zaobserwowano obniżenie danego parametru, ale było ono nieistotne statystycznie.
2. Str. 55. Dlaczego w doświadczeniach dekapitacyjnych na *T. albiflora* jako egzogenną auksynę podawano tylko NAA, skoro w przypadku *N. tabacum* stosowano NAA i IAA? Poza tym, IAA jak słusznie podkreślono w rozprawie, jest auksyną najpowszechniej występującą u roślin. Ponadto, nie

jest jasne zastosowanie w przypadku trzykrotki tylko jednego inhibitora transportu auksyn, czyli TIBA, a pominięcie NPA.

3. Str. 63. Podkreślono, że wszystkie zastosowane inhibitory "spowodowały **znaczący** spadek poziomu IAA w tkance liściowej", choć w tabeli 4 nie pokazano żadnych statystycznie istotnych różnic, które uprawomocniałyby tak kategoryczne stwierdzenie odnośnie zawartości IAA w liściach *A. thaliana*.

4. Str. 70. Byłbym ostrożny w stwierdzeniu, że w badanych mutantach auksynowych różnice w grubości i ilości komórek są niewielkie. Na przykład, przekrój poprzeczny liścia mutanta *aux1-120* jest 2-krotnie większy niż liści roślin dzikiego typu (kontrola). Aczkolwiek trudno tutaj o jednoznaczne wnioskowanie, bo w opisie ryc. 22 (dotyczy to także ryc. 18) nie podano informacji dla jakiej liczby roślin (ilość powtórzeń) przedstawione przekroje są reprezentatywne oraz czy dotyczą tego samego fragmentu liścia. Zastosowana metoda uzyskiwania przekrojów poprzecznych liści nie daje obrazów mikroskopowych na tyle wysokiej jakości, że umożliwiałyby one precyzyjną ocenę np. ilości oraz kształtu komórek; pozwala jedynie szacunkowo określić grubość liści. Dokładniejsze analizy wymagałyby zebrania danych ilościowych odnośnie grubości liści dla poszczególnych mutantów i porównania ich z grubością liści roślin typu dzikiego.

OCENA STRONY EDYTORSKIEJ PRACY DOKTORSKIEJ

Praca przygotowana jest starannie, napisana językiem poprawnym i jasnym. O pozytywach strony ilustracyjnej rozprawy wspominałem już wcześniej. Teraz powtórzę jedynie, że skrupulatnie i przemyślanie wykonane ryciny, wraz z krótkim opisem, mówią często więcej niż kilkaset słów specjalistycznego tekstu. Niemniej, Doktorantka nie ustrzegła się błędów, z których kilka najważniejszych pozwalam sobie przytoczyć poniżej. Chciałbym jednocześnie podkreślić, że **nie muszą one być dyskutowane**, a przytaczam je li tylko z recenzenckiego obowiązku. Pojawiających się błędów o charakterze interpunkcyjnym oraz literówek nie wymieniam. Jedyny wyjątek zrobię dla przyimka "w". Otóż we wszystkich zdaniach w rozprawie, rozpoczynających sie tym przyimkiem, był on pisany małą literą.

Uwagi do strony edycyjnej rozprawy

1. Str. 5. W trzecim akapicie "Streszczenia" w zdaniu: "Badano wpływ zmian w homeostazie, transporcie [...]" brakuje informacji o jaką homeostazę chodzi. Dopiero z dalszej części tekstu można sie dowiedzieć, że chodzi o "homeostazę auksynową".

2. Brak w "Wykazie skrótów" rozwinięcia skrótów białek: PMI1, PMI2, WEB1, JAC1 (str. 15) i genów *PDF2* i *UBC* (str. 44).

3. Str. 16, ostatnie zdanie. W tym konkretnym przypadku po polsku lepsze jest sformułowanie: "Cp-aktyna została uwidoczniona" niż "Cp-aktyna została zwizualizowana".

4. Rycina zacytowana w tekście powinna być umieszczona możliwie jak najbliżej zdania, które się do niej odwołuje. W przypadku ryc. 3 (odwołanie str. 24) i ryc. 4 (odwołanie str. 31) odpowiednie ilustracje pojawiają się dopiero na drugiej stronie, licząc od momentu pierwszego zacytowania tych rycin w tekście (odpowiednio na str. 26 i 33).

5. W rozprawie przebadano aż 10 różnych mutantów auksynowych pod kątem fototranslokacji chloroplastów, ale opis czego dotyczą poszczególne mutacje pojawia się dopiero w rozdz. „Wyniki" (str. 68) . Opis mutantów można było przedstawić w tabeli już w rozdz. "Materiały i metody". Zabieg taki ułatwiłby późniejsze śledzenie wyników uzyskanych na mutantach, a czytelnik zaglądając do tabeli szybko uzyskiwałby informację, jakiego fragmentu transdukcji sygnału auksynowego dotyczy dana mutacja. Wówczas opis wyników uzyskanych na tych mutantach mógłby zostać skrócony. Tym bardziej, że np. zestaw inhibitorów i regulatorów wzrostu użyty w pożywkach został przedstawiony w tabeli (Tabela 1, str. 41), która stanowi doskonałą „ściągę" dla czytelnika. Można z niej łatwo odczytać podstawowe informacje, jak np. sposób działania danego inhibitora i zastosowane stężenia.

6. Sformułowanie: „[...] stężenia ekstraktów białkowych." (str. 45) jest nieco nieprecyzyjne. Mierzymy *de facto* zawartość białek rozpuszczalnych w ekstrakcie, a nie „stężenie ekstraktu białkowego".

7. Str. 46. Za nazwą programu "ImageJ" powinien być podany w nawiasie producent i kraj pochodzenia, czyli "(NIH, USA)".

8. Pewna niekonsekwencją jest podanie warunków temperaturowych barwienia aktyny: raz napisano, że była to temp. 14 °C (str. 40), a innym razem podano zakres temperatur: "14-18 °C" (str. 46).

9. Str. 55 i 56. Dla większej jasności wywodu ryc. 11 powinna poprzedzać ryc. 10, czyli podobnie jak w przypadku *N. tabacum*: dekapitacja i egzogenne podawanie auksyny, a potem prezentacja danych uzyskanych z aplikacji inhibitora transportu auksyn.
10. Str. 64. Na końcu zdania: "Inhibitory transportu auksyn i antyauksyny [...]" powinna być zacytowana jakaś pozycja literaturowa.
11. Str. 78. W zdaniu odnoszącym się do działania PCIB napisano, że: "wpływa na ekspresje genów indukowanych przez auksyny", ale nie napisano w jaki sposób na nie wpływa tzn. hamuje ich ekspresję czy stymuluje.
12. Str. 84. Sformułowanie: "w kontroli odpowiedzi chloroplastowych" jest zbyt ogólne. Bardziej precyzyjnym określeniem w tym kontekście byłoby np. "w kontroli fototranslokacji chloroplastów".
13. Przy cytowaniu pozycji literaturowych w "Bibliografii", w niektórych miejscach nie ujednolicono rozmiarów stosowanej czcionki.

PODSUMOWANIE

Recenzowana rozprawa ma charakter pionierski albowiem podejmuje temat wcześniej niebadany. Zatem, poziom nowości naukowej w niej zawarty należy ocenić bardzo wysoko. Inną istotną rzeczą w ocenie pracy naukowej jest to, czy otwiera ona drogę do dalszych badań poprzez formułowanie kolejnych hipotez i projektowanie nowych doświadczeń. Oceniana rozprawa spełnia ten warunek z nawiązką, bo stawia wiele pytań, które czekają na odpowiedź.

W moim przekonaniu najbardziej wartościowe wyniki uzyskane w pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Eckstein to wykazanie, że ruch chloroplastów jest powiązany z homeostazą auksynową, głównie poprzez aktywność genów/białek zaangażowanych w transport auksyn i szlaki transdukcji sygnału zależne od auksyn. Szczególne uznanie budzi metodologia przeprowadzonych badań, w których doświadczenia na całych roślinach w przemyślany sposób połączono z analizami na poziomie molekularnym, co w znacznej mierze dało całościowy obraz badanego zjawiska. Wymagało to zastosowania szerokiego wachlarza technik badawczych, takich jak: fotometryczne pomiary ruchu chloroplastów, fluorymetryczne pomiary fluorescencji chlorofilu *a* z PSII, immunoblotting, czy PCR w czasie rzeczywistym, co czyni przedstawioną pracę bardzo wszechstronną. Należy podkreślić, że Doktorantka wykonała ogromną pracę, zarówno eksperymentalną jak i interpretacyjną, przy analizie i dyskusji, często niejednoznacznych wyników. Świadczy o tym także ponad 350 pozycji literaturowych zacytowanych w rozprawie. W rezultacie wyciągnęła poprawne i ciekawe wnioski. Ponadto, chciałbym dodać, że Doktorantce udało się już opublikować większość wyników przedstawionych w recenzowanej pracy doktorskiej w jednym z lepszych czasopism z zakresu biologii roślin: *Physiologia Plantarum* ($IF_{2015} = 3.52$).

Szereg zawartych w recenzji uwag krytycznych ma charakter dyskusyjny i nie umniejsza wartości merytorycznej pracy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i w związku z tym zwracam się do Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Eckstein do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ireneusz Sierocki